Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 9:42 CEST on Monday April 14th 2014

مجله سلامت و محیط، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران
دوره ششم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۲، صفحات ۱۶۷ تا ۱۷۶

مقایسه سمیت و اثرات ضدباکتریایی نانوذرات CuO و TiO_2 در محیط‌کشت جامد

بیژن بینا[۱]، محمدمهدی امین[۲]، محمدرضا زارع[۳]، علی فاتحی‌زاده[۴]، سید محسن محسنی[۵]، مهدی زارع[۶]، علی طولابی[۷]

دریافت: ۹۱/۰۶/۰۴ پذیرش: ۹۱/۰۹/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: *بررسی سمیت مواد مربوط به علم نانوتکنولوژی 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 نانو CuO با استفاده از چهار گونه باکتریایی در محیط‌های جامد مورد بررسی قرار گرفته است.*

روش بررسی: *محلول استوک نانوذرات (۱۰ g-TSS/L) توسط محیط کشت مولر هینتون آگار رقیق شد تا غلظت‌های ۶۰۰۰ mg-TSS/L –۵ از آن به دست آید. از هریک 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 آیروژینوزا به ترتیب mg-TSS/L ۱۸۱، ۵۷۱، ۹۳ و ۹۳۳ محاسبه شد. در حالی که این اعداد برای نانو CuO به ترتیب برابر با mg-TSS/L ۲۵۵۰، ۱۶۰۹، ۹۴۶ و ۱۲۳۱ 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
zaremohammad1363@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)

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 9:42 CEST on Monday April 14th 2014

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 می شود (۳و۴). با وجود این که منافع نانو مواد، انکارناپذیر است اما باید توجه داشت که چنین کاردبرد 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 (۸-۶). اما بیشتر مطالعاتی که سمیت اکسیدهای فلزی نانوذرات را مورد بررسی قرار داده‌اند، از ارگانیسم‌هایی هم‌چون سلول‌های انسانی (۹)، سخت پوستان (۱۰)، آلگ‌ها (۱۱)، و ماهی‌ها (۱۲) استفاده کرده اند. هم‌چنین در مطالعات زیادی نیز اثر این نانوذرات بر روی میکروارگانیسم‌ها بررسی شده است(۲،۳،۷و۱۳) 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 نانوذره ای 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 عمدتا 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 (۱۵و۱۶)، 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 میکروارگانیسم واحد نیز صورت گرفته‌اند، در نتایج دارای اختلافات زیادی هستند، این اختلافات عمدتا به دلیل تفاوت‌های ژنتیکی و فردی موجودات استفاده شده، تفاوت در شرایط شیمیایی محیط کشت، خواص نانوذرات و تفاوت در روش‌های تهیه نانوذرات است (۲و۸). 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 عمدتا 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 باکتری‌هادر 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.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 9:42 CEST on Monday April 14th 2014

مواد و روش‌ها

مشخصات نانوذرات CuO و TiO_2 استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است. جهت انجام آزمایشات ابتدا سوسپانسیون استوک از این نانوذرات به مدت min ۳۰ در دستگاه التراسونیک (Bandelin Sonorex RK 31 H) با دمای ^0C ۶۵ قرار گرفت و سپس در تهیه غلظت‌های مورد نظر استفاده شد.

طبق رهنمودهای استاندارد متد 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، محلول‌استوک (۱۰g-TSS/L) با محیط کشت مولرهینتون آگار (MHA) رقیق شد و ۱۴ غلظت از نانوذرات در محدوده تا mg-TSS/L ۶۰۰۰- 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 h ۴۸ - ۲۴ در دمای ^0C ۳۷ و تشکیل کلنی، گونه‌های باکتریایی جداسازی شدند و شناسایی شدند. جهت تشخیص افتراقی و شناسایی باکتری ها، 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 (۵-۶۰۰۰mg-TSS/L) کشت داده شدند. میزان باکتری‌های تلقیح شده در هر ظرف به حدود CFU ۲۰۰ 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 دوزـ 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 (۹۳۳mg-TSS/L) و استافیلوکوک اورئوس (۹۳mg-TSS/L) حاصل شد. درمورد نانو CuO جدول ۳ نشان می‌دهد که بیشترین و کمترین مقادیر این پارامتر به ترتیب مربوط به باکتری‌های اشرشیاکلی (۲۲۵۰mg-TSS/L) و

