

## بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی و اکسید تیتانیوم با استفاده از آزمون زیستی توسط باکتری های اشرشیاکلی ATCC 35218 و استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923

کاظم ندافی<sup>۱</sup>، محمدرضا زارع<sup>۲</sup>، مسعود یونسیان<sup>۳</sup>، محمود علی محمدی<sup>۴</sup>، نوشین راستکاری<sup>۵</sup>، سیدنجات موسوی<sup>۶</sup>

نویسنده مسئول: تهران، میدان انقلاب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه مهندسی بهداشت محیط zaremohammad1363@yahoo.com

دریافت: ۸۹/۱۲/۰۳ پذیرش: ۹۰/۰۲/۳۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** در این تحقیق سمیت نانوذرات اکسید روی ( $ZnO$ ) و اکسید تیتانیوم ( $TiO_2$ ) به عنوان دو نوع از پرکاربردترین نانوذرات مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج این مطالعه می‌تواند به وضع استانداردها و قوانین زیست محیطی نانوذرات کمک کند. روش بررسی: غلظت های مختلف از دو نانوذره  $TiO_2$  و  $ZnO$  به محیط کشت های نوترینت آگار اضافه شد. سپس باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس با تعداد مشخص به محیط کشت اضافه شدند و میزان بازدارندگی رشد در مقایسه با نمونه شاهد تعیین شد. اطلاعات حاصل به کمک نرم افزار SPSS ver 16.0 و آزمون استاندارد پروبیت، آنالیز شده و غلظت موثر ۵۰ درصد ( $EC_{50}$ ) و غلظت بدون اثر بازدارنده ( $NOEC$ ) در ارتباط با دو نوع نانوذره تعیین گردید.

**یافته ها:** طبق آزمایشات،  $EC_{50}$  ۲۴ ساعته نانو  $ZnO$ ، با استفاده از ۱. کلاهی و ۱. اورئوس به ترتیب  $5/47 mg/L$  و  $2/38 mg/L$  به دست آمد.  $EC_{50}$  ۲۴ ساعته نانوذرات  $TiO_2$  با استفاده از ۱. کلاهی و ۱. اورئوس نیز به ترتیب  $5/366 mg/L$  و  $3/471 mg/L$  محاسبه شد. همچنین برای نانوذرات  $ZnO$  غلظت بدون اثر بازدارنده ( $NOEC$ ) با استفاده از ۱. کلاهی و ۱. اورئوس به ترتیب  $1/15$  و  $3/28 mg/L$  و برای نانوذرات اکسید تیتانیوم غلظت بدون اثر بازدارنده با استفاده از ۱. کلاهی و ۱. اورئوس به ترتیب  $1937$  و  $1184$  محاسبه شد.

**نتیجه گیری:** این مطالعه نشان داد که سمیت حاد نانوذرات اکسید روی به مراتب بیشتر از سمیت حاد نانوذرات اکسید تیتانیوم است. مقایسه نتایج این مطالعه با معیارهای ارایه شده توسط EPA نیز نشان می‌دهد که از نظر سمیت حاد، نانوذرات اکسید روی در رده مواد با سمیت متوسط و نانوذرات اکسید تیتانیوم در رده موادی که عملاً غیر سمی هستند قرار می‌گیرد. بنابراین پیشنهاد حدود مجاز مواجهه و وضع استانداردهای دفع محیطی نانوذرات اکسید روی از نظر سمیت حاد در مقایسه با نانوذرات اکسید تیتانیوم نیازمند مراقبت بیشتری است. واژگان کلیدی: نانوذرات، اکسیدروی، اکسیدتیتانیوم، سمیت، آزمون زیستی، اشرشیا کلی، استافیلوکوک اورئوس

۱- دکترای بهداشت محیط، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دکترای اپیدمیولوژی، دانشیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- دکترای بهداشت محیط، استادیار دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۵- دکترای شیمی دارویی، استادیار مرکز تحقیقات محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۶- کارشناس بهداشت محیط، آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

