

## مقایسه سمیت و اثرات ضدباکتریایی نانوذرات $TiO_2$ و $CuO$ در محیط کشت جامد

بیژن بینا<sup>۱</sup>، محمدمهدی امین<sup>۲</sup>، محمدرضا زارع<sup>۳</sup>، علی فاتحی‌زاده<sup>۴</sup>، سید محسن محسنی<sup>۵</sup>، مهدی زارع<sup>۶</sup>، علی طولابی<sup>۷</sup>

پذیرش: ۹۱/۰۹/۱۸

دریافت: ۹۱/۰۶/۰۴

### چکیده

**زمینه و هدف:** بررسی سمیت مواد مربوط به علم نانو تکنولوژی قبل از توسعه هرچه بیشتر این صنعت ضروری است. از طرف دیگر ویژگی‌های منحصر به فرد مواد مربوط به این تکنولوژی می‌تواند در حذف باکتری‌ها از مواد دیگر استفاده شود. در این مطالعه سمیت و قدرت گندزدایی نانو  $TiO_2$  و  $CuO$  با استفاده از چهار گونه باکتریایی در محیط‌های جامد مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش بررسی:** محلول استوک نانوذرات ( $10\text{ g-TSS/L}$ ) توسط محیط کشت مولر هیتون آگار رقیق شد تا غلظت‌های  $5-6000\text{ mg-TSS/L}$  از آن به دست آید. از هر یک از این غلظت‌ها، سه پتری دیش تهیه گردید و باکتری‌های خالص‌سازی شده بر روی آنها، کشت داده شدند. پس از کشت باکتری‌ها بر روی محیط کشت‌های حاوی نانوذرات، درصد بازدارندگی رشد تعیین گردید. بر اساس این اطلاعات ۵۰٪ بازدارندگی رشد ( $EC_{50}$ )، غلظت بدون بازدارندگی رشد ( $NOEC$ ) و ۱۰۰٪ بازدارندگی رشد تعیین گردید.

**یافته‌ها:** نتایج این مطالعه نشان داد سمیت نانو  $TiO_2$  در محیط جامد بیشتر از نانو  $CuO$  است. در این مورد  $EC_{50}$  نانو  $TiO_2$  با استفاده از اشرشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آیروزینوزا به ترتیب  $181\text{ mg-TSS/L}$ ،  $571\text{ mg-TSS/L}$  و  $93\text{ mg-TSS/L}$  محاسبه شد. در حالی که این اعداد برای نانو  $CuO$  به ترتیب برابر با  $2550\text{ mg-TSS/L}$ ،  $1609\text{ mg-TSS/L}$  و  $946\text{ mg-TSS/L}$  به دست آمد.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که استافیلوکوک اورئوس به دلیل حساسیت بالا به هر دو نانوذره  $TiO_2$  و  $CuO$ ، و همچنین اشرشیاکلی به دلیل مقاومت بالا به ترتیب به عنوان شاخص زیستی در تست‌های سمیت و تست‌های تعیین قدرت عوامل ضد باکتریایی نسبت به سایر باکتری‌های مورد بررسی در این مطالعه ارجحیت دارند.

**واژگان کلیدی:** نانوذرات، نانو  $CuO$ ، نانو  $TiO_2$ ، باکتری، گندزدایی، سمیت

۱- دکترای بهداشت محیط، استاد دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۲- دکترای بهداشت محیط، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۳- (نویسنده مسئول): دانشجوی دکترای بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

[zare mohammad1363@yahoo.com](mailto:zare mohammad1363@yahoo.com)

۴- دانشجوی دکترای بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

۵- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم

۶- دکترای بهداشت حرفه‌ای، استادیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان

۷- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بهداشت محیط، مربی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمان (بم)

## مقدمه

نانوذرات اکسید تیتانیوم (نانو  $TiO_2$ ) به دلیل ویژگی‌هایی هم‌چون مقاومت به درجه حرارت‌های بالا، حلالیت پایین و سطح ویژه بالا کاربردهای گسترده‌ای دارد (۱). این ماده در کرم‌های ضد آفتاب، رنگدانه‌ها، کابل‌های برق، سرامیک‌ها و... کاربرد دارد (۲). نانو  $CuO$  نیز در صنایع نجاری و هم‌چنین نساجی به صورت گسترده‌ای استفاده می‌شود (۳ و ۴). با وجود این که منافع نانو مواد، انکارناپذیر است اما باید توجه داشت که چنین کاربرد گسترده‌ای باعث ورود میلیون‌ها تن نانو مواد به محیط، منابع آب و زنجیره غذایی می‌شود (۵). بنابراین جهت جلوگیری از عواقب یک صنعت نوظهور ضروریست که تمام جوانب آن، از جمله سمیت مواد وارد شده به محیط مورد ارزیابی قرار گیرد. در خصوص سمیت نانوذرات مطالعات مفیدی صورت گرفته است که خطرات تحمیلی به انسان و محیط را مورد ارزیابی قرار داده‌اند (۶-۸). اما بیشتر مطالعاتی که سمیت اکسیدهای فلزی نانوذرات را مورد بررسی قرار داده‌اند، از ارگانسیم‌هایی هم‌چون سلول‌های انسانی (۹)، سخت پوستان (۱۰)، آگ‌ها (۱۱)، و ماهی‌ها (۱۲) استفاده کرده‌اند. هم‌چنین در مطالعات زیادی نیز اثر این نانوذرات بر روی میکروارگانسیم‌ها بررسی شده است (۷، ۲، ۳ و ۱۳) برای مثال در سال ۲۰۰۸ Heinlaan و همکارانش (۱۶) به بررسی  $EC_{50}$  نانوذرات  $ZnO$  و  $TiO_2$  و حالت توده‌ای (غیرنانوذره‌ای) این مواد بر باکتری ویبریو فیشری پرداختند. در این مطالعه مشخص شد حالت نانوذره‌ای این مواد اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به حالت توده‌ای دارند. به علاوه مشخص شد سمیت نانو  $ZnO$  بیشتر از  $TiO_2$  است. در مطالعه دیگری که سمیت نانوذرات  $ZnO$  با استفاده از اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس در محیط مایع بررسی شد که مشخص گردید استافیلوکوک اورئوس گرم مثبت دارای مقاومت کمتری نسبت به ا. کلای گرم منفی است (۱۵) با وجود مطالعات ارزشمند در زمینه تعیین اثرات و سمیت نانوذرات با استفاده از باکتری‌ها، اما در بیشتر این مطالعات، بررسی‌ها عمدتاً در محیط‌های مایع صورت گرفته است (۱۵). این درحالی است که بر اساس مطالعات پیشین نانوذرات در محیط‌های آبی بر اثر اختلاط و برخورد ذرات به یکدیگر، گرایش به توده‌ای شدن

