

Investigation of the Antibacterial Effect of Cement Matrix Containing Zinc Oxide Nanoparticles on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*

A. Khaghani Boroujeni¹, H. Madani², Sh. Shakeri³

1. MSc, Department of Civil Engineering, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
2. Assist. Prof., Department of Civil Engineering, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
3. Assist. Prof., PhD of Microbiology, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
(Corresponding Author) sh.shakeri@kgut.ac.ir

(Received Jan. 23, 2017 Accepted Aug. 6, 2017)

To cite this article :

Khaghani Boroujeni, A., Madani, H., Shakeri, Sh., 2018, "Determining the antibacterial effect of cement matrix containing zinc oxide nanoparticles on *Bacillus cereus* and *pseudomonas aeruginosa*." *Journal of Water and Wastewater*, 29 (4), 88-100. Doi: 10.22093/wwj. 2017.74045.2331 (In Persian)

Abstract

Some of the nanoparticles such as zinc oxide have a significant antibacterial activity that can be used in removal of pathogenic organisms in certain water resources application. This study was specifically undertaken to investigate the use of cement matrix modified with Zinc oxide nanoparticles to prevent the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. The results showed that ZnO nanoparticles with the size lower than 20 nm were dispersed well in the cement matrix. Results also showed that inhibitory effect against gram-negative bacterium of *Pseudomonas aeruginosa* was higher than gram-positive bacterium of *Bacillus cereus*. Also, confinement of ZnO nanoparticles by cement materials reduced the photocatalytic activity slightly. Based on the preparation of antibacterial formulation of cement matrix containing ZnO nanoparticles, concrete surfaces with ZnO nanoparticles can be used in a wide range of aquatic environments for prevention of pathogenic bacterial growth.

Keywords: Pathogenic Bacteria, Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles, Cement Matrix, Antibacterial Activity, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*.

بررسی خاصیت آنتی باکتریال مواد پایه سیمانی حاوی نانوذرات اکسیدروی بر روی باکتری‌های باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینوزا

امیر خاقانی بروجنی^۱، سید حسام مدنی^۲، شهریار شاکری^۳

۱- کارشناس ارشد سازه، دانشکده عمران و نقشه‌برداری، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
۲- استادیار، دکترای سازه، دانشکده عمران و نقشه‌برداری، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
۳- استادیار، دکترای میکروبیولوژی، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی،
دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
(نویسنده مسئول) sh.shakeri@kgut.ac.ir

پدیرش ۹۶/۵/۱۵ (دریافت ۹۵/۱۱/۴)

برای ارجاع به این مقاله به صورت زیر اقدام بفرمایید:

خاقانی بروجنی، ا.، مدنی، س.ح.، شاکری، ش.، ۱۳۹۷، "بررسی خاصیت آنتی باکتریال مواد پایه سیمانی حاوی نانوذرات اکسید روی بر روی باکتری‌های باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینوزا" مجله آب و فاضلاب، ۲۹(۴)، ۱۰۰-۸۸. Doi: 10.22093/wwj.2017.74045.2331

چکیده

رشد سریع باکتری‌های پاتوژن در سیستم‌های آبی منجر به بروز مشکلاتی پیچیده و جدی می‌شود که رفع آنها نیاز به صرف وقت و هزینه زیادی دارد. اکسید نانوذرات روی، فعالیت آنتی باکتریال قابل توجهی دارند و می‌توان از این پتانسیل بالقوه برای حذف باکتری‌های پاتوژن استفاده کرد. در این پژوهش از نانوذرات اکسید روی در فرمولاسیون سیمان استفاده شد و سپس فعالیت فوتوکاتالیستی آنها به منظور جلوگیری از رشد باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده، نانوذرات اکسید روی با اندازه کمتر از ۲۰ نانومتر در ماتریس سیمان به خوبی قرار گرفت و اثر مہاری قابل توجهی بر روی رشد دو باکتری مورد بررسی داشت. نتایج همچنین نشان داد که رشد باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا بیشتر از باکتری گرم مثبت باسیلوس سرئوس مہار شده بود. همچنین محصورشدگی نانوذرات اکسید روی توسط ماتریس مواد پایه سیمانی، به میزان کمی سبب کاهش فعالیت فوتوکاتالیستی آنها شده بود. با توجه به تهیه فرمولاسیون ضد باکتری ماتریس سیمان حاوی نانوذرات اکسید روی، می‌توان از این سطوح سیمانی بهبود یافته با نانوذرات، در گستره وسیعی از محیط‌های آبی به منظور مہار رشد باکتری‌های پاتوژن استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های پاتوژن، نانوذرات اکسید روی، ماتریس سیمان، فعالیت آنتی باکتریال، باسیلوس سرئوس، سودوموناس آئروژینوزا

۱- مقدمه

سریع زندگی بشر و افزایش روزافزون آلودگی‌ها، کنترل میکروارگانیسم‌های مضر امری ضروری است (Eriksen et al., 2005). بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد برخی از اکسیدهای سرامیکی، اکسید کلسیم، اکسید منیزیم و

با توجه به این‌که طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها در تعادل با محیط زندگی انسان‌ها می‌باشند، رشد سریع و کنترل نشده آنها می‌تواند منجر به بروز مشکلاتی پیچیده و جدی شود که رفع آنها متحمل وقت و هزینه زیادی است. بر همین اساس با توجه به توسعه



یک جفت الکترون - حفره تولید می شود که قادر به القاء استرس اکسیداتیو از طریق تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) است (Malato et al., 2009) (شکل ۱).

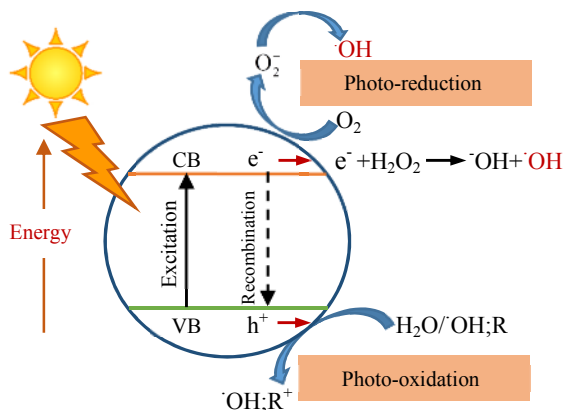


Fig. 1. Schematic diagram of oxidation reactions - reduction mechanism of photocatalytic nanomaterials

شکل ۱- مکانیسم شماتیک واکنش اکسایش-کاهش نانو مواد فوتوکاتالیستی

در این روش حفره مثبت با مولکول های بخار آب موجود بر روی سطح، واکنش داده و آب را اکسید می کند و آن را به رادیکال هیدروکسیل OH تبدیل می کند. از طرف دیگر الکترون موجود در بانده هدایت، با یک نوع گونه پذیرنده الکترون مثل اکسیژن، ترکیب شده و رادیکال سوپر اکسید تشکیل می دهد. با توجه به این که رادیکال هیدروکسیل (OH) و یون سوپر اکسید (O_2^-)، قدرت واکنش بسیار زیادی با انواع مواد آلی و آلاینده ها دارند، می توانند سبب تجزیه محدوده وسیعی از باکتری ها و پاتوژن ها شوند (Dunlop et al., 2002). در پژوهشی در سال ۲۰۱۶ به بررسی توانایی فوتوکاتالیستی نانو ساختارهای $AgBr-Ag_3PO_4$ بر روی حذف و تخریب رنگدانه ردامین B و باکتری گرم مثبت / استافیلوکوکوس اورئوس پرداخته شد؛ نتایج حاکی از توانایی بالای این نانو ساختارها در حذف رنگدانه ردامین B و باکتری / استافیلوکوکوس اورئوس بود، به گونه ای که حتی پس از پایان واکنش فوتوکاتالیستی مطابق آنچه پیش تر بیان شد، رشد مجدد باکتری ها در پایین ترین سطح ممکن بود (Padervand, 2016).

