



## تعیین و مقایسه تاثیر نانوذرات $\text{ZnO}$ و $\text{TiO}_2$ ، $\text{CuO}$ در حذف باکتریهای گرم مثبت و منفی از فاضلاب شهری

نویسندگان: محمد ملکوتیان \* علی طولابی \*\*

\*نویسنده مسئول: استاد بهداشت محیط دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی کرمان تلفن ۰۳۴۱-۳۲۲۰۰۸۲

Email: [m.malakootian@yahoo.com](mailto:m.malakootian@yahoo.com)

\*\*دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان

### چکیده

**سابقه و اهداف:** به علت خاصیت بی نظیر جذبی و ضد میکروبی نانوذرات استفاده از آنها در حذف باکتریها از آب و فاضلاب رو به گسترش است. درجه تاثیر پذیری این مواد در حذف باکتریهای موجود در فاضلاب شهری موضوع قابل اهمیتی است که در این تحقیق به آن پرداخته شده است.

**روش بررسی:** پژوهش مقطعی است، نمونه برداری در بازه زمانی تابستان لغایت پاییز ۸۹ از ورودی فاضلاب شهر کرمان به تصفیه خانه بعمل آمد. نمونه ها در محیط های کشت نوترینت آگار کشت داده شد سپس ۱۸۰ محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شد. غلظت های مختلف نانوذرات با نسبت ۱/۱۰ روی محیطهای کشت حاوی باکتری تزریق شد و پس از انکوبه کردن بر اساس کاهش تعداد کلنی های رشد کرده بر روی محیط کشت، میزان CFU در هر میلی لیتر گزارش شد. آزمایشات بر اساس روشهای ذکر شده در کتاب استانداردهای آب و فاضلاب انجام گرفت.

**یافته ها:** غلظت بدون اثر بازدارنده (NOEC) برای نانوذرات  $\text{ZnO}$  بر باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلاهی به ترتیب ۵، ۷، ۹۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر بود و در غلظت ۶۰۰۰ mg/L کلیه باکتریها ۱۰۰٪ حذف شدند. غلظت بدون اثر بازدارندگی برای نانوذرات  $\text{CuO}$  به ترتیب برای باکتری های ذکر شده ۵، ۷، ۹۰ و ۹۸ میلی گرم در لیتر بود. در غلظت ۶۰۰۰ mg/L باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروژینوزا ۱۰۰٪ و اشرشیاکلاهی ۹۲٪ حذف مشاهده شد. همچنین غلظت بدون اثر بازدارنده برای نانوذره تیتانیوم ۲ اکسید به ترتیب ۵، ۹۰، ۹۵ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر بود و در غلظت ۶۰۰۰ mg/l باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس ۹۶٪، باسیلوس سوبتیلیس ۸۱٪، سودوموناس آئروژینوزا ۸۹٪ و اشرشیاکلاهی ۴۳٪ حذف انجام شد.

**نتیجه گیری:** طبق نتایج بدست آمده با افزایش غلظت نانوذرات درصد حذف باکتری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ). تاثیر نانوذرات  $\text{ZnO}$  بر روی باکتریهای گرم مثبت و منفی بیشتر از نانوذرات  $\text{TiO}_2$  و  $\text{CuO}$  بود. لذا نیاز است توجه اقتصادی و دیگر عوامل دخیل در کاربرد نانوذرات مورد بررسی قرار گیرد تا در صورت امکان از این روش جهت حذف عوامل بیماریزای باکتریایی موجود در فاضلاب استفاده گردد.