دارند و بر اثر این مکانیسم قطر آنها افزایش می‌یابد (۱۶). از طرف دیگر قطر ذرات پارامتر مهمی است که می‌تواند در نفوذ ذرات به داخل سلول‌ها و در نتیجه سمیت آنها تاثیرگذار باشد (۱۶ و ۱۷)، بنابراین یکی از ایرادات مطالعات پیشین در تعیین سمیت نانوذرات این است که اثر تجمع و توده‌ای شدن ذرات نادیده گرفته شده و این امر می‌تواند باعث شود، میزان سمیت کمتر از مقدار واقعی گزارش شود. از این‌رو سمیت نانوذرات در محیط‌های جامد نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

از طرف دیگر مقایسه مطالعات گذشته در زمینه سمیت نانوذرات نشان می‌دهد، حتی مطالعاتی که به وسیله یک موجود یا میکروارگانسیم واحد نیز صورت گرفته‌اند، در نتایج دارای اختلافات زیادی هستند، این اختلافات عمدتاً به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی و فردی موجودات استفاده شده، تفاوت در شرایط شیمیایی محیط کشت، خواص نانوذرات و تفاوت در روش‌های تهیه نانوذرات است (۲ و ۸). بنابراین جهت مقایسه هرچه بهتر نتایج، پیشنهاد می‌شود که بررسی تمام پارامترهای موثر از جمله نوع نانوذره و نوع باکتری در یک مطالعه واحد مورد بررسی قرار گیرند. این در حالیست که در عمل مطالعاتی که تاکنون در این زمینه صورت گرفته عمدتاً به وسیله یک گونه باکتریایی و یا یک نوع نانوذره و هم‌چنین در محیط‌های آبی صورت پذیرفته‌اند.

به علاوه در مطالعات گذشته  $EC_{50}$  (غلظت دارای اثر موثر بر روی ۵۰٪ از اعضای نمونه) تعیین نشده است و به همین دلیل مقایسه یافته‌های مطالعات به سادگی امکان‌پذیر نیست.

از این جهت این اولین مطالعه جامعی است که با تعیین  $EC_{50}$  دو نوع نانوذره به وسیله چهار گونه باکتریایی در محیط جامد می‌پردازد. به علاوه تعیین ۱۰۰٪ بازدارندگی رشد باکتری‌ها در این مطالعه خواص ضد باکتریایی نانوذرات را نیز مشخص سازد. در این خصوص می‌توان گفت، در مقایسه با مواد آلی، مواد ضد باکتریایی غیرآلی (هم‌چون نانوذرات)، ایمن‌تر و در فشار و دمای بالا، پایدارتر و با ثبات‌تر هستند. بنابراین نتایج این مطالعه می‌تواند کاربردهای گسترده‌ای از کاربردهای ضدباکتریایی تا خواص درمانی و بیمارستانی را شامل شود.

## مواد و روش‌ها

میزان باکتری‌های تلقیح شده در هر ظرف به حدود ۲۰۰ CFU رسید و تست مربوط به هر غلظت سه بار تکرار شد. در نهایت درصد بازدارندگی رشد در مقایسه با نمونه شاهد تعیین شد (۱۵).

میانگین بازدارندگی رشد برای هر سه بار تکرار تعیین شد و این نتایج توسط آنالیز پروبیت در نرم‌افزار SPSS ver 16.0 0 آنالیز شد و  $EC_{50}$  تعیین گردید. هم‌چنین نتایج به دست آمده از آنالیز پروبیت جهت رسم نمودار دوز- پاسخ در نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 استفاده شد. هم‌چنین غلظت بدون اثر قابل مشاهده (NOEC) نیز توسط آنالیز پروبیت تعیین شد.

## یافته‌ها

کشت باکتریایی نمونه‌های لجن نشان داد که دو گونه اشرشیاکلی و سودوموناس آیروژینوزا درصد در صد نمونه‌های برداشت شده حضور دارند. دو گونه باکتریایی دیگر استافیلوکوک اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس به ترتیب در ۸۸٪ و ۷۲٪ از نمونه‌های لجن شناسایی شدند.