## مقدمه

اکسیدهای فلزی نانو ذرات در مقیاس وسیعی هم در صنعت و هم در موارد خانگی کاربرد دارند (۱). استفاده رو به رشد از نانو ذرات مصنوعی در جوامع انسانی بی شک منجر به آزادسازی چنین موادی به انواع محیط ها و اکوسیستم ها خواهد شد (۲ و ۳). با این وجود تحقیقات کمی در مورد رفتار محیطی، میزان آزادسازی در محیط های آبی و خطرات بالقوه ناشی از نانو ذرات صورت گرفته است (۴ و ۵). به طوری که تاکنون قواعد و علوم شیمیایی و دارویی رایج نه تنها نتوانسته اند خطرات تحمیل شده به وسیله نانو ذرات را توضیح دهند، بلکه یک نیاز اضطراری و فوری را برای ارزیابی اثرات بیولوژیکی آنها اعلام کرده اند (۶). در بین نانو ذرات، اکسید روی (ZnO) و اکسید تیتانیوم (TiO<sub>2</sub>) جزو نانو ذرات مهم هستند که در بسیاری از کشورها در مقیاس صنعتی در حال استفاده می باشند (۵ و ۷). این مواد در صنایع لاستیک سازی، تصفیه فاضلاب و همچنین به عنوان قارچ کش کاربرد دارند (۸ و ۹). از کاربردهای دیگر این مواد می توان به استفاده از آنها در محصولات آرایشی و بهداشتی مثل کرم های ضد آفتاب و خمیر دندان اشاره کرد (۶ و ۱۰). مطالعاتی که در خصوص کاربردهای آرایشی و بهداشتی نانو ذرات انجام شده است نشان می دهد که نانو ذرات TiO<sub>2</sub> (با قطر ۲۰-۱۰ نانومتر) بر اثر مواجهه با اشعه UVA خواص سایتوتوکسیسیته شدیدی از خود نشان می دهند (۱۱ و ۱۲)، همچنین نانو ZnO در تشکیل رادیکال های آزاد در سلول های پوست شرکت می کند و بدین طریق به DNA و پروتئین سلول ها آسیب می رساند و باعث سرطان می شود (۱۳)، به علاوه این مواد با عبور از سد مهم خونی - مغزی و امثال آن، ممکن است باعث آسیب های بالقوه حاد و جدی تر نیز شوند (۱۴ و ۱۵). از طرف دیگر نانو ذرات ZnO پتانسیل بالایی در وارد شدن به محیط های آبی دارند به طوری که محققان ایتالیایی اثبات کرده اند که ۲۵٪ از کرم های ضد آفتابی که برای محافظت از پوست استفاده می شوند از طریق استحمام و شنا شسته می شوند، این مقدار باعث می شود

۲۵۰ تن از این مواد وارد محیط های آبی شوند (۱۶). بنابراین با توجه به کاربردهای فراوان نانو ذرات و ویژگی های منحصر به فرد این مواد، بررسی اثرات احتمالی این مواد ضروری است. در مطالعه ای که توسط ونگ و همکاران (Wang et al.) صورت گرفت به مقایسه سمیت نانو ذرات ZnO، TiO<sub>2</sub> و Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> در حالت نانو ذره ای و غیر نانو ذره ای پرداخته شد (۴). در این مطالعه که با استفاده از نماتود به عنوان یک موجود پرسلولی صورت گرفت، تفاوت زیادی در مورد سمیت حالت نانو ذره ای و غیر نانو ذره ای ZnO مشاهده نشد اما سمیت حالت نانو ذره ای TiO<sub>2</sub> و Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> بیشتر از حالت غیر نانو ذره ای بود. در این مطالعه اثر نانو ذرات بر موجودات تک سلولی مورد مطالعه قرار نگرفت.

در مطالعه دیگری که توسط هینلان و همکاران (Heinlaan et al.) با استفاده از دافنیا مگنا (یک سخت پوست پرسلولی) صورت گرفت، مشخص شد نانو ذرات ZnO هم در حالت نانو ذره ای و هم غیر نانو ذره ای دارای سمیت بیشتری نسبت به TiO<sub>2</sub> می باشند (۵). در این مطالعه اثر این مواد بر باکتری و بیبریو فیشری در یک محیط کشت مایع نیز مورد مطالعه قرار گرفت و همین نتایج به دست آمد اما اثر نانو ذرات بر باکتری ها بر روی یک محیط ثابت (جامد) سنجیده نشد.