**واژه های کلیدی:** نانوذرات، باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، فاضلاب شهری

## طلوع بهداشت

فصلنامه علمی پژوهشی

دانشکده بهداشت یزد

سال نهم

شماره : دوم و سوم

تابستان و پاییز ۱۳۸۹

شماره مسلسل: ۲۹

تاریخ وصول: ۱۳۸۹/۱۰/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۱۷



## مقدمه

نانوذرات پرداختند، مطالعه آنها اطلاعاتی رادر مورد جنبه های مختلف سمیت اکولوژیکی نانوذرات با تاکید بر ZnO، TiO<sub>2</sub> و CuO فراهم آورد. همچنین در مطالعه دیگری که توسط مانیارد و همکاران در سال ۲۰۰۵ در کشور کره انجام شد نشان داده شد که بیوتست های مختلفی با استفاده از مهره داران، آلگک ها و باکتریها قادرند نسبت به سمیت نانوذرات حساسیت نشان دهند (۱۲، ۱۳). هرچند تاکنون مطالعاتی در زمینه میزان سمیت نانوذرات یا قدرت باکتری کشی این مواد صورت گرفته است اما از آنجا که ترکیب شیمیایی و فیزیکی فاضلاب ها نسبت به هر منطقه متفاوت است، لذا ضروری است که مطالعات گسترده و با فاضلاب شهرهای مختلف صورت گیرد تا اثرات میکروب کشی این مواد بهتر آشکار شود. مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان تاثیر پذیری باکتریهای گرم مثبت و منفی موجود در فاضلاب شهر کرمان با استفاده از نانوذرات TiO<sub>2</sub>، ZnO و CuO انجام شد.

## روش بررسی

پژوهش مقطعی است، نمونه برداری فاضلاب از ورودی فاضلاب خام به تصفیه خانه شهر کرمان به صورت متوالی دو روز یکبار از ساعت ۱۰ صبح الی ۱۲ ظهر در بازه زمانی تابستان لغایت پاییز ۱۳۸۹ انجام گرفت. مجموع نمونه های فاضلاب (۴۰ نمونه) در شرایط استاندارد، دمای ۴ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه پژوهشی دانشکده بهداشت کرمان منتقل گردید. جهت تهیه محیط کشت ۲۰ گرم از پودر نوترینت آگار (MERCK VM984550) را به یک لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از جوشاندن به روش اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۱ °C،

یکی از کاربردهای مهم نانوذرات، جذب آلاینده های موجود در آب و هوا توسط آنهاست. بسیاری از ذراتی که بصورت نانو ایجاد می شوند نسبت به حالت توده ای خواص کاتالیستی و جذبی بهتری از خود نشان می دهند(۱). استفاده از نانوذرات ZnO و TiO<sub>2</sub> برای حذف آلاینده های میکروبی از آب و فاضلاب در مقیاس وسیعی انجام گرفته و تداوم دارد(۲، ۳). مطالعه اثرات محیطی این مواد روی میکروارگانیسم ها و محیط زیست کاملاً ضروری است، چرا که بدون دانستن اثرات آنها در دوزهای مشخص امکان توسعه و ایجاد قوانین مدیریتی و استانداردهای مرتبط نیز مشکل است و در صورتیکه به آب و فاضلاب تخلیه گردند برای انسان و محیط زیست خطرناک می باشند، لذا در ارتباط با استفاده از آنها در حذف آلاینده ها و نهایتاً دفع آنها به محیط زیست باید مطالعات لازم انجام گیرد (۴، ۵، ۶، ۷). مکانیسم های اصلی تاثیر نانوذرات بر روی باکتریها از طریق آسیب به پروتئین، DNA و تخریب دیواره سلولی است (۸، ۹) که طبق مطالعات انجام شده، به دلیل خاصیت توکسیسیتی زیاد نانوذرات اگر این اثرات با نور تشدید گردد درصد تخریب بیشتر خواهد شد (۱۱، ۱۰). در مطالعه ای که توسط مونیکا مورتیمر و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در کشور استونی انجام گرفت، نشان داده شد که نانوذرات ZnO، TiO<sub>2</sub> و Ag قادر به حذف ۹۰/۶ تا ۹۹/۵ درصد آلاینده های میکروبی و شیمیایی فاضلاب می باشند (۵، ۹). آنه کاهرو و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در کشور استونی به بررسی تست های زیستی جهت تعیین سمیت اکولوژیکی اکسیدهای فلزی