## میزان سمیت

نتایج مربوط به محاسبات  $EC_{50}$  و NOEC در جدول ۲ و ۳ آورده شده است. طبق جدول ۲ بیشترین و کمترین مقادیر  $EC_{50}$  نانو  $TiO_2$  به ترتیب با استفاده از باکتری‌های آیروژینوزا (۹۳mg-TSS/L) و استافیلوکوک اورئوس (۹۳mg-TSS/L) حاصل شد. در مورد نانو  $CuO$  جدول ۳ نشان می‌دهد که بیشترین و کمترین مقادیر این پارامتر به ترتیب مربوط به باکتری‌های اشرشیاکلی (۲۲۵۰mg-TSS/L) و

مشخصات نانوذرات  $TiO_2$  و  $CuO$  استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است. جهت انجام آزمایشات ابتدا سوسپانسیون استوک از این نانوذرات به مدت ۳۰ min در دستگاه التراسونیک (Bandelin Sonorex RK 31 H) با دمای  $65^{\circ}C$  قرار گرفت و سپس در تهیه غلظت‌های مورد نظر استفاده شد.

طبق رهنمودهای استانداردهای امتد آزمایشات آب و فاضلاب، در تعیین سمیت مواد به وسیله آزمون‌های زیستی، حداقل ۵ غلظت از مواد مورد نظر، جهت تعیین  $EC_{50}$  نیاز است (۱۷)، اما در این مطالعه با توجه به نتایج مطالعات قبلی و هم‌چنین جهت افزایش دقت، محلول استوک (۱۰g-TSS/L) با محیط کشت مولر هینتون آگار (MHA) رقیق شد و ۱۴ غلظت از نانوذرات در محدوده تا ۶۰۰۰ mg-TSS/L-۵ تهیه شد.

جهت ایجاد شرایط استریلیزه، این محیط کشت‌ها توسط اتوکلاو استریل شدند و پس از تخلیه در پتری دیش، آزمون‌های تعیین سمیت بر روی آن‌ها صورت گرفت.

جهت کاربردی شدن نتایج و بررسی خواص ضد باکتریایی نانوذرات در لجن فاضلاب شهری، نمونه‌های باکتریایی از تصفیه‌خانه شهر کرمان تهیه شدند. بدین منظور، نمونه‌های لجن بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شدند و پس از انکوباسیون به مدت ۴۸ h - ۲۴ در دمای  $37^{\circ}C$  و تشکیل کلنی، گونه‌های باکتریایی جداسازی شدند و شناسایی شدند. جهت تشخیص افتراقی و شناسایی باکتری‌ها، پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم برای هر یک از چهار نوع باکتری مورد نظر از تست‌های بیوشیمیایی ارایه شده استفاده گردید (۱۸). بعد از کشت گونه‌های خالص‌سازی شده و تهیه مقادیر کافی از آنها، این باکتری‌ها بر روی پلیت‌های حاوی غلظت‌های مختلف از نانوذرات (۵-۶۰۰۰ mg-TSS/L) کشت داده شدند.

جدول ۱: مشخصات نانوذرات استفاده شده

| نانوذره             | فرمول   | شرکت سازنده | خلوص % | اندازه nm | سطح ویژه $m^2/g$ |
|---------------------|---------|-------------|--------|-----------|------------------|
| نانو اکسید تیتانیوم | $TiO_2$ | Merck       | ۹۹     | ۲۰        | ۴۰               |
| نانو اکسید مس       | $CuO$   | Merck       | ۹۸     | ۶۰        | ۸۰               |

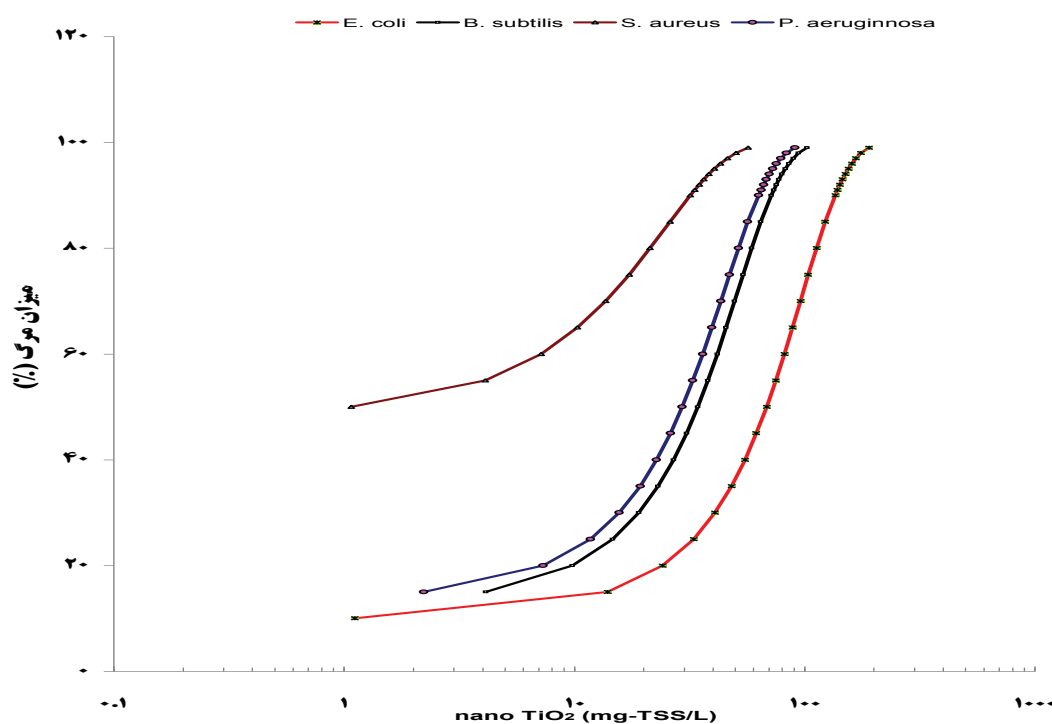
جدول ۲: میزان  $EC_{50}$  و  $NOEC$  نانوذرات  $TiO_2$  با استفاده از باکتری‌های مختلف