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

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 9:42 CEST on Monday April 14th 2014

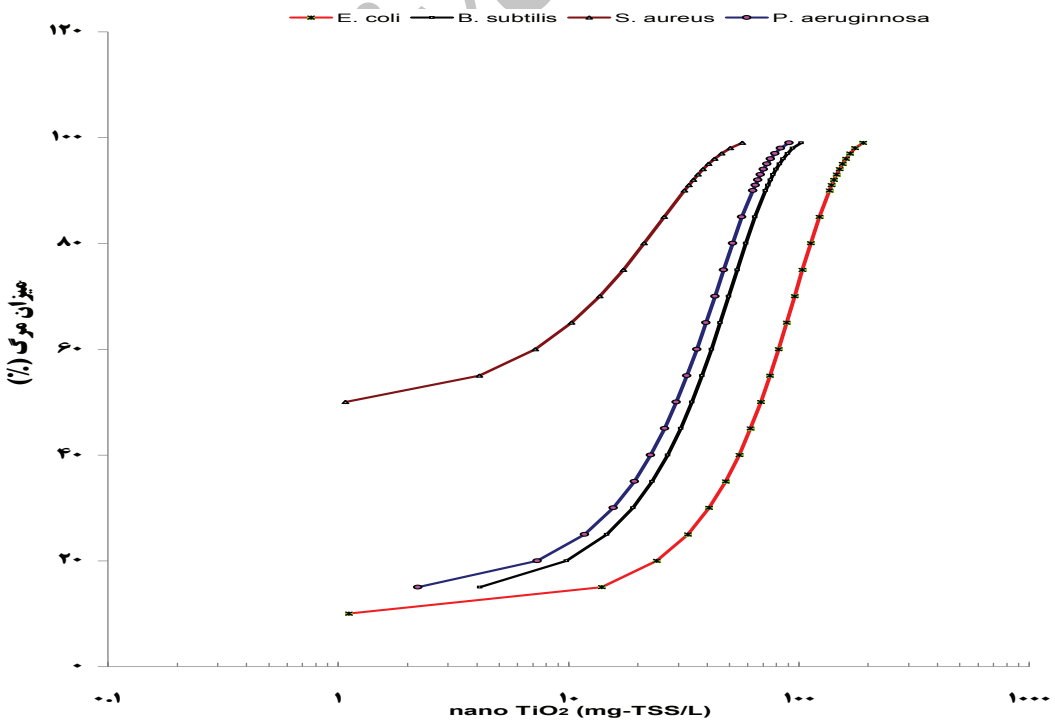
جدول ۲: میزان EC_{50} و NOEC نانوذرات TiO_2 با استفاده از باکتری‌های مختلف

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

استافیلوکوک اورئوس (۹۴۶mg-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 درمورد CuO این پارامتر از ۱۹۵ mg-TSS/L (درمورد استافیلوکوک اورئوس) تا ۲۸۸ mg-TSS/L (درمورد اشرشیاکلی) متغیر است.