در تعیین تاثیرات بالقوه عوامل شیمیایی و اثرات ترکیبات سمی، آزمون های زیستی (Bioassay) می توان موجودات مختلفی را استفاده کرد. در تعیین سمیت نانو ذرات ZnO و TiO<sub>2</sub> نیز از موجوداتی همچون آلگ ها، نماتودها و سخت پوستان استفاده شده است (۶-۳) اما از آنجایی که در تست های تعیین سمیت موجودات حساس تر می توانند اطمینان بالاتری را فراهم کنند در نتیجه بررسی سمیت با استفاده از باکتری ها می تواند به تعیین سمیت نانو ذرات کمک کند. از طرف دیگر چون هدف نهایی تعیین سمیت تعمیم داده ها به انسان است، پس بررسی سمیت با استفاده از موجودات مختلف ضریب اطمینان آزمایشات گذشته را ارتقا خواهد داد. در بین باکتری ها، گونه های اشرشیاکلی به عنوان

غلظت) از نانوذرات ZnO و غلظت های ۲۰۰ تا ۱۰۰۰۰ (۷ غلظت) از نانوذرات TiO<sub>2</sub> در آگار، این محیط ها به درون پتری دیش ریخته شدند و به صورت چرخشی یکدست شدند (۱۷).

#### تست سمیت و کشت باکتری

باکتری های اشرشیا کلی ATCC 35218 و استافیلوکوک اورئوس ATCC 25923 که از قبل بر روی نوترینت آگار نگه داری شده بودند، جهت رشد به مدت ۲۴ ساعت در نوترینت براث (Art. 10234) کشت داده شدند. ترکیب محیط کشت نوترینت براث بر حسب g/L عبارت بود از Infusion from meat 5.0; Pepton from meat 10.0; di-Sodium hydrogen phosphate 2.0; Sodium chloride 3.0 استفاده از کشت های نوترینت براث حاوی باکتری، هر محیط باکتریایی به نسبت ۱:۱۰۰ با نوترینت براث استریل و تازه رقیق شد. باکتری ها با الگوی شعاعی و به صورت مختلط بر روی پلیت نوترینت آگار کشت داده شدند. این نوترینت آگار حاوی غلظت های مورد نظر از نانوذرات بود. پس از انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کلنی ها شمارش شدند. حداقل تکرار لازم برای هر غلظت از نانوذره ۳ بار است و بنابراین از هر غلظت نانوذره سه پتری دیش تهیه شد. همچنین به عنوان نمونه شاهد نیز کشت بر روی پتری دیش های حاوی محیط آگار خالص انجام شد (۱۸).

#### آنالیز نتایج

آزمایش مربوط به هر غلظت سه بار تکرار شد و میانگین هر سه تکرار، تعیین گردید. جهت تعیین ارتباط بین میزان مرگ و میر و غلظت نانوذرات، ضریب همبستگی پیرسن با استفاده از نرم افزار SPSS Ver 16.0 تعیین شد. میانگین هر سه بار آزمایش توسط آنالیز پروبیت در نرم افزار SPSS Ver 16.0 و با استفاده از آزمون پروبیت آنالیز شد، نتایج حاصل از آنالیز پروبیت جهت رسم نمودارها در برنامه Microsoft Excel 2007 استفاده شد و توسط آن EC<sub>50</sub> محاسبه شد. همچنین غلظت بدون اثر بازدارنده و No Observed Effect Concentration (NOEC)

باکتری گرم منفی و استافیلوکوک اورئوس به عنوان باکتری گرم مثبت، به دلیل وفور در طبیعت و کشت و پرورش آسان، گونه های مناسبی است.

این مطالعه به منظور بررسی سمیت نانوذرات، صورت گرفت. بدین منظور نانوذرات اکسید روی و اکسید تیتانیوم به عنوان نوع از پرکاربردترین نانوذرات در تماس با باکتری گرم منفی و گرم مثبت قرار گرفتند و EC<sub>50</sub> آنها (غلظتی از مواد بازدارنده که باعث مرگ ۵۰٪ جمعیت مورد آزمایش می شود) تعیین شد. اگر چه تاکنون مطالعاتی در مورد سمیت نانوذرات صورت گرفته است اما تاکنون مطالعه ای که سمیت این مواد را در یک محیط کشت جامد با استفاده از ا. کلاهی و ا. اورئوس نشان دهد، انجام نگرفته است. نتایج این تحقیق می تواند علاوه بر شناخت سمیت نانوذرات به شناخت بهتر آنها به عنوان مواد ضد باکتریایی نیز کمک کند.

#### مواد و روش ها

##### نانوذرات

نانوذرات ZnO و TiO<sub>2</sub> از آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شدند، قطر این ذرات ۵۰ تا ۷۰ نانومتر بود. محلول استوک ۱۰ گرم در لیتر از این نانوذرات به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه التراسونیک (Bandelin Sonorex RK 31) با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس در تهیه غلظت های مورد نظر استفاده شد.