بر اساس همین فرایند برخی پژوهشگران، مکانیسم اصلی تخریب و تجزیه باکتری ها توسط نانو ذرات اکسید نیمه هادی

همچنین اکسید نانو ذراتی مانند روی و نقره فعالیت آنتی باکتریال قابل توجهی دارند که می توان از این پتانسیل بالقوه در راستای حذف باکتری ها، استفاده کرد (Tawale et al., 2010; Sondi and Salopek-Sondi, 2004).

خواص ضد میکروبی نقره و روی به طور سنتی از دیرباز شناخته شده و مورد تأیید است (He et al., 2011). برخی پژوهش ها نیز نشان داده اند که یون این گونه فلزات از طریق اتصال به گروه های تیول موجود در آنزیم ها، با پروتئین ها وارد واکنش شده و در نهایت سبب غیرفعال شدن پروتئین ها می شود. اگر این گونه فلزات در اندازه های بسیار کوچک موجود باشند، به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم، خواص ضد میکروبی و آنتی باکتریالی بهتری از خود نشان خواهند داد (Zhang et al., 2008). همچنین بررسی ها نشان می دهد استفاده از روش هایی همچون دوپ کردن نانو ذرات اکسید روی، باند انرژی را در آن ها کاهش می دهد و طیف گسترده تری از باکتری های گونه / شرشیاکلی، کلبسیلا پتومونیه و استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به نانو ذرات خالص اکسید روی از بین می رود (Hameed et al., 2016, Sehmi et al., 2016).

بر همین اساس پژوهش های گسترده ای در زمینه سم زدایی و تصفیه آب، فاضلاب و هوا از طریق واکنش های فوتوکاتالیست شیمیایی توسط این اکسیدهای فلزی انجام شده که نشان می دهد این روش، روشی کارآمد در از بین بردن باکتری ها و دیگر پاتوژن های خطرناک در محیط های آبی و اتمسفر است (Padervand, 2016).

(Bolashikov and Melikov, 2009, Zhang et al., 2010) واکنش فوتوکاتالیستی غیرهمگن ترکیبی از عوامل، خواص فرایندهایی نظیر انتقال الکترون، ساختار الکترونی، طول عمر حالت برانگیخته و جذب نور است. مهم ترین و اساسی ترین فرایند فوتوکاتالیستی غیرهمگن، برانگیختگی نوری یک نیمه هادی تحت تابش امواج الکترومغناطیس است. هنگامی که فوتون ها انرژی برابر یا بزرگ تر از باند انرژی داشته باشند، الکترون برانگیخته شده و از نوار ظرفیت به نوار هدایت منتقل می شود و به عنوان یک واسطه در فرایند انتقال بار میان دو مولکول عمل کرده و موجب آغاز واکنش فوتوکاتالیستی می شود. در نتیجه روند اکسایش-کاهش منجر به تشکیل اجزای فعال هم برای اکسایش (تولید حفره های مثبت (h^+) در باند ظرفیت) و هم برای کاهش (تولید الکترون (e^-) در باند هدایت) می شود. در واقع در طی فرایند واکنش های فوتوکاتالیستی



باکتری گرم منفی، هوازی و متحرک است و زیستگاه آن به طور وسیع در آب، خاک، گیاهان و حیوانات است (Costerton and Anwa, 1994) این باکتری به طور گسترده در طبیعت انتشار داشته و در محیط‌های مرطوب در بیمارستان‌ها شایع است (Chugani and Greenberg, 2007)

این ارگانیزم فرصت طلب به پوست و لایه‌های مخاطی بیماران بستری که دچار سوختگی‌های وسیع شده‌اند، متصل می‌شود و تشکیل کلنی می‌دهد و می‌تواند بیماری سیستمیک ایجاد کند.

از عمده علل انتخاب این دو باکتری در این پژوهش، حضور گسترده آنها در هر سه محیط خاک، آب و هوا می‌باشد که از بین بردن آنها در محیط‌های آبی از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف این پژوهش، استفاده از نانوذرات اکسید روی به عنوان نانوذره آنتی باکتریال در فرمولاسیون و ماتریس سیمان است؛ که این ماتریس علاوه بر ممانعت از رهاسازی نانوذرات در محیط‌های بهره‌برداری، عمر استفاده از خاصیت فوتوکاتالیستی در این سطوح را به میزان چشمگیری افزایش داده و عاملی در جهت تخریب و حذف باکتری‌های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و گرم مثبت باسیلوس سرئوس است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سنتز نانوذرات اکسیدروی

به منظور سنتز نانوذرات اکسیدروی (ZnO) در آزمایشگاه، از روش رسوب‌دهی شیمیایی استفاده شد. ابتدا دو گروه متشکل از محلول هیدروکسید سدیم (NaOH) و محلول نیترات روی ۶ آب (Zn(NO₃)₂ · 6H₂O) تهیه شد.

سپس این دو محلول با یکدیگر ترکیب شدند تا محصول حاصل از واکنش شیمیایی این دو محلول حاصل شود. در مرحله بعد به منظور خشک شدن آب فیزیکی، رسوبات تولید شده درون آون قرار گرفتند تا آب فیزیکی و ظاهری از سطح آنها خشک و برطرف شود. در نهایت به منظور خروج آب شیمیایی موجود در ساختار هیدروکسیدروی Zn(OH)₂ رسوبات خشک شده در مرحله قبل، درون کوره قرار گرفتند تا آب از ساختار شیمیایی آنها خارج شود (کلکسینه شوند) و محصول نهایی، نانوذرات اکسید روی (ZnO) حاصل شود.

(اکسیدروی) را آسیب به DNA، پروتئین و تخریب دیواره سلولی آنها می‌دانند (Heinlaan et al., 2008).

امروزه مواد پایه سیمانی قسمت عمده‌ای از محیط پیرامون افراد را تشکیل می‌دهند و این سطوح به طور مستقیم با آب، خاک و هوا در تماس‌اند. به نظر می‌رسد بتوان با بهره‌گیری از خاصیت فوتوکاتالیستی نانوذرات اکسید فلزی در این سطوح، آنها را به سطوح آنتی‌باکتریال تبدیل کرد و از این پتانسیل بالقوه در گستره وسیعی از محیط پیرامون، به منظور حذف باکتری‌ها استفاده کرد.

