

استفاده از بیونانو- کامپوزیت ZnO / کربوکسی متیل کیتوسان برای ایجاد خواص ضد باکتریایی و محافظت UV پارچه های پنبه ای

ترجمه: مهندس محسن عادل

چکیده

بیونانو- کامپوزیت ZnO / کربوکسی متیل کیتوسان در دماهای مختلف آماده شده است. بیونانو- کامپوزیت ZnO / کربوکسی متیل کیتوسان با طیف سنجی FTIR، UV و میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) شناسایی شده است. نتایج به دست آمده تشکیل بیونانو- کامپوزیت را تأیید کردند. میانگین اندازه ذرات ZnO و کربوکسی متیل کیتوسان به ترتیب تقریباً برابر با 28 nm و 100 nm بود. بیونانو کامپوزیت به دست آمده به عنوان یک عامل تکمیلی برای پارچه‌ی پنبه‌ای جهت بهره‌مندی از خواص محافظت UV و ضد باکتریایی (تکمیل چند کاربرده) استفاده شده است. تکمیل به روش پد-خشک کردن-پخت (pad-dry-cure) انجام شده است. پارچه پنبه‌ای با اندازه‌گیری‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، پراش اشعه ایکس (XRD)، نرخ UPF و خواص ضد باکتریایی شناسایی شده است. پارچه پنبه‌ای تکمیل شده خواص ضد باکتریایی خیلی خوبی در برابر باکتری با بار منفی و باکتری با بار مثبت نشان می‌دهد که این خاصیت با افزایش غلظت کامپوزیت افزایش یافته و همینطور محافظت UV خوبی دارد که با افزایش دمای پخت افزایش یافته است.

۱- مقدمه

شده است . از سوی دیگر علاقه زیادی به تکمیل ضد باکتریایی الیاف و پارچه‌ها به منظور کاربردهای عملی مشاهده شده است . بیشتر منسوجاتی که عموماً در بیمارستان‌ها و هتل‌ها استفاده شده‌اند نسبت به سرایت یا انتقال بیماری‌های ناشی از میکرو ارگانیسم‌ها رسانا هستند. کلاً خواص ضد میکروبی می‌تواند از طریق ترکیب فیزیکی یا شیمیایی عوامل فعال با الیاف یا پارچه بر روی منسوجات ایجاد شود. بیونانو کامپوزیت‌ها می‌توانند در این موارد کاربرد داشته باشند. بیونانو- کامپوزیت‌ها از یک ماتریس پلیمر طبیعی و پرکننده آلی / غیرآلی با حداقل یک بعد در حد نانومتر ساخته شده‌اند. بیونانو- کامپوزیت‌ها از مزایای منحصر به فرد زیست محیطی و زیست‌سازگاری در موارد مختلف پزشکی، کشاورزی، دارویی و کاربردهای بسته‌بندی برخوردارند.

کیتوسان یک ماتریس پلیمری نویددهنده برای چنین موادی و یک عامل چسبندگی قوی می‌باشد. علاوه بر زیست تخریب‌پذیر و زیست سازگار بودن، این پلیمر می‌تواند با فلزهای انتقالی و ترکیبات فلزهای سنگین مواد کامپوزیتی پیوندهای شیمیایی گوناگونی برقرار کند و بنابراین می‌تواند پایداری نانو ذرات را افزایش دهد. استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر معمولاً با خواص مکانیکی و شیمیایی ضعیف آن‌ها و فرآیندپذیری مشکل آنها محدود شده است. این مشاهده به پلی ساکاریدها نسبت داده می‌شود که پلیمرهایی غیرقابل نفوذ و با حلالیت کم می‌باشند؛ بنابراین، طراحی مواد کامپوزیتی بر پایه آنها نیاز به توسعه روش‌های جدید دارد.

این مقاله بر کاربرد و خصوصیات بیونانو- کامپوزیت ZnO / کربوکسی متیل کیتوسان تمرکز می‌کند. اعمال بیونانو- کامپوزیت روی مواد نساجی به منظور تولید منسوجات فعال به روش پد-خشک کردن-پخت جهت بهره‌مند شدن پارچه پنبه‌ای از فعالیت ضدباکتریایی و محافظت UV انجام شده است.