##### آماده سازی محیط کشت

نوترینت آگار (MERCK 1.05450) به روش معمول با اتوکلاو کردن آماده شد. ترکیب این محیط کشت بر حسب g/L بدین صورت است: Pepton from meat 5.0; Meat extract 3.0; Agar-agar 12.0 و ۱۰۰۰ mg/L از محیط کشت و نانوذرات نیز آماده شد. زمانی که دمای محلول های خالص نوترینت آگار در حین سرد شدن به ۶۰ درجه سانتی گراد رسید ماده بازدارنده رشد (محلول های نانوذرات) اضافه شد. پس از تهیه غلظت های ۱ تا ۱۰ (۱۰)

۳/۲۸ mg/L به دست آمد (جدول ۲). در غلظت های بیش از ۵/۵۲ درمورد ا. کلای و ۹/۴۴ mg/L درمورد ا. اورئوس، ۱۰۰٪ مرگ باکتری ها مشاهده شد.

### نانوذرات TiO<sub>2</sub>

همان طور که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، EC<sub>50</sub> نانو ذرات اکسید تیتانیوم با استفاده از ا. کلای و ا. اورئوس به ترتیب ۵۳۶۶ mg/L و ۳۴۷۱ mg/L بدست آمد. ۱۰۰٪ مرگ و میر ا. کلای و ا. اورئوس به ترتیب در غلظت های بیش از ۱۱۵۹۰ mg/L و ۷۶۲۳ mg/L تعیین شد. میزان NOEC mg/L برای باکتری ا. کلای و ۱۱۸۴ mg/L برای ا. اورئوس محاسبه شد (جدول ۲).

غلظتی که در آن ۱۰۰٪ مرگ و میر رخ می دهد (100% mortality rate) به ترتیب از طریق محاسبه غلظتی که مرگ و میر در آن ۱۰٪ و ۹۹٪ بود، توسط آنالیز پروبیت در نرم افزار SPSS Ver 16.0 تعیین شد.

### یافته ها

#### نانوذرات ZnO

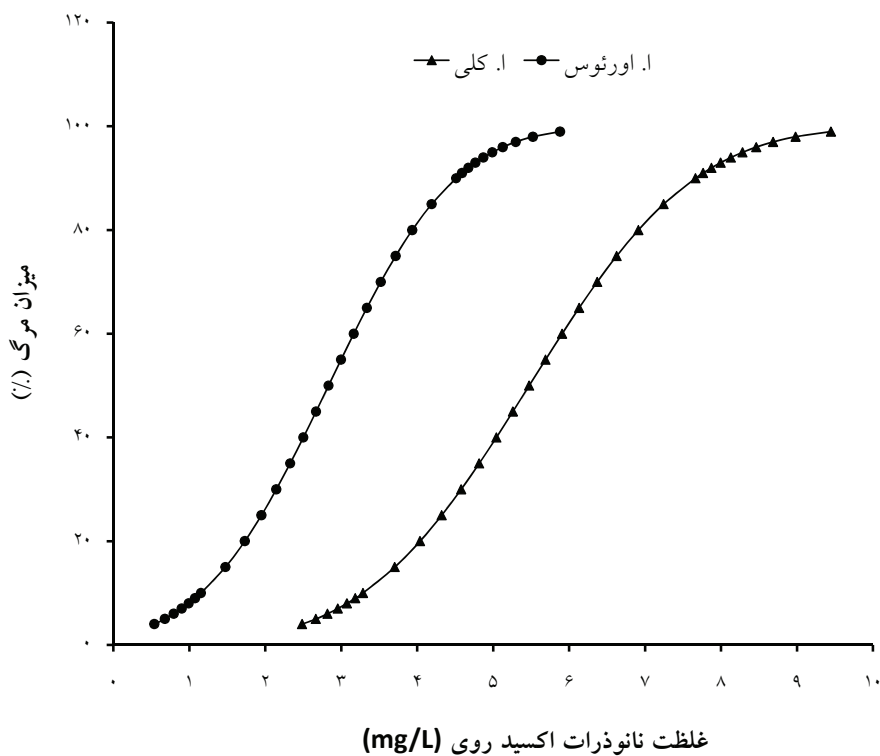
طبق آزمایشات، EC<sub>50</sub> ۲۴ ساعته نانو ZnO با استفاده از اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس به ترتیب ۵/۴۷ و ۲/۸۳ mg/L به دست آمد (جدول ۱). غلظت بدون اثر مخرب (NOEC) این نانو ذره درمورد ا. کلای و ا. اورئوس به ترتیب ۱/۱۵ و