در این زمینه می‌توان به پژوهشی که بر روی سمیت پوشش‌های سیمانی حاوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم بر باکتری تیوباسیلوس تیوپاروس انجام شده است، اشاره کرد (Yousefi et al., 2015)

آنچه باعث نوآوری در این پژوهش شده است، استفاده از نانوذرات اکسید روی در محیط سیمان است. پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه بیشتر به عملکرد نانوذرات فوتوکاتالیستی به صورت واحد پرداخته‌اند. این در حالی است که گستره وسیعی از محیط پیرامون ما را سطوح پایه سیمانی تشکیل می‌دهند که می‌توان با بهره‌برداری از این سطوح علاوه بر ارتقاء کیفیت زندگی بشر و سایر موجودات، مانع از رهاسازی آنها در محیط زیست شد.

از طرف دیگر پژوهش‌هایی که در آن به بررسی سطوح پایه سیمانی حاوی نانوذرات فوتوکاتالیستی می‌پردازند، بیشتر از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیم استفاده کرده‌اند، این در حالی است که بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد، باند انرژی نانو اکسیدروی تقریباً مشابه با نانو دی‌اکسید تیتانیم است.

در نتیجه می‌توان انتظار داشت، ظرفیت فوتوکاتالیستی این دو نانوذره مشابه یکدیگر باشد. همچنین در برخی پژوهش‌ها نیز به تحرک الکترونی اکسید روی اشاره شده و بیان شده که نانوذرات فوتوکاتالیستی اکسیدروی گاهی دارای کارایی و فعالیت بیشتری نسبت به دی‌اکسید تیتانیم هستند (Li et al., 2012, Lizama et al., 2002, Khodja et al., 2001). بر همین اساس در این پژوهش از نانوذرات فوتوکاتالیستی اکسید روی در محیط مواد پایه سیمانی استفاده شد.

باکتری باسیلوس سرئوس، باسیل گرم مثبت بزرگ و هوازی در خاک، آب و هواست. این باکتری در انسان سبب مسمومیت غذایی، اسهال و استفراغ می‌شود. باکتری سودوموناس آئروژینوزا نیز



جدول ۱- آنالیز شیمیایی سیمان مصرفی در این پژوهش

Table 2. Chemical characteristics of cement used in this study

Compound	%
SiO ₂	23.1
Al ₂ O ₃	4.2
Fe ₂ O ₃	0.42
CaO	65.2
MgO	2.5
SO ₃	2
Na ₂ O	0.25
LOI	1.5
K ₂ O	0.35

اکسیدروی در آب تهیه شد و به مدت ۳۰ دقیقه با مگنت استیرر هم زده شد. سپس با استفاده از التراسونیک پراب دار با فرکانس ۱۵۰ کیلوهرتز به مدت ۳۰ دقیقه تحت امواج مافوق صوت قرار داده شدند تا نانو ذرات اکسیدروی کاملاً در محیط محلول پراکنده شوند. پس از این مرحله سریعاً نانو ذرات اکسیدروی پراکنده شده در محیط آب، به سیمان مصرفی افزوده شدند.

۷-۲- مواد پایه سیمانی

در این پژوهش از چهار طرح اختلاط با درصد جایگزینی متفاوت نانو ذرات اکسید روی استفاده شد. آزمون‌های سیمانی مورد استفاده در مدت زمان آزمایش، به نحوی قالب‌گیری شدند که سطح مقطع در تماس با محیط پیرامون آن در حدود ۹/۶ سانتی‌متر مربع باشد (جدول ۲).

جدول ۲- نسبت‌های طرح اختلاط آزمون‌های سیمانی

Table 2. Concrete specimen mix design proportions

No.	Design	Concrete (g)	ZnO (g)	H ₂ O (g)
1	Control	600	0	180
2	Z - 0.1	599.4	0.6	180
3	Z - 0.5	597	3	180
4	Z - 1	594	6	180

۷-۲-۱- نحوه اختلاط آزمون‌های سیمانی

به منظور اطمینان از اختلاط مناسب و پخش همگن نانو ذرات سوسپانسیون شده (پراکنده شده) در محیط آزمون سیمانی، پس از تهیه سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی مطابق آنچه پیش‌تر بیان شد، محلول حاوی نانو ذرات طی یک دقیقه به سیمان مصرفی درون جام مخلوط‌کن اضافه شد و به صورت دستی با آن مخلوط شد.

۲-۲- آنالیز پراش اشعه ایکس^۱

به منظور بررسی و تشخیص نوع، فاز و خصوصیات ساختار بلوری نانو ذرات اکسیدروی سنتز شده، آنالیز پراش اشعه ایکس بر روی آن صورت گرفت. برای انجام این آزمایش از دستگاه XRD مدل Philips X'Pert Pro تولید شرکت Philips استفاده شد. آنالیزها در محدوده زاویه ۲۰ تا ۸۰ درجه با افزایش گام برابر ۰/۰۲ برای ۲θ انجام شد.

۳-۲- بررسی میکروسکوپ الکترونی روبشی^۲

به منظور بررسی ابعاد نانو ذرات اکسید روی سنتز شده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل EM3200 استفاده شد.

۴-۲- محاسبه اندازه متوسط بلورهای نانو ذرات اکسیدروی

برای محاسبه اندازه متوسط بلورها بر اساس داده‌های نمودار پراش اشعه ایکس از معادله شرر استفاده شد

$$\tau = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

که در این معادله

τ اندازه متوسط بلور بر حسب نانومتر، K ضریب شکل بلور، λ طول موج تیوب تولیدکننده پرتو ایکس (تشنش $k\alpha$ مس برابر ۰/۱۵۴ بود)، β پهنای پیک در نصف ارتفاع بیشینه (FWHM، بر حسب درجه که به واحد طول تبدیل شد)، θ زاویه پراش بر حسب درجه است.

۵-۲- سیمان مصرفی

به منظور انجام آزمایش‌ها از سیمان با رده مقاومتی W-۵۲/۵ استفاده شد. آنالیز شیمیایی ذرات سیمان در جدول ۱ نمایش داده شده است.

۶-۲- تهیه فرمولاسیون مواد پایه سیمانی حاوی نانو ذرات

اکسید روی

به منظور ایجاد مخلوطی همگن با پراکندگی مناسب نانو ذرات در محیط سیمان، سوسپانسیونی حاوی غلظت‌های مختلف نانو ذرات

¹ Xray Diffraction (XRD)

² Scanning Electron Microscop (SEM)



۲-۹- تهیه سوسپانسیون نانوذرات اکسیدروی در محیط

به منظور بررسی عملکرد محصورشدگی نانوذرات اکسیدروی توسط ماتریس سیمانی، سوسپانسیونی از نانوذرات اکسیدروی در سه غلظت متفاوت تهیه شد. برای تحقق این هدف مقادیر متفاوت از نانوذرات سوسپانسیون شده در محیط کشت باکتری به نحوی انتخاب شد که با مقادیر نانوذرات جایگزین شده در ماتریس آزمون سیمانی یکسان باشد. با این کار علاوه بر بررسی عملکرد نانوذرات پراکنده شده در محیط کشت، می توان میزان کاهش خاصیت فوتوکاتالیستی نانوذرات اکسیدروی ناشی از اثرات محصورشدگی توسط ماتریس سیمان را نیز بررسی کرد.