در سال‌های اخیر کاربرد نانو تکنولوژی در حوزه نساجی بسیار مورو علاقه بوده است. از میان نانو ذرات اکسیدهای فلزی، تیتانیوم دی اکسید به عنوان ماده پوشش‌دهنده پارچه‌های نساجی جهت ایجاد کاربردهای از قبیل قابلیت ضد باکتریایی ، محافظت و خود تمیزشوندگی به طور گسترده مطالعه شده است. نانو Ag برای ایجاد خواص ضد باکتریایی و نانو ذرات ZnO برای خواص ضد باکتریایی و حفاظت استفاده شده‌اند. با توجه به هزینه، نانو ذرات اکسید فلزی از نانو نقره‌ها بهتر هستند. در حقیقت ZnO و TiO_2 غیر سمی بوده و از نظر شیمیایی در معرض دماهای بالا پایدارند و قادر به اکسیداسیون فوتوکاتالیستی هستند.

اخیراً ZnO به خاطر کاربردهای منحصر به فردش در سلول‌های خورشیدی، حسگرها، الکترومبدل‌های صوتی، دیودهای نوری و وسایل انتشار نور UV، صفحات خورشیدی، حسگرهای گاز، جاذب‌های UV، پوشش‌های ضد انعکاس، کاتالیست نوری و کاتالیزور توجه زیادی را به خود جذب کرده است. نانو ذرات ZnO نسبت به نانو ذرات نقره دارای مزایایی از قبیل قیمت پایین‌تر، ظاهر سفید و خاصیت جذب UV بهتری می‌باشند. ZnO برای تقویت بیونانو کامپوزیت نیز استفاده شده است.

به علت کاهش آوزون در جو زمین انتشار پرتوهای یو وی روی پوست انسان افزایش چشمگیری داشته است. از آنجا که قرار گرفتن در معرض نور UV به مدت طولانی می‌تواند باعث اثرات منفی روی سلامتی مانند شتاب در پیری پوست، فوتودرماتوز (جوش صورت و پوست)، ارتیم (قرمزی پوست) و حتی سرطان پوست شود، بنابراین در مورد منسوجاتی که عمل محافظت در برابر یووی را انجام دهند به صورت گسترده تحقیق شده است. بنابراین هدف محافظت پوشاک از پرتو UV خورشیدی می‌باشد، تمام اشعه UV باید به وسیله منسوجات جذب شود. از آن جا که منسوجات پنبه‌ای رایج‌ترین لباس‌های تابستانی هستند و کم‌ترین توانایی جذب UV را دارند بنابراین روش‌های زیادی به منظور بهبود حفاظت UV پارچه‌های پنبه‌ای بررسی



۲- آزمایش

۱.۲. مواد

پارچه ۱۰۰٪ پنبه‌ای سفیدگری شده را کارخانه ریسندگی و بافندگی Mehalla El Kobra مصر تهیه کرد. کیتوسان محلول در آب توسط کارخانه Fluka تهیه شد. NaOH ، $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، استیک اسید، مونو کلرو استیک اسید و ایزو پروپیل الکل از آزمایشگاه شیمی تهیه شد.

۲.۲. آماده‌سازی کربوکسی متیل کیتوسان محلول در آب (CM-N/O-کیتوسان)

برای کربوکسی متیله کردن کیتوسان روش آزمایشی به شرح زیر انجام شده است: حجم خاصی از محلول سدیم هیدروکسید (۳۰٪ w/v) به ۱۶ گرم کیتوسان معلق در ایزوپروپیل الکل اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تحت همزدن باقی ماند. به این مخلوط ۳۴ گرم مونو کلرواستیک اسید اضافه شد و محتوای فلاسک به مدت ۳ ساعت در معرض هم زدن پیوسته قرار گرفت. در انتها، قلیای اضافی با استفاده از استیک اسید خنثی شده و با اضافه کردن استون، کیتوسان رسوب داده است. سرانجام، کیتوسان اصلاح شده فیلتر شده و پنج مرتبه با ایزوپروپیل الکل / آب (۳۰:۷۰) شسته شده و در 60°C خشک شده است. محصول نهایی محلول در آب بود. (El-Shafei, Fouda, Knittel, & Schollmeyer, ۲۰۰۸).