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

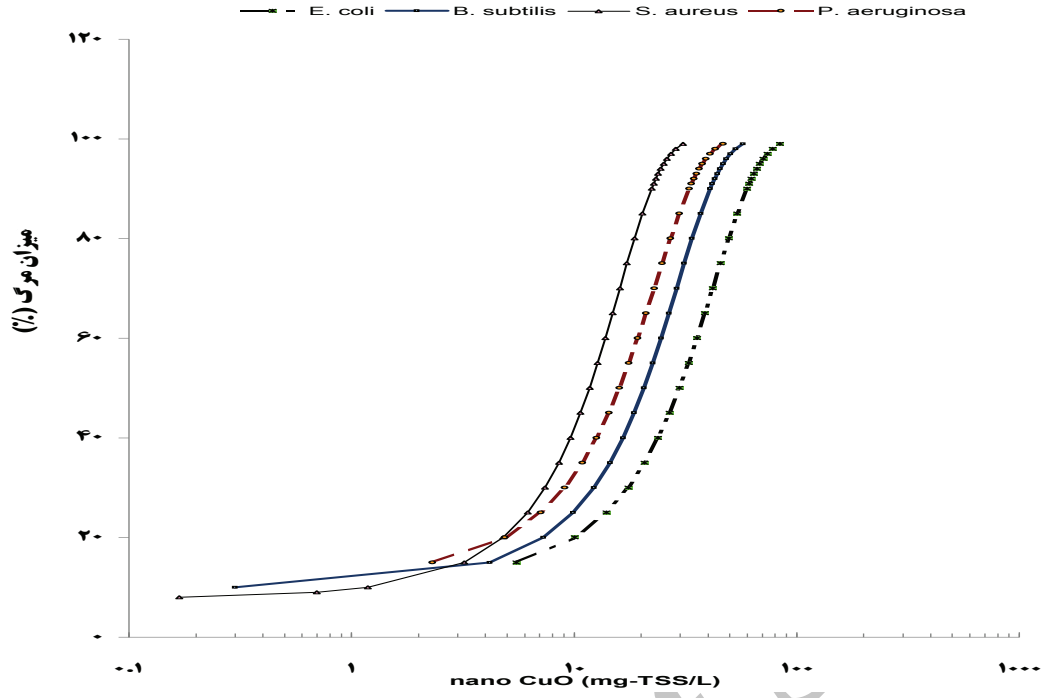
آنالیز پروبیت داده‌های خام حاصل از میزان بازدارندگی رشد را تحلیل می‌کند و میزان بازدارندگی رشد را در غلظت‌های مختلف با حدود اطمینان‌های مختلف محاسبه می‌کند. بنابراین از این اطلاعات جهت رسم نمودارهای دوز- پاسخ استفاده شد. در واقع آنالیز پروبیت با محاسبه حدود اطمینان‌های مختلف، بهترین خطی را که گویای میزان بازدارندگی رشد در غلظت‌های مختلف است را به دست می‌دهد و از این رو می‌توان گفت شکل ۱ و۲، 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.



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

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 9:42 CEST on Monday April 14th 2014



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

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 آیروژینوزا در غلظت‌های بیشتری از نانو 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. درمورد حساس‌ترین باکتری به این دو نانوذره مقایسه شکل‌های ۱ و ۲ نشان می‌دهد که استافیلوکوک اورئوس در مقاسه با سایر باکتری‌ها نسبت به هر دو نانوذره حساس‌ترین باکتری است.

قدرت ضد باکتریایی

در این مطالعه جهت بررسی قدرت ضدباکتریایی نانوذرات، غلظت موردنیاز جهت از بین بردن ۱۰۰٪ باکتری‌ها توسط آنالیز پروبیت محاسبه شد (جدول ۳). در این بخش نتایج نشان داد به کاربردن غلظت g-TSS/L ۲/۶ از نانوذرات TiO_2 و g-TSS/L ۶/۷ 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 نانو TiO_2 جهت ۱۰۰٪ بازدارندگی

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

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

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 9:42 CEST on Monday April 14th 2014

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

باکتری	غلظت نانو TiO_2	غلظت نانو CuO
اشرشیاکلی	۵۳۶	۶۶۵۳
استافیلوکوک اورئوس	۳۵۹	۲۳۱۰
سودوموناس آیروژینوزا	۲۵۹۷	۲۹۶۲
باسیلوس سوبتیلیس	۱۶۸۳	۴۰۱۴

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_2 است، بنابراین اگر این نتایج قابل تعمیم به دیگر جاندارن از جمله انسان بود، می‌توان گفت در کاربرد TiO_2 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_{50} نانوTiO_2 با استفاده از باکتری ویبریو فیشری بیش از mg-TSS/L ۲۰۰۰۰ به دست آمد، در حالی که این مقدار برای نانوCuO برابر با mg-TSS/L ۷۹ 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 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 mg-TSS/L ۳۹۵ از نانوذرات TiO_2 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 mg-TSS/L ۱۶۸۳ 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 ازجمله 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_{50}ها نشان داد که در مورد هر

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 9:42 CEST on Monday April 14th 2014

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_2 و CuO و Al_2O_3 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_2 و CuO در این مطالعه، مشخص شد که در غلظت های 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، می توان 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، آیروژینوزا در مورد نانوTiO_2 و اشرشیاکلی در مورد نانو CuO به عنوان شاخص می‌توانند، عمل کنند.