۲-۱۰- شرایط انکوباسیون

پس از تهیه و آماده سازی محیط کشت و افزودن آزمون های سیمانی حاوی نانوذرات اکسیدروی و نانوذرات پودری به درون فالكون ها، تلقیح باکتری ها نیز در شرایط استریل و زیر هود انجام شد. سپس فالكون های حاوی محیط کشت و باکتری تلقیح شده معادل نیم مک فارلند یا $10^8 \times 1/5$ تعداد سلول، در داخل شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و در نهایت رشد باکتری ها مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور انجام فرایند اکسیداسیون توسط نانوذرات اکسیدروی نیز از لامپ ۸ وات UV-A در شیکر انکوباتور استفاده شد. به منظور تعیین درصد حذف باکتری ها توسط آزمون های سیمانی حاوی نانوذرات اکسیدروی و همچنین جلوگیری از رشد باکتری ها در محیط کشت، از معادله ۲ استفاده شد

$$C = \frac{C - T}{C} \times 100 \quad (2)$$

که در آن C کنترل، T تیمار است.

۲-۱۱- اندازه گیری رشد باکتریایی

به منظور اندازه گیری رشد باکتری ها از روش تعیین چگالی سلولی بر اساس جذب نوری کشت میکربی (OD_{600}) استفاده شد. برای اندازه گیری میزان کدورت محیط به عنوان معیاری از میزان رشد سلول باکتریایی، از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده شد. به این منظور ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون کشت میکربی برداشته شد و در دور ۱۰۰۰۰ rpm، به مدت زمان ۱۵ دقیقه

سپس اختلاط مکانیکی توسط مخلوطکن به مدت دو دقیقه و با سرعت کم (140 ± 5 دور در دقیقه) انجام شد.

پس از این مرحله عمل اختلاط مکانیکی متوقف شد و در طی ۳۰ ثانیه خمیره سیمانی از اطراف جام مخلوطکن جمع آوری شد و مجدداً در طی سه دقیقه عمل اختلاط به وسیله مخلوطکن و در سرعت متوسط (285 ± 10 دور در دقیقه) انجام شد. سپس در مدت یک دقیقه خمیره های سیمانی درون قالب هایی که از پیش تهیه و آماده شده بودند، قالب گیری شدند و به مدت ۲۴ ساعت درون اتاق رطوبت نگاه داشته شدند.

آزمون های سیمانی پس از خروج از درون قالب ها، به مدت ۲۸ روز در زیر آب عمل آوری شدند و به منظور بررسی خاصیت آنتی باکتریال مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۸- محیط کشت های باکتریایی

به منظور بررسی اثرات مواد پایه سیمانی حاوی نانوذرات اکسیدروی بر میکروارگانیسم های گرم مثبت باسیلوس سرئوس و گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا، از محیط کشت نوترینت برات استفاده شد. برای تهیه این محیط کشت، ابتدا ۱۳ گرم از پودر نوترینت برات ساخت شرکت مرک^۱ درون ارلن ریخته شد و با استفاده از آب مقطر، حجم آن به یک لیتر رسانده شد. سپس ارلن به مدت ۱۰ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد تا پودر نوترینت برات به طور کامل در محیط آب مقطر حل شود.

پس از این مرحله به منظور استریل کردن محیط کشت، ارلن حاوی محیط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ بار اتوکلاو شد. در نهایت ۱۰ سی سی از محیط آماده سازی شده به همراه آزمون سیمانی مورد بررسی، حاوی مقادیر متفاوتی از نانوذرات اکسیدروی، درون فالكون اتوکلاو شد. نمونه ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، دور ۱۵۰ rpm و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

از آزمون های سیمانی فاقد نانوذرات اکسیدروی به همراه باکتری ها و همچنین درصدهای متفاوت از نانوذرات به صورت سوسپانسیون در محیط نوترینت برات بدون حضور آزمون های سیمانی و همراه با باکتری به عنوان کنترل استفاده شد.

¹ Merck



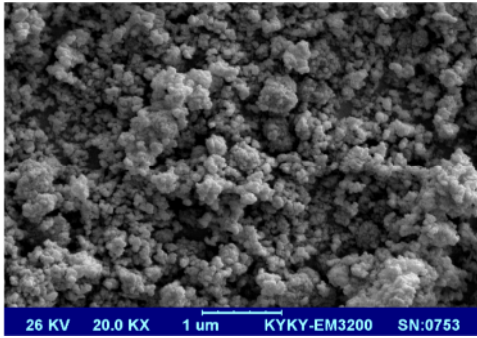


Fig. 3. Monomodal and spherical shape of the ZnO nanoparticles observed in scanning electron microscope image

شکل ۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانو ذرات سنتز شده اکسیدروی. نانوذرات اکسید روی، به صورت کروی و یکنواخت

بررسی‌های صورت گرفته با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM بیانگر سنتز نانوذرات اکسید روی به شکل کروی با ابعاد کمتر از ۲۰ نانومتر بود (شکل ۳).

تعیین اندازه متوسط ساختار بلوری نانوذرات اکسید روی بر اساس رابطه شرر و نتایج آنالیز پراش اشعه ایکس نیز حاکی از سنتز نانوذراتی با اندازه بلورین حدود ۱۷/۷۶ بود.

همان‌طور که پیش‌تر نیز بیان شد، نانوذرات اکسید روی به منظور فعالیت اکسیداسیون نیاز به حداقل انرژی دارند که این حداقل انرژی با توجه به باند انرژی هر نانوذره مشخص می‌شود. مطابق پژوهش‌های صورت گرفته برای نانوذرات اکسید روی، میزان انرژی لازم برای گذر الکترون از باند انرژی برابر ۳/۳ الکترون‌ولت در نظر گرفته شده است (Dutta, 2016).

در نتیجه بر اساس معادلات ۳ تا ۵ اقدام به محاسبه طول موج مورد نیاز برای آغاز فعالیت اکسیداسیون نانو ذرات مصرفی شد

$$E = h\nu \quad (3)$$

$$C_i = v\lambda_i \quad (4)$$

$$E = h(C/\lambda) \quad (5)$$

که در آن

E انرژی لازم برای برانگیختگی الکترون بر حسب ژول، V فرکانس بر حسب هرتز بر ثانیه، h ثابت پلانک (6.63×10^{-34})

سانتریفیوژ شد. سپس باکتری در ۱ میلی‌لیتر از فسفات بافرسالیین سوسپانسیون شده و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نمونه‌ها قرائت شد. از فسفات بافرسالیین به عنوان شاهد برای صفر کردن دستگاه استفاده شد.