جدول ۱: مقادیر EC<sub>50</sub> نانو ذرات پس از کشت ۲۴ ساعته باکتری ها با حدود اطمینان ۹۵٪

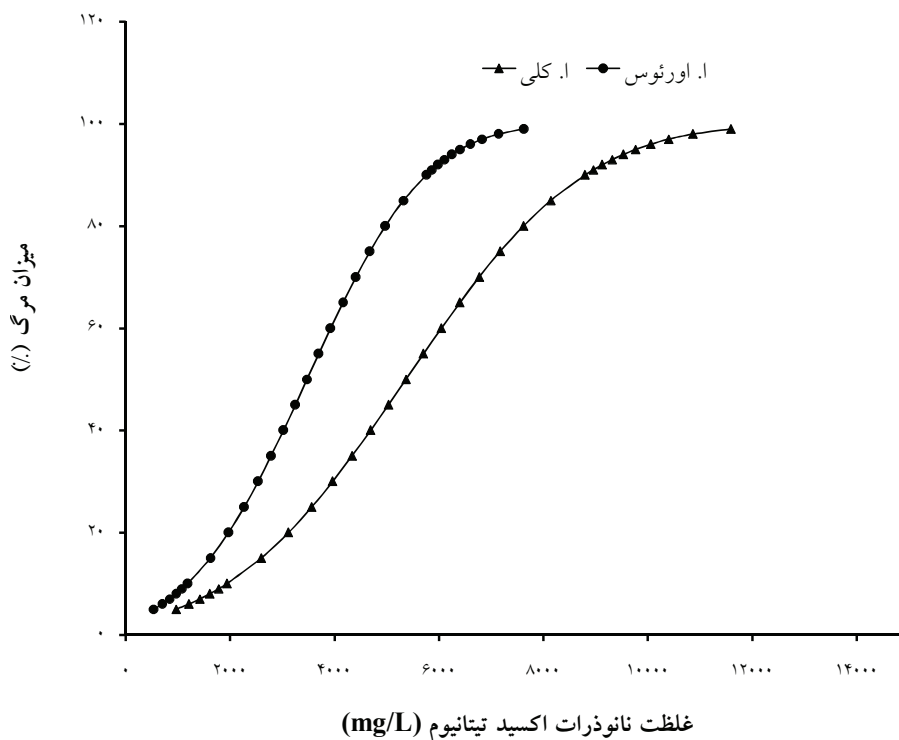
نانوذرات اکسید تیتانیوم		نانوذرات اکسید روی		نانوذرات	
حدود اطمینان ۹۵٪ برای		حدود اطمینان ۹۵٪ برای			
EC <sub>50</sub>		EC <sub>50</sub>		EC <sub>50</sub>	
حد بالا	حد پایین	حد بالا	حد پایین	حد بالا	حد پایین
۶۲۶۵	۴۶۶۰	۷/۱۹	۴/۷۳	۵/۴۷	بakteriya
۴۲۸۸	۲۸۸۱	۳/۰۰	۲/۶۶	۲/۸۳	استافیلوکوک اورئوس

جدول ۳: مقادیر NOEC و ۱۰۰٪ مرگ و میر باکتری ها در اثر مواجهه با نانو ذرات (mg/L)

نانوذرات اکسید تیتانیوم		نانوذرات اکسید روی		نانوذرات	
غلظت بدون اثر سوء		غلظت بدون اثر سوء			
NOEC (mg/L)		NOEC (mg/L)		NOEC (mg/L)	
<۱۹۳۷	>۱۱۵۹۰	<۱/۱۵	>۵/۵۲	<۱/۱۵	>۵/۵۲
<۱۱۸۴	>۷۶۲۳	<۳/۲۸	>۹/۴۴	<۳/۲۸	>۹/۴۴