ایجاد می نماید. سپس تا هنگام برابر شدن دانسیته نوری آن با محلول ۱ مک فارلند توسط محیط کشت مایع مولر هیتون برات رقیق سازی صورت گرفت سپس کدورت آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه گیری شد. بر اساس نسبت های رقیق سازی، مقدار میکروارگانیزم مورد نیاز تهیه گردید (۱۵، ۱۶). جهت تاثیر نانوذرات بر روی باکتریها، ۱۸۰ پلیت ۱۵ میلی لیتری حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار تحت شرایط استریل تهیه گردید. در حین سرد شدن محیط کشت مذکور در دمای ۶۰-۷۰ درجه سانتی گراد، نانوذرات استریل شده در غلظتهای مختلف به نسبت ۱/۱۰ با استفاده از پی پت استریل شده به آن اضافه گردید (۱ سی سی نانو ذره به ۱۰ سی سی محیط کشت)، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده حاوی باکتری تهیه شده در مرحله قبل روی هر کدام از پلیت های حاوی محیط کشت و نانو ذره با استفاده از لوپ استریل شده کشت داده شد. پس از انکوبه کردن بر اساس کاهش تعداد کلنی های رشد کرده بر روی محیط کشت میزان CFU در هر میلی لیتر گزارش و از طریق رسم منحنی درصد حذف محاسبه گردید. ضمنا در طول آزمایشات یک نمونه شاهد نیز به کار گرفته شد بدین صورت که تمام ویژگیهای نمونه های دیگر را دارا به استثنای اینکه به درون آن نانوذره اضافه نشد. کلیه آزمایشات بر اساس روشهای ذکر شده در کتاب استانداردهای آب و فاضلاب انجام گرفت. جهت آنالیز و تعیین ارتباط خاصیت ضد باکتریایی و غلظت نانوذرات، از آزمون آماری ضریب همبستگی پیرسن با استفاده از نرم افزار SPSS ver ۱۶ استفاده شد.

فشار psi ۱۵ به مدت ۱۵ دقیقه به عنوان محیط کشت عمومی آماده شد. نمونه های فاضلاب روی محیط کشت مذکور کشت داده شد. پس از انکوبه کردن در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت کلنی های رشد کرده بر روی محیط کشت مشخص شد. سپس یک لوپ از کلنی های مذکور روی محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد و پس از انکوبه کردن با استفاده از تستهای بیوشیمیایی باکتریهای موجود در نمونه شناسایی گردید. حداقل تعداد غلظت های مورد نیاز نانوذرات برای تعیین سمیت طبق استاندارد متد ۵ غلظت است که در این تحقیق جهت نتایج بهتر، ۱۴ غلظت (۶۰۰۰-۵۰۰۰-۴۰۰۰-۳۰۰۰-۲۰۰۰-۱۵۰۰-۱۲۵۰-۱۰۰۰-۷۵۰-۵۰۰-۲۵۰-۱۰۰-۱۰-۵ میلی گرم در لیتر) از هر نانوذره که مشخصات آنها در جدول شماره ۱ آمده است از شرکت نانو پارس لیمیا تهیه شد. علاوه بر اینکه اندازه نانو ذرات قبلا توسط شرکت مرک آلمان مشخص شده بود، جهت صحت بیشتر اندازه آنها مجددا با استفاده از تکنیک TEM (Transmission Electron Microscopy) مدل CamScan MV ۲۳۰۰ در دانشگاه تهران نیز تایید شد.

برای تهیه غلظتهای مذکور ابتدا سه محلول استوک (۱۰ گرم در لیتر) از هر نانوذره تهیه و تحت شرایط اتو کلاو استریل شدند. جهت تهیه کشت تازه و فعال سازی باکتریهای مورد نظر از محیط کشت مولر هیتون آگار (Merck، ۳۴ گرم در یک لیتر آب مقطر) استفاده شد (۱۴). یک لوپ از هر سویه میکروبی به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت مولر هیتون برات جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. کدورت ایجاد شده این سوسپانسیون دانسیته سلولی تقریباً  $3 \times 10^8$  سلول بر میلی لیتر



### یافته ها

باکتریها تشخیص داده شده

باکتریهای تشخیص داده شده حاصل از کشت نمونه های فاضلاب شهری مطابق جدول شماره ۲ می باشد.

### نانوذرات TiO<sub>2</sub>

غلظت بدون اثر بازدارنده (NOEC) برای نانوذره تیتانیوم ۲ اکسید بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای به ترتیب ۵، ۹۰، ۹۵ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر بدست آمد. درصد حذف باکتریهای گرم مثبت و منفی مورد مطالعه توسط نانوذرات تیتانیوم ۲ اکسید مطابق جدول شماره ۳ بدست آمد. در غلظت ۶۰۰۰ mg/L درصد حذف باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس ۹۶٪، باسیلوس سوبتیلیس ۸۱٪، سودوموناس آئروژینوزا ۸۹٪ و اشرشیاکلای ۴۳٪ مشاهده شد.