لازم به ذکر است در این پژوهش برای محاسبه درصد کاهش باکتری‌ها بعد از حذف فوتوکاتالیستی، علاوه بر روش اسپکتروفتومتری، سوسپانسیون باکتری‌ها در بافر فسفات نمکی تا ۵ برابر رقت، تهیه شد و سپس کشت بر روی محیط نوترینت آگار انجام گرفت. لذا بعد از شمارش باکتری‌ها و محاسبه تعداد باکتری‌های زنده در سوسپانسیون با توجه به عکس سریال رقت، درصد کاهش محاسبه شده در این روش، با روش قبلی منطبق بود.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- سنتز نانو ذرات اکسیدروی

بررسی‌های صورت گرفته با استفاده از آنالیز XRD و SEM بر روی نانو ذرات تولیدشده بیانگر سنتز مناسب نانو ذرات اکسید روی بود.

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، نانوذرات اکسید روی دارای پیک‌های بلندی است که بیانگر تشکیل مناسب ساختار بلوری نانوذرات است. همچنین بررسی‌های صورت گرفته به کمک نرم‌افزار Xpert نشان‌دهنده انطباق مناسب پیک‌های موجود با الگوهای مرجع موجود در نرم‌افزار بود.

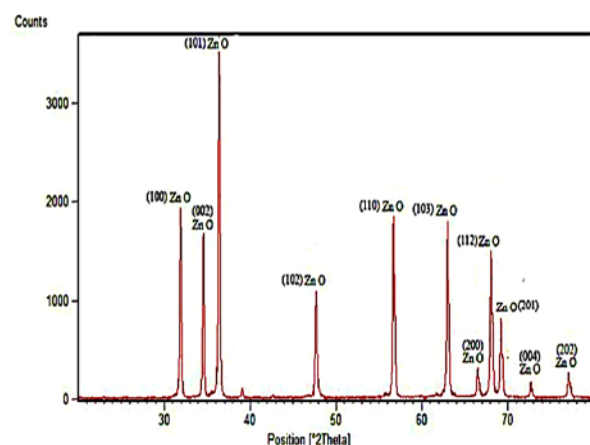


Fig. 2. XRD diffractogram for ZnO nanoparticles. Note: size of nanoparticles was < 20 nm

شکل ۲- نمودار پراش اشعه ایکس نانو اکسید روی. اندازه ذرات توسط این روش کمتر از ۲۰ نانومتر



در پی آن افزایش بازده فعالیت فوتوکاتالیستی در نانوذرات می شود به طوری که قادر است، درصد بیشتری از باکتری های موجود در محیط کشت را تخریب و تجزیه نمایند که علت این پدیده را می توان افزایش واکنش های اکسیداسیون و در پی آن تولید رادیکال های آزاد (OH) بیشتر دانست.

همان طور که در شکل ۵ و ۶ مشاهده می شود سوسپانسیون نانوذرات اکسید روی در محیط کشت نسبت به آزمون های سیمانی حاوی نانوذرات اکسید روی از خاصیت آنتی باکتریال بیشتری برخوردار است و مقادیر بیشتری از باکتری های موجود در محیط

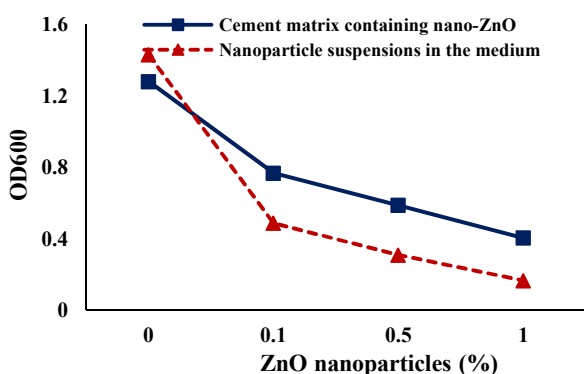


Fig. 5. Growth inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* in culture medium by cement based materials containing ZnO nanoparticles and suspension of free ZnO nanoparticles

شکل ۵- مهار رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت به وسیله مواد پایه سیمانی حاوی نانو ذرات و سوسپانسیون آزاد نانوذرات اکسید روی

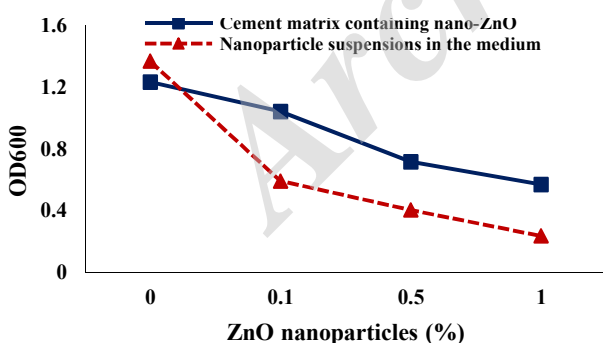


Fig. 6. Growth inhibition of *Bacillus cereus* in culture medium by cement based materials containing ZnO nanoparticles and suspension of free ZnO nanoparticles

شکل ۶- مهار رشد باکتری باسیلوس سرئوس در محیط کشت به وسیله مواد پایه سیمانی حاوی نانو ذرات و سوسپانسیون آزاد نانوذرات اکسید روی

ژول در ثانیه)، C سرعت نور (3×10^8 متر بر ثانیه، در خلأ)، λ طول موج بر حسب متر است. لذا میزان فرکانس تابشی مورد نیاز به منظور برانگیختگی الکترون در نانوذرات اکسید روی بر اساس معادلات ۴ تا ۵ برابر 377 nm به دست آمد.

بر اساس نتایج بالا برای فعال شدن نانو ذرات اکسید روی نیاز به تابشی با طول موج در حدود 377 نانومتر است که این طول موج بر اساس جدول ۳ در محدوده طول موج UV-A قرار می گیرد که در گروه پرتوهای تابشی بی ضرر طبقه بندی می شود (Soltz et al., 2008). به همین دلیل در این پژوهش از این طول موج در دستگاه شیکر انکوباتور استفاده شد.

جدول ۳- تعیین طول موج و انرژی تابش های مختلف

(Soltz et al., 2008)

Table 3. Determination of different radiation wavelength and energy (Soltz et al., 2008)

No.	Radiation (Em)	λ (nm)	Energy (ev)
1	UV- C	100-280	4.43-12.4
2	UV- B	280-315	3.94-4.43
3	UV- A	315-380	3.3-3.94
4	(Visible light)	380-780	1.6-3.3

۳-۲- ساخت آزمون سیمانی حاوی نانوذرات اکسید روی

در این پژوهش از آزمون سیمانی مطابق شکل و ابعاد شکل ۴ استفاده شد.