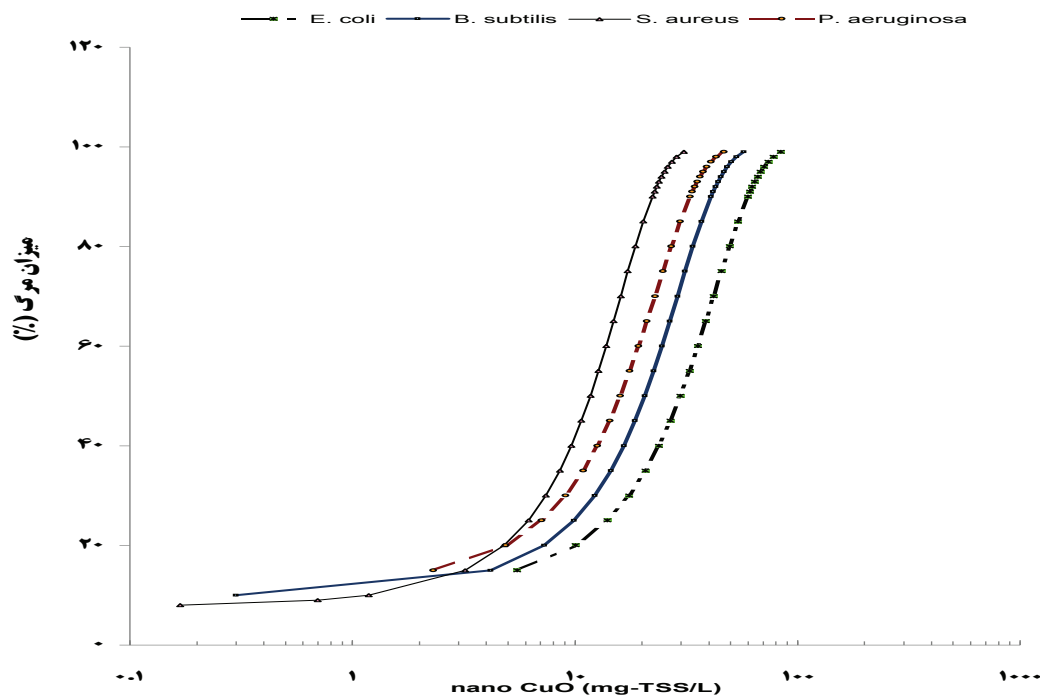
| NOEC<br>(mg-TSS/L) | حد بالای<br>$EC_{50}$ | حد پایین<br>$EC_{50}$ | $EC_{50}$<br>(mg-TSS/L) | باکتری               |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| ۰                  | ۲۶۲                   | ۱۲۵                   | ۱۸۱                     | اشرشیاکلی            |
| ۰                  | ۱۸۸                   | ۲۱                    | ۹۳                      | استافیلوکوک اورئوس   |
| ۱۶                 | ۱۳۸۳                  | ۶۶۲                   | ۹۳۳                     | سودوموناس آیروژینوزا |
| ۰                  | ۷۸۸                   | ۴۲۸                   | ۵۷۱                     | باسیلوس سوبتیلیس     |

آنالیز پروبیت داده‌های خام حاصل از میزان بازدارندگی رشد را تحلیل می‌کند و میزان بازدارندگی رشد را در غلظت‌های مختلف با حدود اطمینان‌های مختلف محاسبه می‌کند. بنابراین از این اطلاعات جهت رسم نمودارهای دوز- پاسخ استفاده شد. در واقع آنالیز پروبیت با محاسبه حدود اطمینان‌های مختلف، بهترین خطی را که گویای میزان بازدارندگی رشد در غلظت‌های مختلف است را به دست می‌دهد و از این رو می‌توان گفت شکل ۱ و ۲، رگرسیون غیرخطی اطلاعات خام اولیه است. از آنجا که نمودارهای تعیین سمیت باید همواره S شکل باشند، با رسم چنین نمودارهایی حالت S شکل نمودارهای سمیت بهتر پدیدار می‌شود.

استافیلوکوک اورئوس ( $946 \text{ mg-TSS/L}$ ) است. از طرف دیگر محاسبه  $NOEC$  با استفاده از آنالیز پروبیت نشان داد که  $TiO_2$  برای بیشتر باکتری‌ها، حتی در کمترین مقادیر نیز سمی است، به طوری که بر اساس جدول ۲ میزان  $NOEC$  برای هر تمام باکتری‌های مورد مطالعه به جز آیروژینوزا صفر محاسبه شد. این در حالی است که در مورد  $CuO$  این پارامتر از  $195 \text{ mg-TSS/L}$  (در مورد استافیلوکوک اورئوس) تا  $288 \text{ mg-TSS/L}$  (در مورد اشرشیاکلی) متغیر است.