شکل ۱: دوز - پاسخ باکتری ها در غلظت های مختلف نانوذرات اکسید روی



شکل ۲: دوز - پاسخ باکتری ها در غلظت های مختلف نانوذرات اکسید تیتانیوم

## بحث

نمودارهای حاصل از تست تعیین سمیت نشان داد که بین دوز نانو ذرات و سمیت آنها ارتباط مستقیم وجود دارد (شکل های ۱ و ۲). مقایسه  $EC_{50}$  دونا نوزده (جدول ۱)، تفاوت بسیار زیاد این اعداد را نشان می دهد. این تفاوت نشان می دهد، نانو ذرات مختلف می توانند سمیت های متفاوت داشته باشند، به علاوه تفاوت  $EC_{50}$  یک نانو ذره در دو باکتری مختلف نشان می دهد که شدت اثر سمیت یا اثر ضد باکتریایی نانو ذرات، به نوع باکتری نیز بستگی دارد. در این زمینه این مطالعه نشان داد که باکتری ا. اورئوس گرم مثبت، نسبت به ا. کلای گرم منفی حساس تر است. این نتایج از نتایج ساوای و همکاران (۱۹) که اثر پودر سرامیک را با باکتری ها سنجیدند، پیروی می کند. به طوری که طی تحقیق آنها نیز باکتری های گرم مثبت در برابر پودر سرامیک حساس تر بودند. اما در مطالعاتی که در مورد سمیت  $TiO_2$  صورت گرفت، برخلاف مطالعه حاضر، باکتری های گرم مثبت، کمتر آسیب پذیر شناخته شدند که دلیل عمده آن توانایی تشکیل اسپور و ساختار دیواره سلولی این باکتری هاست (۲۰). 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، علاوه بر تفاوت در ویژگی های فردی و سویه ای باکتری ها، می تواند به خاطر اثر نور نیز باشد. به طوری که در مورد  $TiO_2$  اثبات شده، امواج نوری باعث تولید Reactive Oxygen Species (ROS) فتوکاتالیتیک می شوند (۲۱) و از این طریق سمیت آنها افزایش می یابد.

بنابراین مکانیسم پاسخ های متفاوت به دوزهای مشابه نانو ذرات در باکتری های گرم مثبت و منفی علاوه بر تفاوت فیزیولوژیکی، متابولیسم های درون باکتریای و نفوذ پذیری انتخابی غشاهای و دیواره های آنها، به خاطر تفاوت در شرایط فیزیکی (وجود و یا عدم وجود نور) نیز می تواند باشد. در مورد نانو ذرات  $ZnO$   $EC_{50}$  محاسبه شده در این تحقیق بیش از نتایج مارگیت هینلان و همکاران است (۵) به طوری که نتایج

حاصل از تحقیق آنها  $EC_{50}$  با باکتری ویبریو فیشری را  $mg/L$  ۱/۹ نشان داد. در طی تحقیق دیگری که توسط آدامز و همکاران (۲۲) صورت گرفت، غلظت بازدارنده رشد در ۴۸٪ گونه های ا. کلای در غلظت  $1000 ppm$  از نانو ذرات  $ZnO$  به دست آمد. این تفاوت های فاحش در نتایج این مطالعات و تحقیق حاضر، علاوه بر اختلافات ژنتیکی و گونه ای باکتری های استفاده شده توسط هر دو گروه، به خاطر تفاوت های نانو ذرات و تفاوت در روش آزمایشات نیز می تواند باشد (۲۲). در مطالعه ای که توسط لاورا و همکاران صورت گرفت علاوه بر این که قطر نانو ذرات بسیار بیشتر از قطر نانو ذرات استفاده شده در این مطالعه بود، غلظت های مورد آزمایش و تماس باکتری ها با آنها نیز در محیط مایع (Minimal Davis medium (MD) همراه با اختلاط بود. در آزمایشاتی که در محیط های مایع و محلول بر روی باکتری ها صورت می گیرد، نیاز است جهت جلوگیری از رسوب نانو ذرات محلول ها به هم آمیخته شوند (اختلاط داده شوند) (۲۳)، اما اختلاط این محلول ها باعث به هم چسبیدن و تجمع نانو ذرات به دور هم می شود که این امر باعث افزایش قطر نانو ذرات می شود، افزایش قطر به نوبه خود باعث نفوذ کمتر این مواد به ارگان ها و سلول ها می شود، در نتیجه سمیت واقعی این مواد کمتر از مقدار واقعی ثبت خواهد شد. این موضوع می تواند دلیل اصلی محدوده گسترده غلظت های بازدارنده رشد در آزمایشات لاورا و همکاران نسبت به تحقیق حاضر باشد. طی مطالعه این افراد که در آن اثر بازدارندگی رشد نانو  $ZnO$  توسط ا. کلای تعیین شد، غلظت های مورد آزمایش از  $10 ppm$  با ۱۴٪ بازدارندگی تا  $1000 ppm$  با حدود ۵۰٪ بازدارندگی رشد متفاوت بود. این در حالی است که در مطالعه حاضر، آزمون زیستی  $ZnO$  توسط ا. کلای نشان داد، محدوده غلظت برای ۵۰٪ مرگ و NOEC بین  $5/47 ppm$  تا  $1/15 ppm$  بود. در روش های مختلف تعیین سمیت یک ماده واحد، تستی که سمیت بیشتری را نشان دهد، ضریب اطمینان بالاتری دارد، (به طوری که تکیه بر نتایج آن می تواند اطمینان بالاتری جهت پیش بینی اثرات زیان بار