### نانوذرات ZnO

غلظت بدون اثر بازدارنده (NOEC) برای نانوذرات ZnO باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای به ترتیب ۵، ۵، ۸ و ۸۰

میلی گرم در لیتر بود مطابق جدول شماره ۴ در غلظت ۴۰۰۰ mg/L حذف کلیه باکتریهای مورد مطالعه بوسیله نانوذرات ZnO به صورت کامل انجام شد. در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر استافیلوکوکوس اورئوس بطور کامل حذف گردید، در مورد سایر باکتریها با همین غلظت، اشرشیاکلای، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۹۹٪، ۴۷٪ و ۳۷٪ حذف شدند.

### نانوذرات CuO

غلظت بدون اثر بازدارندگی برای نانو مس ۲ اکسید CuO بر باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای به ترتیب ۵، ۷، ۹۰ و ۹۸ میلی گرم در لیتر بود. مطابق نتایج جدول شماره ۵ حذف ۵۰ درصدی کلیه باکتریهای گرم مثبت و منفی در غلظت های حدود ۱۵۰۰ mg/L اتفاق افتاد. در غلظت ۳۰۰۰ mg/L استافیلوکوک اورئوس بطور کامل حذف شد و در همین غلظت، باسیلوس سوبتیلیس ۶۷٪، سودوموناس آئروژینوزا ۸۹٪ و اشرشیاکلای ۶۱٪ حذف را داشتند.

### جدول ۱: مشخصات نانو ذرات مورد استفاده

نانوذره	فرمول	شرکت سازنده	خلوص	nm اندازه	سطح ویژه
			%		m <sup>2</sup> /g
نانو تیتانیوم اکسید	TiO <sub>2</sub>	Merck	۹۹	۲۰	۴۰
نانو روی ۲ اکسید	ZnO	Merck	۹۹	۲۰	۹۰
نانو مس ۲ اکسید	CuO	Merck	۹۸	۶۰	۸۰



**جدول ۲: میزان و نوع باکتریهای تشخیص داده شده حاصل از کشت مجموع نمونه های فاضلاب شهری**

تعداد نمونه های حاوی باکتری مورد نظر	درصد نمونه های حاوی باکتری مورد نظر	گرم (مثبت و منفی)	باکتری
۴۰	۱۰۰	منفی	اشرشیاکلی
۲۸	۷۲	مثبت	باسیلوس سوبتلیس
۳۵	۸۷	مثبت	استافیلوکوکوس
			ارئوس
۴۰	۱۰۰	منفی	سودوموناس
			آئروژینوزا

**جدول ۳: درصد حذف باکتری های مختلف در غلظت های مختلف نانو TiO<sub>2</sub> بر حسب (mg/L)**

نوع باکتری غلظت	۵	۱۰	۱۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۲۵۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۳۰۰۰	۴۰۰۰	۵۰۰۰	۶۰۰۰
ا. کلی	۰	۰	۰	۵	۱۴	۱۷	۲۱	۲۵	۲۷	۳۰	۳۵	۳۷	۴۰	۴۳
ب. سوبتلیس	۰	۰	۵	۱۱	۱۶	۲۳	۲۹	۳۷	۴۰	۴۷	۶۳	۷۱	۷۸	۸۱
ا. ارئوس	۰	۸	۵۸	۶۴	۷۳	۸۱	۸۴	۸۷	۸۹	۹۱	۹۲	۹۵	۹۶	۹۶
س. آئروژینوزا	۰	۰	۱۰	۱۳	۲۰	۲۵	۳۳	۴۰	۴۶	۵۱	۶۵	۷۷	۸۵	۸۹

**جدول ۴: درصد حذف باکتری های مختلف در غلظت های مختلف نانو ZnO بر حسب (mg/L)**

نوع باکتری غلظت	۵	۱۰	۱۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۲۵۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۳۰۰۰	۴۰۰۰	۵۰۰۰	۶۰۰۰
ا. کلی	۰	۲۵	۳۳	۶۳	۹۹	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
ب. سوبتلیس	۰	۱۰	۲۵	۳۳	۴۷	۵۶	۷۷	۸۱	۸۶	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
ا. ارئوس	۰	۳۴	۷۲	۸۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
س. آئروژینوزا	۰	۰	۱۵	۲۶	۳۷	۵۱	۶۲	۷۰	۷۹	۸۷	۹۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰



جدول ۵: درصد حذف باکتری های مختلف در غلظت های مختلف نانو CuO بر حسب (mg/L)