۳.۲. آماده سازی بیونانو کامپوزیت ZnO/CM-N/O-کیتوسان

۳ گرم CM-N/O-کیتوسان در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده است. مخلوط با استفاده از همزن مغناطیسی هم زده شده است تا CM-N/O-کیتوسان به طور کامل حل شود. ۱۵ گرم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ به محلول CM-N/O-کیتوسان اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه شدیداً هم زده شد. ۴ گرم NaOH در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شده و همراه با هم زدن ثابت به مخلوط اضافه شده است. مخلوط به مدت ۲ ساعت در دماهای 25°C ، 50°C و 90°C هم زده شد. برای به دست آوردن پودر بیونانو کامپوزیت ZnO/CM-N/O-کیتوسان، محلول رقیق شده و سرانجام فیلتر شده است. پودر به دست آمده سه مرتبه با آب مقطر شسته شده تا هرگونه ناخالصی حذف گردد و سرانجام به مدت ۳ ساعت در دمای 80°C خشک شد تا تبدیل Zn(OH)_2 به ZnO کامل شود.

۴.۲. کاربرد بیونانو کامپوزیت ZnO/CM-N/O-کیتوسان) روی پارچه پنبه‌ای

سوسپانسیون هایی از غلظت های مختلف بیونانو کامپوزیت (۶٪-۲) در آب مقطر آماده شد. پارچه پنبه‌ای در این سوسپانسیون ها غوطه‌ور شد و با برداشت ۱۰۰٪ پد شد، به مدت ۵ دقیقه در 100°C خشک شد و سرانجام به مدت ۳ دقیقه در 160°C پخت شد. پارچه‌های پنبه‌ای به طور کامل با آب شسته شده و در هوای آزاد خشک شدند.

۵.۲. شناسایی

طیف‌سنجی FTIR: طیف‌سنجی FTIR با استفاده از یک FT-IR-FT Raman مدل Nexus 670 (Nicollet-Madison-WI-USA) انجام شده است. پارچه پنبه‌ای به قطعات خیلی کوچک بریده شده است؛ این قطعات با KBr مخلوط شده اند. بازه طیفی در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ بود.

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): نمونه ها به وسیله یک میکروسکوپ الکترونی روبشی JEOL-840 X ژاپنی با بازه بزرگنمایی ۱۰۰۰-۳۵

، وضوح 60°A و ولتاژ 19Kv آزمایش شدند. قبل از تست SEM تمام نمونه ها با طلا پوشش داده شدند.

آزمایشات میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) با استفاده از یک میکروسکوپ Zeiss - EM10 آلمانی انجام شد.

پراش اشعه ایکس (XRD): پراش سنج اشعه X مدل Philips X'Pert MPP با زاویه سنج نوع PW ۳۰۵۰/۱۰ استفاده شد. پراش سنج به وسیله یک کامپیوتر PC با برنامه های P Rofit و استفاده از MO K (منبعی با طول موج 0.154 nm) و عمل با پرتو افکنی MO-tube در 50 Kv و 40 mA کنترل و عمل شد. پارامتر های اسکن در بازه 2° تا 50° با مرحله اسکن 0.3° در همدسته انعکاس بود.

طیف سنج UV-مرئی: طیف سنجی UV-مرئی روی یک طیف سنج UV-Perkin Elmer Lambda 3B مرئی ثبت شد.