باکتری کشی متفاوتی داشته باشند که نشان می دهد سمیت نانوذرات علاوه بر ساختار نانویی و نسبت بالای سطح به جرم به ماهیت عنصر تشکیل دهنده آنها نیز مربوط است. با توجه به نتایج این مطالعه می توان گفت از نظر سمیت حاد، به کارگیری و وضع استانداردهای مواجهه و دفع محیطی نانوذرات اکسید روی در مقایسه با نانو ذرات اکسید تیتانیوم نیازمند مراقبت بیشتری است. به علاوه با مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعات قبلی در ارتباط با سمیت نانوذرات که در محیط های مایع انجام شده بود این نتیجه گرفته شد که در تعیین اثرات سمی بالقوه نانوذرات در محیط های مایع بهتر است هم زمان از روش های تعیین سمیت نانوذرات در محیط غیرمایع نیز استفاده شود تا عوامل مداخله کننده در این روش ها (اثر چسبندگی و تجمع پذیری) آشکار گردد و دید بهتری نسبت به پتانسیل سمیت نانوذرات کسب گردد.

آن ایجاد کند)، بنابراین پیشنهاد می شود در مورد نانوذرات (که در محیط های آبی قابلیت چسبندگی و ته نشینی دارند) همزمان از روش هایی که در آنها نانوذرات در یک محیط غیرمایع، ثابت شده باشند (همچون روش به کار رفته در مطالعه حاضر) نیز استفاده شود تا اثرات سمی بالقوه نانوذرات بهتر آشکار گردد. مقایسه یافته های حاصل از اثر ZnO بر باکتری گرم مثبت باسیلوس سوییتیلیس با یافته های مطالعه حاضر نیز، موارد فوق را تصدیق می کند (۲۲).

مقایسه نتایج این مطالعه با معیارهای ارایه شده توسط EPA نشان می دهد که از نظر سمیت حاد، نانوذرات اکسید روی در رده مواد با سمیت متوسط و نانوذرات اکسید تیتانیوم در رده موادی که عملاً غیر سمی هستند قرار می گیرد (۲۴). بنابراین از نظر سمیت حاد، به کارگیری و وضع استانداردهای دفع محیطی نانوذرات اکسید روی در مقایسه با نانو ذرات اکسید تیتانیوم نیازمند مراقبت بیشتری است، با این حال سمیت مزمن این مواد را نباید از نظر دور داشت.

### نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد که سمیت حاد نانوذرات اکسید روی به مراتب بیشتر از سمیت حاد نانوذرات اکسید تیتانیوم است. بنابراین اکسیدهای فلزی نانوذرات می توانند قدرت سمیت و