نوع باکتری	۵	۱۰	۱۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۲۵۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۳۰۰۰	۴۰۰۰	۵۰۰۰	۶۰۰۰
ا. کلی	۰	۰	۱	۱۱	۲۰	۲۳	۲۷	۳۵	۴۱	۵۶	۶۱	۸۲	۸۵	۹۲
ب. سوبتلیس	۰	۳	۸	۱۷	۲۵	۲۸	۳۱	۴۵	۵۳	۶۰	۶۷	۹۸	۱۰۰	۱۰۰
ا. ارئوس	۰	۳	۱۱	۲۳	۲۸	۴۲	۵۷	۶۰	۷۳	۹۴	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
س. آئروژینوزا	۰	۰	۵	۱۹	۲۷	۴۳	۵۰	۵۵	۶۱	۷۷	۸۹	۹۵	۱۰۰	۱۰۰

### بحث و نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از تعیین خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نشان داد که بین غلظت نانوذره و درصد حذف باکتری ارتباط مستقیم وجود دارد. این نتایج از لحاظ آماری معنی دار می باشد ( $P < 0/05$ ). براساس نتایج این مطالعه مشاهده گردید که درصد حذف باکتریهای موجود در فاضلاب مورد مطالعه به وسیله نانوذرات مختلف، متفاوت می باشد. همچنین مشخص گردید که شدت سمیت یا اثر ضد باکتریایی نانوذرات، به نوع باکتری نیز بستگی دارد و این نتیجه ای است که در مطالعات قبل نیز اثبات شده است (۱۷). درمورد حساسیت باکتری ها مشخص شد که باکتری استفیلوکوکوس اورئوس گرم مثبت، نسبت به اشرشیاکلای و سودوموناس آئروژینوزای گرم منفی در مقابل هر سه نانوذره، حساس تر بوده و در غلظت های کمتری از نانوذرات نابود می شود (نمودار های ۱ و ۲ و ۳) که با نتایج مطالعه زوها و همکارانش که در سال ۲۰۰۲ در کشور ژاپن انجام شد مطابقت دارد (۱۸). در مورد باکتری باسیلوس سوبتلیس مشخص شد که این باکتری در اکثر موارد نسبت به دیگر

باکتریهای مورد مطالعه مقاوم تر بود. و این با نتایج تحقیقی مشابهی که توسط کی یونگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ در کشور کره انجام شد همخوانی نداشت (۱۹). این مساله که در بعضی مطالعات باکتری های گرم مثبت به عنوان گونه های حساس تر شناخته می شوند و در بعضی دیگر خلاف این موضوع اثبات می شود، می تواند ناشی از ویژگی های فردی و سویه ای باکتری ها باشد (۱۶). مطالعه حاضر نشان داد نانوذرات ZnO در غلظت ۱۰۰۰ mg/L قادر به حذف ۶۰ تا ۱۰۰٪ کل باکتریهای گرم منفی و مثبت هستند (نمودار شماره ۲).

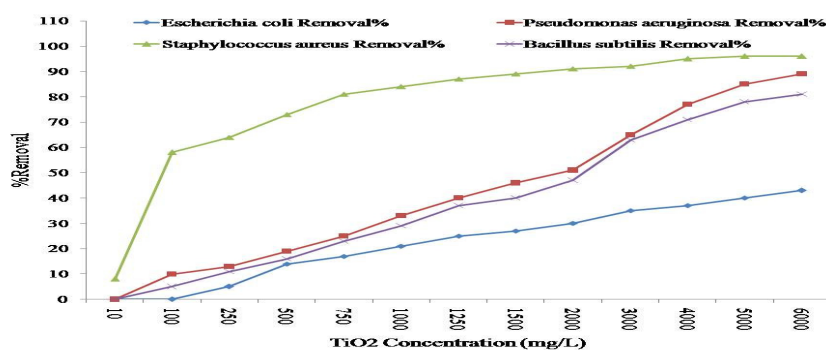
این نتیجه کمی با نتایج مطالعه آدامز و همکاران متفاوت بود به طوری که طی مطالعه آنها، غلظت بازدارنده رشد در ۴۸٪ گونه های اشرشیا کلای در غلظت ۱۰۰۰ mg/L از نانوذره ZnO بدست آمد (۲۰). در این مورد دلیل اصلی تفاوت در دو مطالعه می تواند اندازه نانوذرات و شرایط کشت باکتری و تفاوت های سویه ای باشد به طوری که مشخص شده است که اندازه نانوذرات در سمیت آنها تاثیرگذار است (۱۶ و ۱۷). درمورد نانو CuO