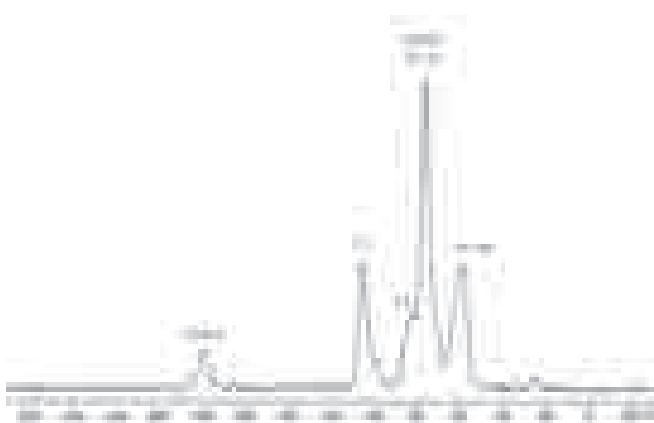
نرخ UPF و انتقال UV با استفاده از PC-اسپکتروفوتومتر Shimadzu 3101 اندازه گیری شد.

تست ضد باکتریایی: برای آزمایش ضد باکتریایی، *Staphylococcus aureus*، *S. aureus*، باکتری با بار مثبت) و *Escherichia coli* (باکتری با بار منفی *E. coli*) استفاده شده است. فعالیت ضد باکتریایی نمونه‌های پنبه‌ای آماده شده به وسیله روش منطقه بازداری اندازه گیری شد.

۳- نتایج و بحث

۱.۳. شناسایی کربوکسی متیل کیتوسان (CM-N/O-کیتوسان) به وسیله C NMR حالت جامد

کربوکسی متیله کردن کیتوسان با مونو کلرو استیک اسید و سدیم هیدروکسید حاصل شد. مطابق این واکنش که ترجیحاً در گروه‌های هیدروکسی C-۶ یا در گروه NH_2 رخ می دهد N/O-کربوکسی متیل کیتوسان (CM-N/O-کیتوسان) حاصل می شود. طیف‌سنجی C NMR حالت جامد برای یک N-کربوکسی متیل کیتوسان معمولی سیگنال هایی مربوط به تعویض N-کربوکسی متیل در 178.7 ppm و 168.7 ppm به ترتیب برای N-CH_2 و COOH نشان می دهد، اما در مورد نتایج ما C NMR حالت جامد که در شکل ۱ نشان داده شده است. سیگنال هایی در 73 و 175 ppm به ترتیب مربوط به گروه O-CH_2 و COOH کربوکسیل نشان می دهد. این شیفت زیر شاخه‌ای کربن تشکیل O-کربوکسی متیل کیتوسان را نشان می دهد. تشکیل این محصول با واکنش پذیری بالاتر گروه هیدروکسیل C6 در این واکنش ناهمگون موافق می باشد. به خاطر فقدان پیک در 47 و 168 nm به ترتیب برای N-CH_2 و COOH ، تعویض N-کربوکسی متیل وجود ندارد.



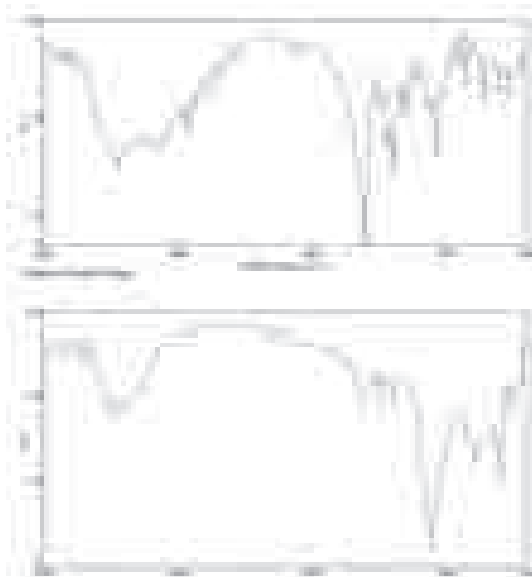
شکل ۱. طیف C NMR حالت جامد O-کربوکسی متیل کیتوسان