محاسبه  $EC_{50}$  و  $NOEC$  نشان داد که  $TiO_2$  دارای سمیت بسیار بیشتری نسبت به  $CuO$  است. به طوری که در مورد تمام باکتری‌ها این دو پارامتر در مورد  $TiO_2$  نسبت به  $CuO$  بسیار کمتر است.

شکل ۱: دوز پاسخ باکتری‌های مختلف در اثر مواجهه با نانوذرات  $TiO_2$



شکل ۲: دوز پاسخ باکتری‌های مختلف در اثر مواجهه با نانوذرات CuO

#### قدرت ضد باکتریایی

در این مطالعه جهت بررسی قدرت ضدباکتریایی نانوذرات، غلظت مورد نیاز جهت از بین بردن ۱۰۰٪ باکتری‌ها توسط آنالیز پروبیت محاسبه شد (جدول ۳). در این بخش نتایج نشان داد به کاربردن غلظت ۲/۶ g-TSS/L از نانوذرات  $TiO_2$  و ۶/۷ g-TSS/L از نانوذرات CuO باعث جلوگیری کامل از رشد هر چهار گونه باکتریایی مورد مطالعه می‌شود. مقایسه ارقام جدول ۴ نشان می‌دهد، جلوگیری کامل از رشد باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس به کمترین غلظت از هر دو نوع نانوذره نیاز دارد. بیشترین مقدار مورد نیاز از نانوذره  $TiO_2$  جهت ۱۰۰٪ بازدارندگی

شکل ۱ نشان می‌دهد که سمیت نانوذرات همواره با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد. در شکل ۱ به خوبی مشخص است که در مقایسه با دیگر باکتری‌ها، درصد بازدارندگی رشد باکتری آیروزینوزا در غلظت‌های بیشتری از نانوذره  $TiO_2$  رخ می‌دهد و این نشان دهنده مقاومت بالای آن نسبت به سایر باکتری‌هاست. در شکل ۲ برخلاف نمودار مربوط به  $TiO_2$ ، مشاهده می‌شود که مقاوم‌ترین باکتری به CuO باکتری اشرشیاکلی است. در مورد حساس‌ترین باکتری به این دو نانوذره مقایسه شکل‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد که استافیلوکوک اورئوس در مقایسه با سایر باکتری‌ها نسبت به هر دو نانوذره حساس‌ترین باکتری است.

جدول ۳: میزان  $EC_{50}$  و NOEC نانوذرات CuO با استفاده از باکتری‌های مختلف

| NOEC (mg-TSS/L) | حد بالای $EC_{50}$ | حد پایین $EC_{50}$ | $EC_{50}$ (mg-TSS/L) | باکتری               |
|-----------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| ۲۸۸             | ۵۴۰۷               | ۱۵۴۵               | ۲۵۵۰                 | اشرشیاکلی            |
| ۱۹۵             | ۱۱۷۲               | ۷۷۵                | ۹۴۶                  | استافیلوکوک اورئوس   |
| ۲۷۸             | ۱۷۵۹               | ۹۱۱                | ۱۲۳۱                 | سودوموناس آیروزینوزا |
| ۲۸۴             | ۲۳۵۸               | ۱۲۳۲               | ۱۶۰۹                 | باسیلوس سوبتیلیس     |

جدول ۴: غلظت مورد نیاز نانوذرات (L/TSS-mg) جهت از بین بردن ۱۰۰٪ باکتری‌ها

| غلظت<br>نانوCuO | غلظت<br>نانوTiO <sub>2</sub> | باکتری               |
|-----------------|------------------------------|----------------------|
| ۶۶۵۳            | ۵۳۶                          | اشرشیاکلی            |
| ۲۳۱۰            | ۳۵۹                          | استافیلوکوک اورئوس   |
| ۲۹۶۲            | ۲۵۹۷                         | سودوموناس آیروژینوزا |
| ۴۰۱۴            | ۱۶۸۳                         | باسیلوس سوبتیلیس     |

هر گونه خاص از باکتری‌هاست. بر اثر این پدیده مشاهده می‌شود که هر نانوذره در غلظت‌ها و شرایط مختلف می‌تواند گونه‌های خاصی از باکتری‌ها را از بین ببرد. سمیت انتخابی مواد از حیث کاربردهای دارویی، درمانی و ضد باکتریایی می‌تواند بسیار مهم باشد. چرا که با استفاده از این خاصیت می‌توان میکروارگانیسم هدف را مشخص کرده و با کاربرد یک نانوذره خاص، این امکان را فراهم آورد، تا اثر نانوذره تنها بر روی یک گونه باکتریایی باشد و این همان چیزی است که از نتایج این مطالعه نیز می‌تواند، نتیجه شود. برای مثال با توجه به جدول ۴، در یک محیط جامد که حاوی چهار نوع باکتری استفاده شده در این مطالعه است، می‌توان با کاربرد ۳۹۵ mg-TSS/L از نانوذرات TiO<sub>2</sub> از رشد ۱۰۰٪ باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس جلوگیری کرد. در حالی که هنوز مقادیری از دیگر باکتری‌ها در محیط وجود دارند و یا با توجه به شکل ۱، با کاربرد ۱۶۸۳ mg-TSS/L از همین نانوذرات می‌توان گفت هنوز ۱۵٪ از باکتری‌های آیروژینوزا در محیط قابلیت رشد دارند، در حالی که در این غلظت سایر گونه‌های دیگر به هیچ‌وجه امکان رشد ندارند. در واقع با این اثر می‌توان شرایط را به سمتی پیش برد که اطمینان حاصل شود، تنها یک گونه میکروبی خاص امکان رشد دارد.