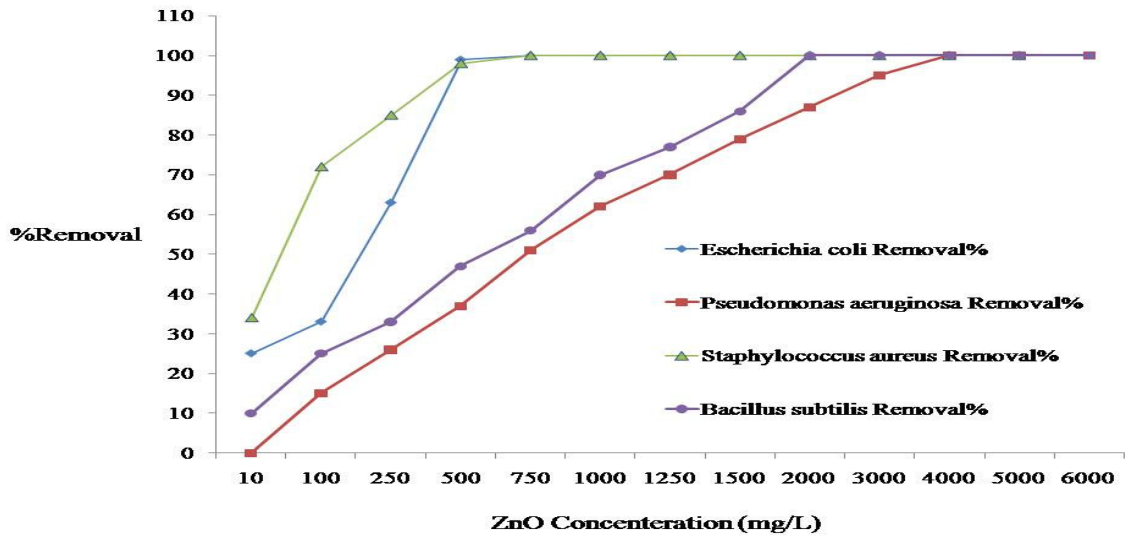
نانوذرات مورد مطالعه است. این نتیجه مشابه نتایج مطالعه ای بود که توسط وی جیانگ و همکاران در سال ۲۰۰۹ در آمریکا انجام شد و مشخص گردید که نانو ZnO در غلظتهای ۲۰ میلی گرم در لیتر نسبت به دیگر نانوذرات درصد حذف باکتریایی بیشتری داشت (۱۷). در مطالعه حاضر مقاومترین باکتریها نسبت به نانوذرات CuO، ZnO و TiO<sub>2</sub> به ترتیب اشرشیا کلای، سودوموناس آنروژینوزا و اشرشیا کلای بودند همچنین حساسترین نوع آنها استافیلوکوک ارئوس گرم مثبت نسبت به هر سه نانوذره بود. طبق نتایج بدست آمده کمترین و بیشترین ارتباط بین افزایش درصد حذف باکتری با افزایش غلظت نانوذره، به ترتیب در بین نانو ZnO و نانو CuO اتفاق افتاد. در این مطالعه نتیجه گرفته شد که در یک غلظت مشخص از نانوذرات TiO<sub>2</sub>، ZnO و CuO بیشترین اثر ضد باکتریایی مشاهده شده به ترتیب بوسیله نانو ZnO، CuO و TiO<sub>2</sub> بود و همچنین باکتری های گرم مثبت فاقد اسپور بدلیل توانایی جذب بالای نانوذرات به عنوان گونه حساس تر شناخته شدند.

مشخص شد در غلظت ۴۰۰۰ mg/L قادر به حذف ۶۰ تا ۹۰٪ باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آنروژینوزا می باشد (نمودار شماره ۳).