## منابع

1. Chow JC. Introduction to the A&WMA critical review: Nanoparticles and environment. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2005;55:706-707.
2. Nowack B, Bucheli TD. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*. 2007;150(1):5-22.
3. 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.
4. Wang H, Wick RL, Xing B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*. 2009;157(4):1171-77.
5. 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.
6. Kahru A, Dubourguier HC, Blinova I, Ivask A, Kasemets K. Biotests and biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: A minireview. *Sensors*. 2008;8(8):5153-70.
7. Jones CF, Grainger DW. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009;61(6):438-56.
8. Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*. 2007;90(21): 213901-903.
9. Wang X, Lu J, Xu M, Xing B. Sorption of Pyrene by Regular and nanoscaled metal oxide particles: Influence of adsorbed organic matter. *Environmental Science & Technology*. 2008;42(19):7267-72.
10. Hemmati Borji S, Nasserli S.I, Nabizadeh R.1, Mahvi A.H.1, Javadi A.H. Photocatalytic degradation of phenol in aqueous solutions by Fe(III)-doped TiO<sub>2</sub>/UV process. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2011;3(4):369-80.
11. Serpone N, Dondi D, Albini A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and sun care products. *Inorganica Chimica Acta*. 2007;360(3):794-802.
12. Reeves JF, Davies SJ, Dodd NJ, Jha AN. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. 2008;640(1-2):113-22.
13. Gurr JR, Wang ASS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*. 2005;213(1-2):66-73.
14. Bystrzejewska-Piotrowska G, Golimowski J, Urban PL. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*. 2009;29(9):2587-95.
15. 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.
16. Lockman PR, Oyewumi MO, Koziara JM, Roder KE, Mumper RJ, Allen DD. Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2003;93(3):271-82.
17. Wong S, Leung P, Djuricic A, Leung K. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009;396(2):609-18.
18. Koduru S, Grierson DS, Afolayan AJ. Antimicrobial activity of *Solanum aculeastrum*. *Fitoterapia*. 2003;74(3):298-301.
19. Lewu FB, Grierson DS, Afolayan A. Extracts from *pelargonium sidoides* inhibit the growth of bacteria and fungi. 2006;44(4):279-82.
20. 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.
21. 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. *Apply Catal B: Environ*. 2004;(49):99-112.
22. Maness PC, Smolinski S, Blake DM, Huang Z, Wolfrum EJ, Jacoby WA. Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: to ward an understanding



- of its killing mechanism. Applied Environmental Microbiology. 1999;(65):4094-98.
23. Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. Water Res. 2006;40(19):3527-32.
24. Sovova T, Koci V, Kochankova L. Ecotoxicity of nano and bulk forms of metal oxides. Nanocon. 2009;10:20-22.
25. U.S. Environmental protection agency [Home page on internet]. Chicago: The association; c1996-2010 [Update 18 may 2010; cited Jun 2010] available from: [http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk\\_ders/toera\\_analysis\\_eco.htm](http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/toera_analysis_eco.htm).

## **Bioassay for Toxicity Assessment of Zinc Oxide and Titanium Oxide to Escherichia Coli ATCC 35218 and Staphylococcus Aureus ATCC 25923 Bacteria**

Naddafi K., \*Zare M.R., Younesian M., Rastkari N., Alimohammadi M., Mousavi N.

Department of Environmental Health, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received; 23 January 2011 Accepted; 21 May 2011

### **ABSTRACT**

**Background and Objectives:** This study was conducted to investigate the toxicity of Titanium Oxide (TiO<sub>2</sub>) and Zinc Oxide (ZnO) nanoparticles as two of most widely used nanoparticles. The result of this study can help to designing environmental standard and legislations for nanoparticles.

**Materials and Methods:** Different concentrations of nano ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles were added to nutrient Agar culture media. Then, definite numbers of Escherichia coli and Staphylococcus aureus bacteria were added to culture media and inhibition of these bacteria growth was measured in comparison to controls. Obtained data were analyzed to determine nanoparticles' EC<sub>50</sub> and NOEC (No Observed Effect Concentration) using SPSS ver.16 and Probit standard test.

**Results:** 24-hours EC<sub>50</sub> of nano ZnO using E. coli and S. aureus determined to be 5.47 mg/L and 2.38 mg/L respectively. In addition, 24-hours EC<sub>50</sub> of nano TiO<sub>2</sub> using E. coli and S. aureus determined to be 5366 mg/L and 3471 mg/L respectively. In the case of ZnO nanoparticles, no observed effect concentration determined to be 1.15 and 3.28 mg/L for E. coli and S. aureus respectively and in the case of TiO<sub>2</sub> nanoparticles no observed effect level determined to be 1937 and 1184 mg/L for E. coli and S. aureus respectively.

**Conclusion:** This study showed that acute toxicity of nano ZnO is by far more than that of nano TiO<sub>2</sub>. Regarding the EPA acute toxicity criteria, nano ZnO is categorized as moderately toxic and nano TiO<sub>2</sub> is categorized as practically non toxic. Hence, regarding the acute toxicity, in recommending exposure criteria and environmental disposal standards, compared to nano TiO<sub>2</sub>, nano ZnO requires more attention.

**Key words:** Nanoparticle, Zinc Oxide, Titanium Oxide, Toxicity, Bioassay, Escherichia coli, Staphylococcus aureus

---

\*Corresponding Author: [zare mohammad1363@yahoo.com](mailto:zare mohammad1363@yahoo.com)

Tel: +98 21 88954914 Fax: +98 21 88950188