از آنجا که در آزمایشات تعیین سمیت، هدف تعمیم داده‌ها به سایر موجودات و از جمله انسان است، بنابراین در این آزمایشات باید از حساس‌ترین موجودات استفاده شود. این امر باعث می‌شود کاربرد نتایج با ضریب اطمینان بالاتری همراه باشد. در این مطالعه، مقایسه EC<sub>50</sub>ها نشان داد که در مورد هر

رشد، درمقایسه با سایر باکتری‌ها در مورد آیروژینوزا نیاز است. این درحالی است که بیشترین مقدار از نانوذرات CuO درمورد اشرشیاکلی کلای مورد نیاز است.

## بحث

این مطالعه نشان داد سمیت نانوذرات CuO درمورد باکتری‌های مورد آزمایش به میزان قابل توجهی کمتر از TiO<sub>2</sub> است، بنابراین اگر این نتایج قابل تعمیم به دیگر جانداران از جمله انسان بود، می‌توان گفت در کاربرد TiO<sub>2</sub> توجه به حذف آن از محصولات تا حد امکان و یا جایگزینی آن با ترکیبات کم خطرتر ضرورت دارد. اما با توجه به نتایج مطالعات قبل به نظر می‌رسد، این قضاوت همیشه و در مورد تمام موجودات صادق نیست به طوری که در مطالعه Heinlaan و همکاران عکس این موضوع به اثبات رسید (۱۶). طی این مطالعه EC<sub>50</sub> نانوذرات TiO<sub>2</sub> با استفاده از باکتری ویبریو فیشری بیش از ۲۰۰۰۰ mg-TSS/L به دست آمد، در حالی که این مقدار برای نانوCuO برابر با ۷۹ mg-TSS/L بود. عمده تفاوت این دو مطالعه، نوع میکروارگانیسم استفاده شده و هم‌چنین محیط کشت مورد استفاده (محیط کشت مایع) بود.

در زمینه چنین اختلاف زیادی در نتایج این دو تحقیق، محتمل‌ترین دلیل می‌تواند سمیت انتخابی نانوذرات مختلف برای باکتری‌های مختلف باشد. بر این اساس می‌توان گفت نانوذرات مختلف دارای طیف سمیت مشخصی بر روی

دو نانوذره، حساس‌ترین باکتری استافیلوکوک اورئوس است. بنابراین این میکروارگانیسم در تست‌های سمیت (به عنوان شاخص زیستی سمیت) نسبت به سه گونه دیگر ارجحیت دارد. این موضوع در مطالعه دیگری که سمیت نانوذرات ZnO با استفاده از اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس در محیط مایع بررسی شده بود نیز به اثبات رسیده بود (۱۳). با این حال این تحقیق تنها در مورد ۴ گونه باکتریایی صورت گرفته است و جهت تعیین بهترین شاخص آزمون‌های سمیت نیاز به بررسی سایر باکتری‌ها نیز است.

علاوه بر نوع میکروارگانیسم، روش آزمایش نیز تاثیر زیادی در نتایج حاصل از آزمون سمیت دارند. برای مثال در مطالعه‌ای که بر روی سوسپانسیون نانوذرات ZnO، TiO<sub>2</sub> و CuO و Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> صورت گرفت (۱۹). مشخص شد که تنها نانوذرات ZnO و CuO دارای قدرت بازدارندگی در باکتری‌ها هستند. هر چند در مطالعه حاضر، اثرات ضد باکتریایی نانوذرات مورد بررسی قرار نگرفت، اما در مورد دو نانوذره TiO<sub>2</sub> و CuO در این مطالعه، مشخص شد که در غلظت‌های خاصی اثرات سمیت آنها قابل توجه است. عمده تفاوت این دو مطالعه، نوع محیط کشت استفاده شده و زمان تماس است. در این مورد با توجه به اینکه این مطالعه اثرات سمیت بالاتری را آشکار نمود، می‌توان گفت، روش کار استفاده شده در این مطالعه مناسب تر است.

برخلاف آزمون‌های تعیین سمیت، در تعیین قدرت ضد باکتریایی یک ماده، همواره از شاخص‌هایی باید استفاده شود که مقاومت بالایی داشته باشند، چرا که در صورت از بین رفتن آن میکروارگانیسم، می‌توان اطمینان داشت که سایر میکروارگانیسم‌ها نیز از بین رفته‌اند، بنابراین بر اساس نتایج ۱۰۰٪ بازدارندگی رشد در بین چهار باکتری مورد مطالعه، آبروژینوزا در مورد نانوذرات TiO<sub>2</sub> و اشرشیاکلی در مورد نانو CuO به عنوان شاخص می‌توانند، عمل کنند.