Fig. 4. Photo view of concrete specimen used in this study

شکل ۴- آزمون سیمانی مورد بررسی

۳-۳- تأثیر آزمون سیمانی حاوی نانوذرات اکسید روی بر مهار رشد باکتری ها

نتایج به دست آمده نشان می دهد افزایش مقدار نانوذرات اکسید روی (اکسیدکننده) در محیط کشت، سبب افزایش فعالیت نوری و



پایه سیمانی حاوی نانوذرات اکسیدروی و سوسپانسیون نانوذرات در محیط کشت نشان داده شده است. همان طور که پیش تر نیز بیان شد سوسپانسیون نانوذرات در محیط کشت از خاصیت آنتی باکتریال بالاتری برخوردار است. به طوری که در محیط کشت حاوی ۱ درصد نانو اکسید روی در حالت سوسپانسیون شده نانوذرات، حدود ۹۱ درصد و در آزمون سیمانی حاوی ۱ درصد نانو اکسید روی، حدود ۸۰ درصد از میزان باکتری *Sudomonas آئروژینوزا* کاسته شده است. همین بررسی بر روی باکتری *باسیلوس سرئوس* نیز انجام شد، نتایج بیانگر حذف حدود ۸۴ درصد باکتری توسط سوسپانسیون نانوذرات و حدود ۶۱ درصد توسط آزمون سیمانی حاوی نانو اکسید روی بود. به طور کلی قدرت مهار رشد باکتری *Sudomonas آئروژینوزا* و *باسیلوس سرئوس* در سوسپانسیون نانوذرات اکسید روی نسبت به حالتی که درون ماتریس سیمانی قرار دارند به ترتیب ۱۲ و ۲۷ درصد بیشتر بود که نشان دهنده قابلیت بیشتر نانوذرات اکسید روی سوسپانسیون شده در حذف باکتری های مورد بررسی است. در این پژوهش آزمون های سیمانی بدون نانوذرات و آزمون های سیمانی حاوی نانوذرات اکسید روی در همان آغاز مرحله تلقیح باکتری ها به همراه محیط کشت نوترینت برات در داخل محیط مایع قرار گرفتند و *انکوباسیون* در شرایط یکسان به مدت ۲۴ ساعت همراه با آزمون ها انجام شد. با توجه به تعداد یکسان باکتری های تلقیح شده در هر لوله آزمایش، در لوله ای که آزمون سیمانی بدون نانو ذرات وجود داشت به دلیل عدم اثر مهاری، باکتری ها بیشتر رشد کرده بودند. اما در لوله ای که آزمون سیمانی حاوی نانوذرات اکسید روی قرار داشت، رشد باکتری ها به طور معنی داری مهار شده بود، به این معنی که از افزایش تعداد سلول ها جلوگیری شده بود و به این صورت درصد مهار و کاهش باکتری ها با توجه به کنترل محاسبه شد. نکته مهم دیگر در این مراحل آن است که اگر بعد از ۲۴ ساعت از تلقیح باکتری ها به محیط کشت، آزمون های سیمانی در این محیط قرار می گرفتند، با توجه به بالا بودن تعداد سلول های باکتری در محیط مایع و تخریب آنها توسط فرایند فوتوکاتالیستی، روش اسپکتروفتومتری با خطا همراه بود. حال آن که به منظور اطمینان بیشتر، کشت باکتری ها و شمارش سلول ها در محیط نوترینت آگار نیز انجام گرفت. نتایج بیانگر عملکرد مطلوب تر نانوذرات اکسید روی در حذف باکتری گرم منفی *Sudomonas* نسبت به باکتری گرم

کشت را تخریب می کند و به این ترتیب از میزان کدورت محیط به میزان بیشتری کاسته می شود. با افزایش درصد حضور نانوذرات اکسید روی در محیط سیمان و سوسپانسیون آزاد، سطوح با خاصیت فوتوکاتالیستی در آنها افزایش یافته و خاصیت اکسیداسیون در آنها به مراتب بیشتر می شود که این پدیده را می توان به وضوح در افزایش قدرت کشندگی باکتری ها توسط نانوذرات در شکل های ۵ و ۶ نیز مشاهده کرد. در شکل های ۷ و ۸ درصد حذف باکتری *Sudomonas آئروژینوزا* و *باسیلوس سرئوس* توسط مواد

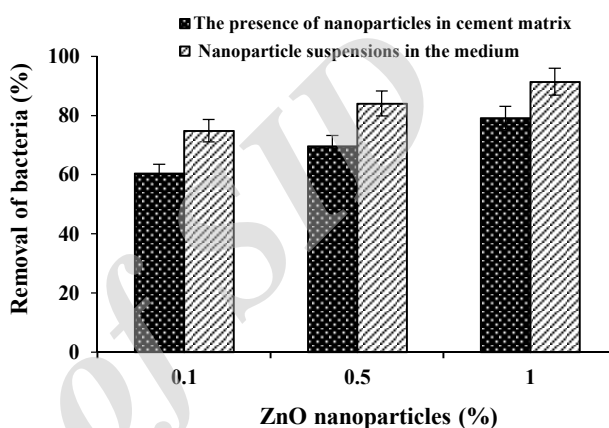


Fig. 7. Comparison of *Pseudomonas* strain percent removal by free nanoparticles in culture medium and loaded in cement matrix

شکل ۷- مقایسه درصد حذف باکتری *Sudomonas* در حضور نانو ذرات آزاد در محیط کشت و در ماتریس سیمان

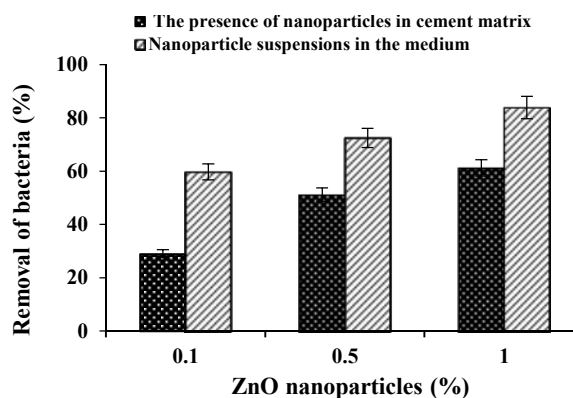


Fig. 8. Comparison of *Bacillus* strain percent removal by free nanoparticles in culture medium and loaded in cement matrix

شکل ۸- مقایسه درصد حذف باکتری *باسیلوس* در حضور نانو ذرات آزاد در محیط کشت و در ماتریس سیمان



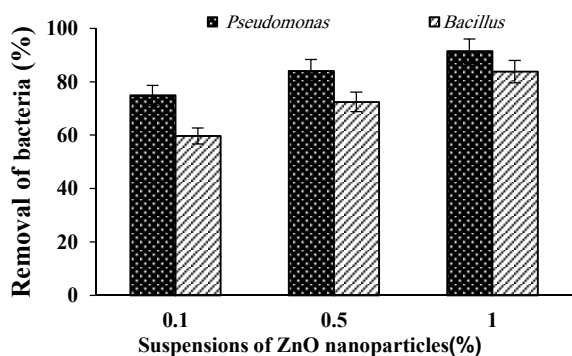


Fig. 10. Comparison of bacterial percent removal for *Bacillus* and *Pseudomonas* by free suspension of ZnO nanoparticles