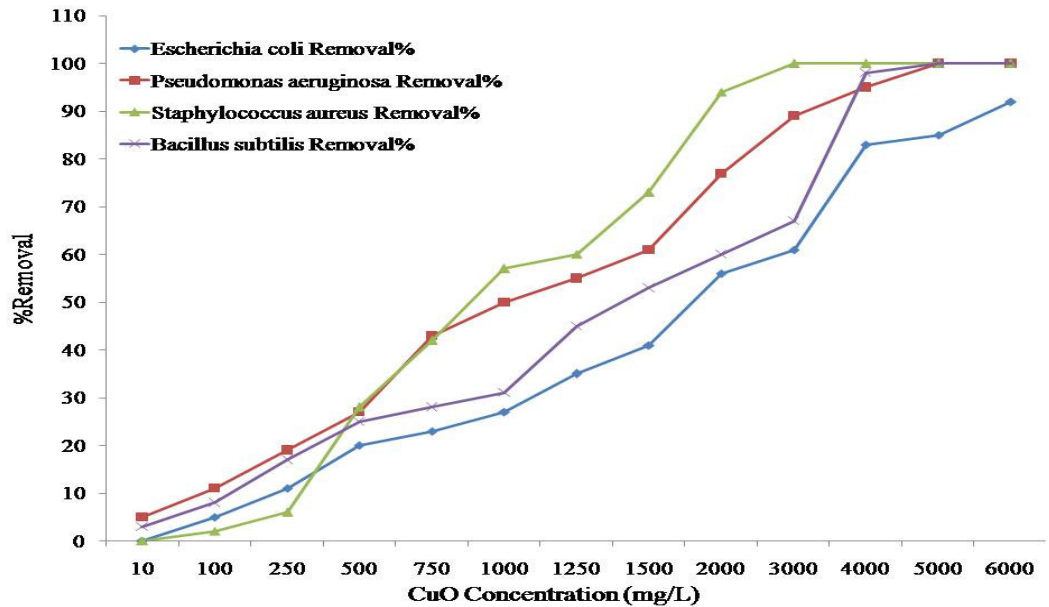
در خصوص نانو تیتانیوم ۲ اکسید در غلظتهای بالای ۵۰۰۰ mg/L کلیه باکتریها بجز اشرشیا کلای، ۶۰ تا ۹۰ درصد حذف گردیدند (نمودار شماره ۱) که این تفاوت درصد حذف در باکتریهای مورد مطالعه به دلیل عواملی همچون ترکیبات موجود در دیواره سلولی آنها، وجود و یا عدم وجود فرم مقاوم باکتری همانند اسپور، برهمکنش گیرنده های لیگانندی، عوامل فتوکاتالیتیکی، ROS یا Reactive oxygen Species، ظرفیت و پتانسیل بار در سطح باکتری و نانوذره است (۱۹، ۲۱، ۱۷). کمترین غلظت نانوذرات ZnO برای شروع کشندگی کلیه باکتریهای مورد مطالعه ۸۵ میلی گرم در لیتر و برای سایر نانوذرات CuO و TiO<sub>2</sub> به ترتیب ۱۱۰ و ۲۲۵ میلی گرم در لیتر بود که این بیانگر قدرت کشندگی بیشتر نانو ZnO نسبت به دیگر



نمودار ۱: مقایسه دوز کشندگی باکتریها در غلظت های مختلف نانوذرات TiO<sub>2</sub>



نمودار ۲: مقایسه دوز کشندگی باکتریها در غلظت های مختلف نانوذرات ZnO



نمودار ۳: مقایسه دوز کشندگی باکتریها در غلظت های مختلف نانوذرات CuO

پژوهشگران از کمیته تحقیقات بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان که با تصویب این طرح راه را برای انجام مطالعه هموار نمودند سپاسگزاری می نمایم.

**تشکر و قدردانی:** این طرح تحت شماره ۸۹/۲۰۵ مورد حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمان قرار گرفته و به انجام رسیده است.





## References

- 1-Biswas P. Nanoparticles and the Environment. Journal of the Air & Waste Management Association 2005; 22(55): 708-746.
- 2- Chow C. Introduction to the Critical Review Nanoparticles and the Environment. Journal of the Air & Waste Management Association 2005; 55: 706-707.
- 3- Andrew M, Evan M. The nanotechnology consumer products inventory. Woodrow Wilson International Center for Scholars 2005; 57: 614-624.
- 4- Bystrzejewska G, Golimowski J, Urban P. Their potential toxicity waste and environmental management. Waste Management, 2009. 35: 718-730.
- 5- Heinlaan M. Toxicity of nanosized and bulk nanoparticles. Chemospher 2008; 71: 1308-1316.
- 6- SerponeN, Dondi D, Albini A. Inorganic and organic UV filters Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. Inorganica Chimica Acta 2007; 360: p. 794-802.
- 7- Wang X, Xing B. Sorption of Pyrene by Regular and Nanoscaled Metal Oxide Particles Influence of Adsorbed Organic Matter. Environmental Science & Technology 2008; 42: 7267-7272.
- 8- 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): 1308-1316.
- 9- Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis N, Jeuken L, Povey M. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*. Journal of Nanoparticle Research 2010; 12(5): 1625-1636.
- 10- Gurr JR, Wang AS, Chen S. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. Toxicology 2005; 213: 66-73.
- 11-Reeves JF, Davies SJ, Dodd N. Hydroxyl radicals (OH & H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 2008; 640: 113-22.
- 12- Kahru A, Dubourguier H, Kasemets A. Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. A Minireview Sensors 2008; 8: 5153 -5170.