۳.۲.۳. طیف سنجی FTIR

تشکیل بیونانو کامپوزیت ZnO / (CM -N/O) - کیتوسان) با طیف سنجی تأیید شده است. شکل‌های ۴a و ۴b طیف FTIR - (CM -N/O) - کیتوسان تنها و بیونانو کامپوزیت ZnO / (CM -N/O) - کیتوسان) را نشان می‌دهند. همانطور که در شکل ۴a نشان داده شده است پیک جذبی در حدود 1400 cm^{-1} و 1600 cm^{-1} به گروه‌های کربوکسیل مربوط می‌شوند و پیکی در حدود 2900 cm^{-1} به C - H کششی نسبت داده شده است. یک پیک پهناور در حدود 3447 cm^{-1} به OH و NH_2 کیتوسان نسبت داده شده است. طیف FTIR بیونانو کامپوزیت ZnO / (CM -N/O) - کیتوسان) (شکل ۴b) مشابه CM -N/O - کیتوسان می‌باشد و پیکی در حدود 516 cm^{-1} مربوط به ZnO می‌باشد.



شکل ۴. (a) و (b) FTIR طیف سنجی کیتوسان و بیونانو کامپوزیت ZnO/CMCTS

۳.۳. شناسایی پارچه پنبه‌ای عمل شده با بیونانو کامپوزیت ZnO / (CM -N/O) - کیتوسان)

پارچه‌های پنبه‌ای به وسیله اندازه‌گیری خواص ضدباکتریایی، نرخ UPF، انتقال UV XRD، و SEM شناسایی شده‌اند.

۱.۳.۳. XRD

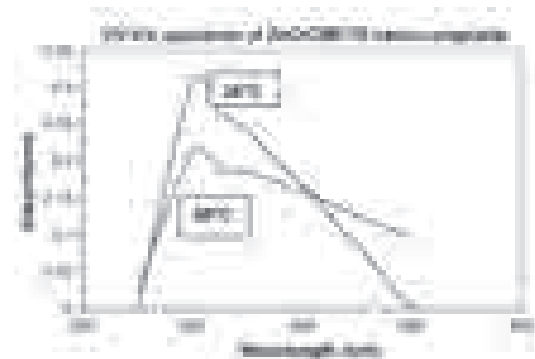
طرح XRD پارچه پنبه‌ای عمل شده با ۲٪ بیونانو کامپوزیت ZnO / (CM -N/O) - کیتوسان) در شکل ۵ نشان داده شده است. پیک‌های مشخصه پارچه پنبه‌ای (شکل ۵) در $2\theta \approx 23^\circ$ و $2\theta \approx 14^\circ$ شدید و در (Swarthmore, ۱۹۷۲) دارای شدت کمتر می‌باشد. پیک‌های دیگری که در 2θ کمتر از ۲۴ حضور دارند ممکن است به حضور CM -N/O - کیتوسان نسبت داده شوند. پیک پهناوری در 2θ در محدوده 31° تا 36° مربوط به بلور Zn می‌باشد (Swarthmore, ۱۹۸۸). این پهناور بودن ممکن است به حضور Zn متناسب با گروه‌های NH_2 و COOH حاضر در قسمت CM -N/O - کیتوسان نسبت داده شود.

۲.۳. شناسایی بیونانو کامپوزیت ZnO / (CM -N/O) - کیتوسان)

بیونانو کامپوزیت ZnO / (CM -N/O) - کیتوسان) به وسیله طیف‌سنجی UV - مرئی، XRD، و TEM شناسایی شده است.

۱.۲.۳. طیف سنج UV

طیف UV - مرئی بیونانو کامپوزیت ZnO / (CM -N/O) - کیتوسان) در دماهای 25°C و 50°C آماده شده و در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به شکل ۲ طیف‌های جذبی بیونانو کامپوزیت ZnO / (CM -N/O) - کیتوسان) در دماهای 25°C و 50°C به ترتیب 310 nm و 300 nm می‌باشد، در حالی که پیک ZnO بالک در 380 nm می‌باشد که به این معنی است که افزایش دما منجر به افزایش غلظت نانو ذرات ZnO و کاهش سایز ذره می‌شود. این یافته‌ها نقش دما روی تشکیل نانو ذرات ZnO را نشان می‌دهد که تشکیل نانو ذرات را تسهیل کرده و از تجمع آن‌ها جلوگیری می‌کند.