شکل ۱۰- مقایسه درصد حذف باکتری باسیلوس و سودوموناس به وسیله سوسپانسیون آزاد نانو ذرات اکسیدروی

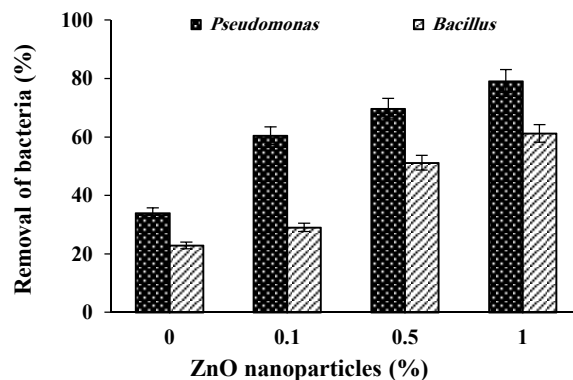


Fig. 9. Comparison of bacterial percent removal for *Bacillus* and *Pseudomonas* by cement matrix containing ZnO nanoparticles

شکل ۹- مقایسه درصد حذف باکتری باسیلوس و سودوموناس به وسیله مواد پایه سیمانی حاوی نانو اکسیدروی

در این پژوهش، سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی در محیط کشت نسبت به نمونه های سیمانی حاوی نانو ذرات اکسید روی از خاصیت آنتی باکتریال بالاتری برخوردار بودند؛ به طوری که توانستند مقادیر بیشتری از باکتری های موجود در محیط کشت را کشته و تخریب نمایند و از میزان کدورت محیط به میزان بیشتری بکاهند. دلیل این پدیده را می توان ناشی از جایگاه های فعال بیشتر در سطح نانوکاتالیست ها دانست. به طوری که در حالت سوسپانسیون، درصد نانو ذرات بیشتری می توانند در معرض تابش فوتون های نورانی قرار گیرند. در نتیجه راندمان واکنش فوتوکاتالیستی توسط نانو ذرات در حالت سوسپانسیون شده در محیط کشت به شدت افزایش یافته و به میزان بیشتری سبب حذف باکتری از محیط کشت می شوند؛ و این در حالی است که قرارگیری نانو ذرات اکسید روی در ماتریس سیمان و در پی آن اثرات محصور شدگی توسط نمونه سیمانی سبب کاهش فعالیت فوتوکاتالیستی نانو ذرات شده است. همچنین باکتری های گرم منفی مثل سودوموناس آئروژینوزا دارای یک دیواره نازک تر از باکتری های گرم مثبت مثل باسیلوس سرئوس می باشند. دیواره سلولی در باکتری های گرم مثبت از چندین لایه پپتیدوگلیکان تشکیل شده است که تعداد این لایه ها نسبت به دیواره گرم منفی ها بسیار بیشتر است و از این رو مقاومت دیواره گرم مثبت ها نسبت به شرایط استرس بسیار بیشتر از باکتری های گرم منفی است. بر همین اساس نانو ذرات اکسید روی با اثر بهتر بر روی دیواره گرم منفی ها

مثبت باسیلوس بود. به طوری که در شکل های ۹ و ۱۰، نانو ذرات اکسیدروی در هر دو حالت حضور در مواد پایه سیمانی و سوسپانسیون در محیط کشت، از قابلیت بالاتری در حذف باکتری گرم منفی سودوموناس برخوردار بودند. همان طور که در شکل ۹ مشاهده می شود، استفاده از نمونه سیمانی حاوی ۰/۵ درصد نانو اکسید روی در محیط کشت باکتریایی، سبب حذف باکتری باسیلوس سرئوس به میزان ۵۱ درصد و حذف باکتری سودوموناس آئروژینوزا به میزان ۷۰ درصد شده است. به عبارت دیگر قدرت مواد پایه سیمانی حاوی ۰/۵ درصد نانو ذرات اکسید روی در حذف باکتری باسیلوس سرئوس، نسبت به سودوموناس آئروژینوزا ۲۷ درصد کمتر است. بررسی نتایج به دست آمده از شکل ۱۰ نیز بیانگر عملکرد مناسب سوسپانسیون نانو ذرات در محیط کشت باکتریایی است. به طوری که در محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد سوسپانسیون نانو ذرات اکسید روی، باکتری باسیلوس سرئوس و سودوموناس آئروژینوزا هر یک به ترتیب سبب حذف ۷۲ و ۸۴ درصد از باکتری های موجود در محیط شدند. به عبارت دیگر قدرت مواد پایه سیمانی حاوی ۰/۵ درصد نانو ذرات اکسید روی در حذف باکتری باسیلوس سرئوس نسبت به سودوموناس آئروژینوزا ۱۴ درصد کمتر است. به طور کلی نتایج حاصل از شکل های ۹ و ۱۰ بیانگر عملکرد بهتر نانو ذرات اکسید روی در تخریب و اضمحلال باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا است.



فعالیت فوتوکاتالیستی آن‌ها می‌شود؛ اما از آن جا که محصورشدگی نانوذرات اکسید روی توسط ماتریس سیمان، مانع از رهاسازی آن‌ها در محیط می‌شود، می‌توان انتظار داشت عمر بهره‌برداری از نانوذرات مصرفی نیز به میزان چشمگیری افزایش یابد. در نتیجه می‌توان بدون نگرانی از رهاسازی نانوذرات در محیط از این سطوح در گستره وسیعی از محیط‌های با خطر حضور آلودگی‌های باکتریال، استفاده کرد.

۴- نتیجه‌گیری

بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد نانوذرات اکسید روی با بهره‌گیری از خاصیت اکسیداتیو، قدرت بالایی در تخریب و حذف باکتری سودوموناس آئروژینوزا و باسیلوس سرئوس دارند. به طوری که با قرار دادن این نانوذرات در ماتریس سیمان می‌توان علاوه بر ایجاد سطوح پایه سیمانی با خاصیت آنتی باکتریال، از رهاسازی آن‌ها در محیط زیست جلوگیری کرد و عمر بهره‌برداری از آن‌ها را به میزان قابل توجهی افزایش داد. همچنین پژوهش‌های انجام شده بیانگر قدرت بالای مواد پایه سیمانی حاوی نانوذرات اکسید روی در تخریب باکتری‌های مورد بررسی بوده است. افزایش درصد نانوذرات در ماتریس سیمان، سبب افزایش خواص فوتوکاتالیستی در این سطوح و بهبود عملکرد آن در باکتری‌های مورد بررسی می‌شود. بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش بیشترین اثربخشی نانوذرات در حالت سوسپانسیون و بر روی باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا بوده که با قرارگیری نانوذرات در ماتریس سیمان از عملکرد آن کاسته شده ولی این کاهش در مقابل اثرات مطلوب این محصورشدگی که پیش‌تر بیان شد، قابل چشم‌پوشی است.