در خصوص سمیت و قدرت ضدباکتریایی نانوذرات در محیط‌های جامد و با استفاده از چند باکتری مطالعات کمی صورت گرفته است. در تحقیقی که اثر پودر سرامیک (نانو ZnO) در محیط مایع بررسی شد، محققان نتیجه گرفتند که استافیلوکوک اورئوس گرم مثبت دارای مقاومت کمتری نسبت به اشرشیاکلی گرم منفی است(۱۳). این نتیجه با نتایج این تحقیق نیز مطابقت دارد، اما نمی‌توان گفت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی همواره ضعیف‌ترند. به‌طوری که نتایج جدول ۲ نشان می‌دهند، در این مطالعه اثبات شد در محیط‌های جامد، باسیلوس سوبتیلیس گرم مثبت نسبت به اشرشیاکلی گرم منفی مقاومت بیشتری به نانوTiO_2 دارد.

در مطالعه دیگری که محققان سمیت نانوTiO_2 را در محیط آبی مورد بررسی قرار دادند، نتیجه گرفتند که باکتری‌های گرم مثبت همواره مقاومت بیشتری به این نانوذره دارند و دلیل عمده آن به توانایی تشکیل اسپور و ساختار دیواره سلولی ارتباط داده شده بود (۲۰).

در این مطالعه که میزان بازدارندگی رشد چهار نوع باکتری، با استفاده از دو نانوذره مورد بررسی قرار گرفت، اثبات شد که نوع گرم مثبت و گرم منفی بودن تاثیر چندانی بر میزان مقاومت ندارد.

نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد در محیط‌های جامد سمیت نانوذرات TiO_2 بیشتر از نانوذرات CuO است. هم‌چنین در بین چهار باکتری مورد آزمایش، ا. ورئوس 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، نانوTiO_2 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_2 آیروژینوزا و درمورد نانوCuO 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

Archive of SID
www.SID.ir

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.

Archive of SID

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 9:42 CEST on Monday April 14th 2014

www.SID.ir

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 9:42 CEST on Monday April 14th 2014

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 TiO2, SiO2, 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 Bacillussubtilis. 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 TiO2 to bacteria Vibrio fisch+eri 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 TiO2 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Comparison of CuO and TiO_2 Nanoparticles toxicity and Antibacterial Properties in the Solid Media

Bijan Bina[1], Mohamadmahdi Amin[1], *Mohamadreza Zare[1], Ali Fatehizadeh[2], Mohsen Mohseni[3], Mahdi Zare4, Ali Toulabi[5]

[1]Department of Environmental Engineering Health, Faculty of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

[2]Department of Environmental Engineering Health, Faculty of Health, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran

[3]Department of Occupational Health, Faculty of Health, Hormozgan University of Medical Sciences, Hormozgan, Iran

[4]Department of Environmental Engineering Health, Faculty of Health, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Received; 25 August 2012 Accepted; 08 December 2012

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ at 9:42 CEST on Monday April 14th 2014

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_2 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_{50}), no observed effect concentration (NOEC) and 100% growth inhibition were determined.

Results: Our results showed that toxicity of TiO_2 is more than CuO in solid media. In this regard, nano-TiO_2 EC_{50} 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_2 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_2 and CuO nanoparticles are more proper as bioindicator in toxicity test and antibacterial test respectively.

Keywords: Nanoparticle, Nano CuO, Nano TiO_2, Bacterium, E. coli, Toxicity

*Corresponding Author: *zaremohammad1363@yahoo.com*
Tel: +98 21 883563 ***Fax***: +98 21 82883825

Archive of SID

www.SID.ir