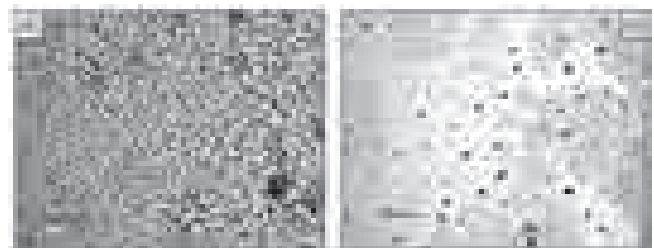


شکل ۲. طیف UV بیونانو کامپوزیت ZnO/CMCTS

۲.۲.۳. TEM

تصاویر ۳a و ۳b به ترتیب تصاویر TEM بیونانو کامپوزیت ZnO / (CM -N/O) - کیتوسان) تشکیل شده در 50°C و 25°C را نشان می‌دهند. همانطور که در شکل‌های ۳a و ۳b نشان داده شده است به نظر می‌رسد که نانو ذرات ZnO (نقاط سیاه) تشکیل شده در 50°C کروی، همگن (شکل ۳a) و از نظر سایز ذره از ذرات تشکیل شده در 25°C (متوسط اندازه ذره 28 nm می‌باشد) کوچکتر باشند.

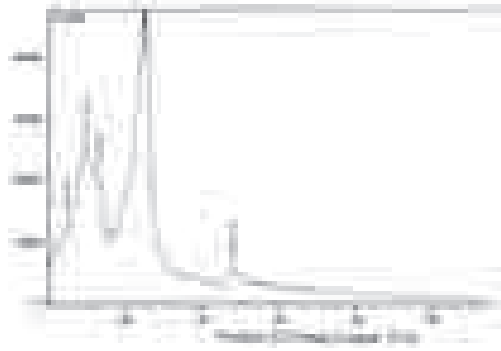
همینطور سایز ذرات CM -N/O - کیتوسان (نقاط سفید) حدود 100 nm بوده و از نظر شکل کروی و همگن می‌باشند. به خاطر حضور گروه‌های NH_2 و COOH در CM -N/O - کیتوسان، به نظر می‌رسد که CM -N/O - کیتوسان به عنوان پایدار کننده و الگوی برای تشکیل نانو ذرات ZnO در تشکیل پیوند های متناسب با Zn^{2+} عمل کند.



شکل ۳. (a) و (b) به ترتیب TEM بیونانو کامپوزیت ZnO/CMCTS تهیه شده در دمای 25°C و 50°C



افزایش غلظت ZnO با تبدیل Zn(OH)₂ به ZnO تحت دمای بالاتر نسبت داده شود. مقادیر UPF در دماهای پخت ۱۲۰°C، ۱۴۰°C و ۱۶۰°C به ترتیب برابر با ۵.۷، ۶.۴ و ۷.۶ می باشد. همبستگی انتقال UV (در بازه ۲۰۰-۴۰۰nm) نمونه عمل شده در دماهای پخت متفاوت نیز با افزایش دمای پخت کاهش می یابد که با نتایج UPF موافق بوده و به همان دلایل نیز نسبت داده شده است.



شکل ۵. XRD پارچه پنبه‌ای عمل شده با بیونانو کامپوزیت ZnO/CMCTS



شکل ۶. SEM پارچه پنبه‌ای (a) عمل شده و (b) عمل نشده با بیونانو کامپوزیت ZnO/CMCTS

۳.۳.۳. SEM

SEM برای شناسایی سطح پارچه پنبه‌ای عمل شده با بیونانو کامپوزیت ZnO/CM-N/O/ (کیتوسان) استفاده شد. تصاویر SEM نمونه پارچه پنبه‌ای عمل شده و عمل نشده در شکل های ۶a و ۶b نشان داده شده است. پارچه پنبه‌ای با یک فیلم یکنواخت و متراکم (سیاه) از نانو ذرات ZnO (با میانگین سایز = ۲۸nm) عمل شد (شکل ۶a)، که ذرات بزرگتر (سفید) ذرات بزرگتر مولکول های پلیمر CM-N/O- کیتوسان می باشند که از نظر اندازه در بازه ۱۰۰nm می باشند.