- 13-Maynard A, Michelson E. The Nanotechnology Consumer Product Inventory. Woodrow Wilson International Center for Scholars Washington 2005; 51: 513-521.
- 14- Aussalah M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control 2007; 18: 414-420.
- 15- Daneshvar N. Photocatalytic degradation of the insecticide diazinon in the presence of prepared nanocrystalline ZnO powders under irradiation of UV-C light. Sep Pur Technol 2007; 58 : 91–98.
- 16- Maness PC, Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward an understanding of its killing mechanism. . Applied Environmental Microbiology 1999; 65: 40-94.
- 17-Jiang WH, Xing B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. Environmental Pollution 2009; 157: 1619–1625
- 18-Zhou H, Smith D. Advanced technologies in water and wastewater Treatment. J Environ Eng Sci 2002; 1: 247–264.
- 19-Young K, Jeong H. Antimicrobial Characteristics of Silver Aerosol Nanoparticles against Bacillus subtilis Bioaerosols. Environmental engineering science 2008; 25: 289-295.
- 20-Adams LK, Lyon D, Alvarez P. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. Water Research 2006; 40: 3527-3532.
- 21- Rincon A, 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. Apply Catal B Environ 2004; 49: 99-112.



## ***Determining and Comparing the Effect of Nanoparticle CuO, TiO<sub>2</sub> and ZnO in Removing Gram Positive and Negative Bacteria from Wastewater***

Malakootian M \*(Ph.D) Toolabi A\*\* (MS.c)

\*Corresponding Author: Professor of Environmental Health, School of Public Health, Kerman University of Medical Sciences. Email: [m.malakootian@yahoo.com](mailto:m.malakootian@yahoo.com) 0341-3220082

\*\*Graduate Student in Environmental Health Engineering, Kerman University of Medical Sciences

### **Abstract**

**Background:** Due to the unique absorption and anti-microbial properties of nanoparticles, making use of them for removal of bacteria in water and wastewater is growing. Application of these substances in removal of bacteria in municipal wastewater is an important matter which we will investigate in this research.

**Methods:** In this cross-sectional study, the sampling period was completed from summer until fall of the year 2010 at incoming sewage treatment plant in Kerman City. Samples were grown on nutrient agar culture media and then 180 Mueller Hinton agar medium was prepared. Different concentrations of nanoparticles at ratio of 1:10 were injected on media containing the bacteria. After incubation, the level of CFU per milliliter was calculated by counting the number of colony. Tests were done based on 'water and wastewater standards' book.

**Results:** No observed effect concentration (NOEC) for zinc oxide nanoparticles for staphylococcus aureus bacteria, bacillus subtilis and pseudomonas aeruginosa, and escherichia coli was 5, 5, 8, and 80 mg/l respectively, and 100% mortality for all the bacteria was in 6000 mg/l.

NOEC of nano copper oxide for mentioned bacteria was in, 5, 7, 90, and 98 mg/l respectively and in the concentration of 6000mg/l the mortality percent of all three bacteria excluding escherichia coli (staphylococcus aureus, bacillus subtilis, pseudomonas aeruginosa) was 100% and for escherichia coli was 92%. NOEC of nano titanium dioxide for mentioned bacteria was 5, 90, 95, and 200 mg/l respectively, and in the concentration of 6000mg/l mortality of staphylococcus aureus, bacillus subtilis, pseudomonas aeruginosa, and escherichia coli was 96%, 81%, 89%, and 43% respectively.

**Conclusion:** The results showed that with increasing concentration of nanoparticles, removal of bacteria increased as well. ( $P < 0.05$ ). The effect of zinc oxide nanoparticles on the removal of gram negative and positive bacteria was higher than Titanium dioxide and copper oxide nanoparticles. So application of this method after investigating economic balances and other factors for removing of bacteria from sewage via this method is recommended.

**Keywords:** Nanoparticles, Gram-positive and gram-negative bacteria, Wastewater