در این مطالعه مشخص شد در محیط‌های جامد سمیت نانوذرات TiO<sub>2</sub> بیشتر از نانوذرات CuO است. هم‌چنین در بین چهار باکتری مورد آزمایش، اورئوس حساسیت بیشتری به این دو نانوذره نشان داد، بنابراین استفاده از آن به عنوان شاخص زیستی، نسبت به سه گونه باکتریایی دیگر ارجحیت دارد. در کاربرد نانوذرات به عنوان عوامل ضدباکتریایی، مشخص شد، نانو TiO<sub>2</sub> در غلظت‌های کمتری نسبت به CuO قادر به ۱۰۰٪ بازدارندگی رشد هر چهار نوع باکتری است. در این زمینه بهترین شاخص باکتریایی، در مورد نانو TiO<sub>2</sub> آبروژینوزا و در مورد نانو CuO اشرشیاکلی است. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد، هر یک از نانوذرات در محدوده خاصی از غلظت می‌توانند مانع از رشد گونه خاصی از باکتری‌ها گردند. بنابراین نیاز به مطالعات بیشتری است

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد در محیط‌های جامد سمیت نانوذرات TiO<sub>2</sub> بیشتر از نانوذرات CuO است. هم‌چنین در بین چهار باکتری مورد آزمایش، اورئوس حساسیت بیشتری به این دو نانوذره نشان داد، بنابراین استفاده از آن به عنوان شاخص زیستی، نسبت به سه گونه باکتریایی دیگر ارجحیت دارد. در کاربرد نانوذرات به عنوان عوامل ضدباکتریایی، مشخص شد، نانو TiO<sub>2</sub> در غلظت‌های کمتری نسبت به CuO قادر به ۱۰۰٪ بازدارندگی رشد هر چهار نوع باکتری است. در این زمینه بهترین شاخص باکتریایی، در مورد نانو TiO<sub>2</sub> آبروژینوزا و در مورد نانو CuO اشرشیاکلی است. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد، هر یک از نانوذرات در محدوده خاصی از غلظت می‌توانند مانع از رشد گونه خاصی از باکتری‌ها گردند. بنابراین نیاز به مطالعات بیشتری است

در این مطالعه مشخص شد در محیط‌های جامد سمیت نانوذرات TiO<sub>2</sub> بیشتر از نانوذرات CuO است. هم‌چنین در بین چهار باکتری مورد آزمایش، اورئوس حساسیت بیشتری به این دو نانوذره نشان داد، بنابراین استفاده از آن به عنوان شاخص زیستی، نسبت به سه گونه باکتریایی دیگر ارجحیت دارد. در کاربرد نانوذرات به عنوان عوامل ضدباکتریایی، مشخص شد، نانو TiO<sub>2</sub> در غلظت‌های کمتری نسبت به CuO قادر به ۱۰۰٪ بازدارندگی رشد هر چهار نوع باکتری است. در این زمینه بهترین شاخص باکتریایی، در مورد نانو TiO<sub>2</sub> آبروژینوزا و در مورد نانو CuO اشرشیاکلی است. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد، هر یک از نانوذرات در محدوده خاصی از غلظت می‌توانند مانع از رشد گونه خاصی از باکتری‌ها گردند. بنابراین نیاز به مطالعات بیشتری است

در این مطالعه مشخص شد در محیط‌های جامد سمیت نانوذرات TiO<sub>2</sub> بیشتر از نانوذرات CuO است. هم‌چنین در بین چهار باکتری مورد آزمایش، اورئوس حساسیت بیشتری به این دو نانوذره نشان داد، بنابراین استفاده از آن به عنوان شاخص زیستی، نسبت به سه گونه باکتریایی دیگر ارجحیت دارد. در کاربرد نانوذرات به عنوان عوامل ضدباکتریایی، مشخص شد، نانو TiO<sub>2</sub> در غلظت‌های کمتری نسبت به CuO قادر به ۱۰۰٪ بازدارندگی رشد هر چهار نوع باکتری است. در این زمینه بهترین شاخص باکتریایی، در مورد نانو TiO<sub>2</sub> آبروژینوزا و در مورد نانو CuO اشرشیاکلی است. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد، هر یک از نانوذرات در محدوده خاصی از غلظت می‌توانند مانع از رشد گونه خاصی از باکتری‌ها گردند. بنابراین نیاز به مطالعات بیشتری است

در این مطالعه مشخص شد در محیط‌های جامد سمیت نانوذرات TiO<sub>2</sub> بیشتر از نانوذرات CuO است. هم‌چنین در بین چهار باکتری مورد آزمایش، اورئوس حساسیت بیشتری به این دو نانوذره نشان داد، بنابراین استفاده از آن به عنوان شاخص زیستی، نسبت به سه گونه باکتریایی دیگر ارجحیت دارد. در کاربرد نانوذرات به عنوان عوامل ضدباکتریایی، مشخص شد، نانو TiO<sub>2</sub> در غلظت‌های کمتری نسبت به CuO قادر به ۱۰۰٪ بازدارندگی رشد هر چهار نوع باکتری است. در این زمینه بهترین شاخص باکتریایی، در مورد نانو TiO<sub>2</sub> آبروژینوزا و در مورد نانو CuO اشرشیاکلی است. هم‌چنین نتایج این مطالعه نشان داد، هر یک از نانوذرات در محدوده خاصی از غلظت می‌توانند مانع از رشد گونه خاصی از باکتری‌ها گردند. بنابراین نیاز به مطالعات بیشتری است

که این ویژگی در مواردی مثل تصفیه مایعات و همچنین کاربردهای دارویی و درمانی به کار گرفته شوند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از طرح با عنوان "سمیت نانوذرات CuO و  $TiO_2$  بر روی باکتری های رایج در لجن فاضلاب شهری و قدرت گندزدایی این ترکیبات در محیط های جامد" در مقطع دکترا در سال ۱۳۹۰ و کد ۲۹۱۰۶۲ است که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی اصفهان اجرا شده است.