۳.۳.۳. خواص ضد باکتریایی

فعالیت ضد باکتریایی پارچه‌های پنبه‌ای از حضور بیونانو کامپوزیت ZnO/CM-N/O/ (کیتوسان) روی سطح آنها نتیجه شده است. فعالیت ضد باکتریایی پارچه پنبه‌ای عمل شده با بیونانو کامپوزیت ZnO/CM-N/O- کیتوسان) بر حسب روش منطقه بازداری در برابر باکتری با بار منفی (E.coli) و باکتری با بار مثبت (S.aureus) اندازه گیری شده است. جدول ۱ نتایج منطقه بازداری پارچه پنبه‌ای عمل شده با غلظت های مختلف بیونانو کامپوزیت ZnO/CM-N/O/ (کیتوسان) در بازه ۲-۶٪ را نشان می دهد. جدول ۱ به طور واضح نشان می دهد که تمام نمونه‌ها از نمونه عمل شده منطقه بازداری بزرگتری دارند که در جدول ۱ و شکل ۶ مشهود است. جدول ۱ همبستگی نشان می دهد که با افزایش غلظت بیونانو کامپوزیت ZnO/CM-N/O/ (کیتوسان) در محدوده مطالعه شده (۲-۶٪)، منطقه بازداری افزایش می یابد. جدول ۱ مقاومت بیشتر E.coli (باکتری با بار منفی) در مقایسه با S.aureus (باکتری با بار مثبت) را نشان می دهد که به خاطر تفاوت در ساختار هر نوع می باشد.

جدول ۲. نرخ UPF پارچه پنبه‌ای

Temperature (°C)	UPF (Average)
120	5.7
140	6.4
160	7.6

۴- نتیجه گیری

در نتیجه یک روش ساده برای آماده کردن نانو ZnO با استفاده از بیونانو کامپوزیت ZnO/CM-N/O/ (کیتوسان) و پوشاندن روی پارچه‌های پنبه‌ای برای برخورداری از خواص کاربردی، توسعه یافته است. واکنش بهینه که در ۵۰°C انجام شد تشکیل نانو ذرات کوچکتری را نسبت به واکنش انجام شده در آب ۲۵°C یا ۹۰°C نشان می دهد. در هر دو مورد به نظر می رسد که نانو ذرات تقریباً کروی و با یک محدوده سایز محدود باشند. میانگین سایز ZnO ذرات کربوکسی متیل کیتوسان به ترتیب $\approx 28\text{nm}$ و $\approx 100\text{nm}$ بود. نانو ذرات با میکروسکوپ الکترونی، پراش اشعه X، FTIR و آزمایشات سطح مخصوص آنالیز شده اند. با به کار بردن نانو ذرات ZnO روی سطح پارچه‌های پنبه‌ای، عملکرد خاص نانو ذرات ZnO به عنوان جاذب UV می تواند به طور موثری به پارچه منتقل شود. تست های UV یک افزایش قابل توجه در فعالیت جذب UV پارچه های عمل شده با ZnO نشان می دهد. همبستگی پارچه عمل شده با ZnO بهبود قابل توجهی در خواص ضد باکتریایی پارچه پنبه‌ای نیز نشان می دهد. این نتایج می تواند برای محافظت بدن در برابر پرتو خورشید، فعالیت ضد باکتری و کاربرد های تکنولوژیکی استفاده شود.

منابع در دفتر مجله موجود است.

جدول ۱. پارامتر منطقه بازداری پارچه پنبه‌ای

Conc. (mg/ml)	Zone Diameter (mm)
2%	10
4%	15
6%	20

۴.۳.۳. UPF و انتقال UV

جدول ۲ مقادیر UPF پارچه پنبه‌ای عمل شده با ۲٪ کامپوزیت در دماهای پخت متفاوت (۱۲۰-۱۶۰°C) را نشان می دهد. مقادیر UPF نمونه عمل شده از نمونه عمل نشده بیشتر می باشد. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، مقادیر UPF با افزایش دمای پخت در محدوده مطالعه شده افزایش می یابد. این امر ممکن است به