و تخریب این دیواره سبب جلوگیری از رشد آن‌ها می‌شوند (Madigan et al., 1997). البته با توجه به پیچیده‌تر بودن ساختار دیواره باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت و مقاومت بیشتر این باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان اظهار داشت که حذف این باکتری‌ها و یا جلوگیری از رشد آن‌ها در سیستم‌های آبی مثل سیستم آب و فاضلاب با کمک پوشش‌های پایه سیمانی حاوی نانوذرات اکسید روی می‌تواند مفید باشد.

در برخی پژوهش‌ها به منظور پراکندگی بهتر نانوذرات در مخلوط سیمان، ابتدا نانوذرات با آب مخلوط شده و سپس به مخلوط سیمان اضافه شده است (Husken et al., 2009).

همچنین پژوهش‌های صورت گرفته نشان می‌دهند زمانی که نانوذرات در فاز آبی پراکنده می‌شوند، اندازه کلوخه‌های آن‌ها به مراتب بزرگ‌تر از اندازه اولیه می‌شود. لیکن لازم است از برخی روش‌های مکانیکی برای پخش بهتر نانوذرات استفاده شود. یکی از مؤثرترین این روش‌ها استفاده از امواج التراسونیک است (Bagheri et al., 2013). ایجاد امواج التراسونیک در سوسپانسیون ذرات معلق نانومتری، روشی مؤثر در حذف کلوخه‌ها است. در این روش، زمانی که التراسونیک به محلول اعمال می‌شود، حباب‌هایی در مقیاس میکرو درون محلول ایجاد می‌شود.

در پالس‌های رفت و برگشتی امواج التراسونیک، این حباب‌ها می‌ترکند و این ترکیدن منجر به افزایش فشار در آن نقطه می‌شود. شوک حاصل از ترکیدن موجب خرد شدن و از هم جدا شدن ذرات آگلومره شده که در نهایت باعث پخش شدن بهتر ذرات می‌شود (Sauter et al., 2008).

بر اساس نتایج به دست آمده، محصورشدگی نانوذرات اکسید روی توسط ماتریس مواد پایه سیمانی به میزان کمی سبب کاهش

References

- Bagheri, A., Parhizkar, T., Madani, H. & Raisghasemi, A. M. 2013. The influence of different preparation methods on the aggregation status of pyrogenic nanosilicas used in concrete. *Materials and Structures*, 46 (1-2), 135-143.
- Bolashikov, Z. D. & Melikov, A. K. 2009. Methods for air cleaning and protection of building occupants from airborne pathogens. *Building and Environment*, 44(7), 1378-1385.
- Chugani, S. & Greenberg, E. P. 2007. The influence of human respiratory epithelia on *Pseudomonas aeruginosa* gene expression. *Microbial Pathogenesis*, 42(1), 29-35.



- Costerton, J. W. & Anwar, H. 1994. *Pseudomonas aeruginosa*: The microbe and pathogen. *Infectious Disease and Therapy Series* 12, 1.
- Dunlop, P. S. M., Byrne, J. A., Manga, N. & Eiggins, B. R. 2002. The photocatalytic removal of bacterial pollutants from drinking water. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 148(1), 355-363.
- Dutta, D. 2016. Optimization of process parameters and its effect on particle size and morphology of ZnO nanoparticle synthesized by sol-gel method. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 77(1), 48-56.
- Eriksen, H. M., Iversen, B. G. & Aavitsland, P. 2005. Prevalence of nosocomial infections in hospitals in Norway, 2002 and 2003. *Journal of Hospital Infection*, 60(1), 40-45.
- Hameed, A.S.H., Karthikeyan, C., Ahamed, A.P., Thajuddin, N., Alharbi, N.S., Alharbi, S.A. & Ravi, G. 2016. In vitro antibacterial activity of ZnO and Nd doped ZnO nanoparticles against ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 6, Article No. 24312.
- He, L., Yang, L., Mustapha, A. & Mengshi Lin, M. 2011. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological Research*, 166(3), 207-215.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Irina Dubourguier, H. C. & Kahru, A., 2008, Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71(7), 1308-1316.
- Hüsken, G., Hunger, M. & Brouwers, H. J. H. 2009. Experimental study of photocatalytic concrete products for air purification. *Building and Environment*, 44(12), 2463-2474.
- Khodja, A. A., Sehili, T., Pilichowski, J. F. & Boule, P. 2001. Photocatalytic degradation of 2-phenylphenol on TiO₂ and ZnO in aqueous suspensions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 141(2), 231-239.
- Li, B., Liu, T., Wang, Y. & Wang, Z. 2012. ZnO/graphene-oxide nanocomposite with remarkably enhanced visible-light-driven photocatalytic performance. *Journal of Colloid and Interface Science*, 377(1), 114-121.
- Lizama, C., Freer, J., Baeza, J. & Mansilla, H. D. 2002. Optimized photodegradation of reactive blue 19 on TiO₂ and ZnO suspensions. *Catalysis Today*, 76(2), 235-246.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Jack Parker, J. 1997. *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.
- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P. Maldonado, M. I. Blanco, J. & Gernjak, W. 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147(1), 1-59.
- Padervand, M. 2016a. Facile synthesis of the novel Ag [1-butyl 3-methyl imidazolium] Br nanospheres for efficient photodisinfection of wastewaters. *Chemical Engineering Communications*, 203(11), 1532-1537.
- Padervand, M. 2016b. Ionic liquid mediated synthesis of AgBr-Ag₃PO₄ nanostructures as highly efficient visible-light photocatalysts. *Materials Research Innovation*, 21(5), 279-285.
- Sauter, C., Emin, M. A., Schuchmann, H. P. & Tavman, S. 2008. Influence of hydrostatic pressure and sound amplitude on the ultrasound induced dispersion and de-agglomeration of nanoparticles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4), 517-523.
- Sehmi, S.K., Noimark, S., Pike, S.D., Bear, J.C., Peveler, W.J., Williams, C.K., et al. 2016. Enhancing the antibacterial activity of light-activated surfaces containing crystal violet and ZnO nanoparticles: Investigation



- of nanoparticle size, capping ligand, and dopants. *ACS Omega*, 1(3), 334-343.
- Soltz, R., Soltz, B.A. & Behrens, A. 2008. *Wearable photoactivator for ocular therapeutic applications and uses thereof*. U.S. Patent Application 12/236,986, The Johns Hopkins University, USA.
- Sondi, I. & Salopek-Sondi, B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177-182.
- Tawale, J. S., Dey, K. K., Pasricha, R., Sood, K. N. & Srivastava, A. K. 2010. Synthesis and characterization of ZnO tetrapods for optical and antibacterial applications. *Thin Solid Films*, 519(3), 1244-1247.
- Yousefi, A., Hejazi, P. & Allahverdi, A. 2015. Toxicity of the cementitious coatings containing nano-TiO₂ Towards *Thiobacillus Thioparus Bacterium*. *Institute for Color Science and Technology*, 9(2), 101-111.
- Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Daskalakis, N., Jeuken, L., Povey, M., O'Neill, A.J. & York, D.W. 2010. "Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1625-1636.
- Zhang, L., Ding, Y., Povey, M. & York, D. 2008. ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent. *Progress in Natural Science*, 18(8), 939-944.