## منابع

1. Bang SH, Le TH, Lee SK, Kim P, Kim JS. Min J. Toxicity Assessment of Titanium (IV) Oxide Nanoparticles Using *Daphnia magna* (Water Flea). *Environmental Health and Toxicology*. 2011;DOI: 10.5620/eht.2011.26.e2011002.
2. Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. *Water Research*. 2006;40(19):3527-32.
3. Gabbay J, Borkow G, Mishal J, Magen E, Zatcoff R, Shemer-Avni Y. Copper oxide impregnated textiles with potent biocidal activities. *Journal of Industrial Textiles*. 2006;35(1):323-35.
4. Cox C. Cromated copper arsenate. *Journal of Pesticide Reform*. 1991;11(2):2-6.
5. Jones CF, Grainger DW. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61(6):438-56.
6. Barbu E, Moln RV, Tsibouklis J, Grecki DC. The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood-brain barrier. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2009;6(6):553-65.
7. Bystrzejewska-Piotrowska G, Golimowski J, Urban PL. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*. 2009;29(9):2587-95.
8. Naddafi K, Zare M. R, Nazmara S. Investigating potential toxicity of phenanthrene adsorbed to nano-ZnO using *Daphnia magna*. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 2011;93:729-37.
9. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*. 2006;311(3):622-27.
10. Zhu X, Zhu L, Chen Y, Tian S. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *Journal of Nanoparticle Research*. 2009;11(3):67-75.
11. Wang J, Zhang X, Chen Y, Sommerfeld M, Hu Q. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*. 2008;73(7):1121-28.
12. Federici G, Shaw BJ, Handy RD. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*. 2007;84:415-30.
13. Sawai J, Igarashi H, Hashimoto A, Kokugan T, Shimizu M. Effect of ceramic powders on spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Chemistry English-Japan*. 1995;(28):288-93.
14. Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier HC, Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. 2008;71(7):1308-16.
15. Brayner R, Ferrari-Iliou R, Brivois N, Djediat S, Benedetti MF, Fievet F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*. 2006;6:866-70.
16. Baveye P, Laba M. Aggregation and toxicology of titanium dioxide nanoparticles. *Environmental Health Perspective*. 2008;116:152-58.
17. APHA, AWWA, WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st ed. Washington DC: American Public Health Association; 2005.
18. Betty A, Daniel FS, Alice S. Bailey & Scott's *Diagnostic Microbiology*. 12th ed. USA: Mosby Elsevier; 2007.
19. Jones N. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;279(1):71-76.
20. Rincon AG, Pulgarin C. Bactericidal action of illuminated TiO<sub>2</sub> on pure *Escherichia coli* and natural bacterial consortia: post-irradiation events in the dark and assessment of the effective disinfection time. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2004;49(2):99-112.

## Comparison of CuO and TiO<sub>2</sub> Nanoparticles toxicity and Antibacterial Properties in the Solid Media

Bijan Bina<sup>1</sup>, Mohamadmahdi Amin<sup>1</sup>, \*Mohamadreza Zare<sup>1</sup>, Ali Fatehizadeh<sup>2</sup>, Mohsen Mohseni<sup>3</sup>, Mahdi Zare<sup>4</sup>, Ali Toulabi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Engineering Health, Faculty of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

<sup>2</sup>Department of Environmental Engineering Health, Faculty of Health, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran

<sup>3</sup>Department of Occupational Health, Faculty of Health, Hormozgan University of Medical Sciences, Hormozgan, Iran

<sup>4</sup>Department of Environmental Engineering Health, Faculty of Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Received; 25 August 2012 Accepted; 08 December 2012

### ABSTRACT

**Background and Objectives:** Toxicity assessment of material related to nanotechnology is necessary before excess development of this industry. On the other hand, specific characteristic of nanomaterials can be used in disinfection of other material. In this study toxicity and antibacterial properties of nano-TiO<sub>2</sub> and nano-CuO were investigated with four bacterial species in solid media.

**Material and Methods:** Stock suspension of nanoparticles (10g-TSS/L) was diluted using Muller Hinton Agar to achieve 5-6000mg-TSS/L concentration. We prepared three Petri dishes for each concentration and refined bacteria were cultured on these Petri dishes. After culturing of these bacteria on the media containing nanoparticles, growth inhibition was determined. According to this data, 50% growth inhibition (EC<sub>50</sub>), no observed effect concentration (NOEC) and 100% growth inhibition were determined.

**Results:** Our results showed that toxicity of TiO<sub>2</sub> is more than CuO in solid media. In this regard, nano-TiO<sub>2</sub> EC<sub>50</sub> for Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, and Pseudomonas aeruginosa was calculated 181, 571, 93 and 933mg-TSS/L respectively. These figures for nano-TiO<sub>2</sub> were 2550, 1609, 946, and 1231mg-TSS/L respectively.

**Conclusion:** This study showed that compared with other bacteria studied, E. aureus due to high sensitivity and E. coli due to high resistance to both TiO<sub>2</sub> and CuO nanoparticles are more proper as bioindicator in toxicity test and antibacterial test respectively.

**Keywords:** Nanoparticle, Nano CuO, Nano TiO<sub>2</sub>, Bacterium, E. coli, Toxicity

---

\*Corresponding Author: zaremohammad1363@yahoo.com

Tel: +98 21 883563 Fax: +98 21 82883825