

The effect of ZnO nanoparticles on the *Vibrio* species isolated from coastal water of the Persian Gulf port

M. Malakootian, PhD¹ A. Toolabi, MSc² A. Javadi, MSc Student³ M. Ahmadian, MSc⁴
M.R. Zandmonfared, MSc Student⁵

Professor Department of Environmental Health¹, Research Center of Environmental Health, MSc Student of Microbiology³, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran. Instructor Department of Environmental Health², Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran. MSc of Environmental Health⁴, Social Development and Health Promotion Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. MSc Student of Environmental Health⁵, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran.

(Received 24 Sep, 2012 Accepted 11 Mar, 2013)

ABSTRACT

Introduction: Using zinc oxide nanoparticles, as a catalyst removal of fecal pollution indicator bacteria in water, has been studied as a model of bacterial contamination. This study aims to determine the toxicity and selection of appropriate indicators to evaluate the toxicity of zinc oxide nanoparticles on the isolated bacteria *Vibrio* species of Bushehr coastal waters.

Methods: In this experimental study, 100 samples of sea water off the coast of Persian Gulf in Bushehr coastal areas were selected. 10 centigrade of each sample was cultured on the TCBS medium. In the next step, differential tests were conducted on colonies of positive oxidase. The specific concentrations of nanoparticle were prepared and paper discs were impregnated with the concentrations and then bacterial isolates from the 0.5 Mc-Farland suspensions was prepared. After incubation, inhibition zone was reported in millimeters at each concentration. Data analysis was performed using by SPSS 16 Software.

Results: The strains of bacteria detected by culturing samples of raw water including *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio mimicus*. Minimum and maximum number of *Vibrio* strains were, *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*, respectively. Elimination of *Vibrio Cholerae*, *Vibrio Parahaemolyticus*, *Vibrio Vulnificus* and *Vibrio Mimicus* strains in concentration of 6000 mg/L zinc oxide nanoparticles were 95%, 90%, 75% and 70%, respectively.

Conclusion: Due to significant effect of nanoparticle in removal of genus *Vibrios*, economic justification and other factors should be considered in application of nanoparticles, in eliminating bacterial pathogens in water industry.

Key words: Zinc Oxide – *Vibrio* – Bushehr - Persian Gulf

Correspondence:
M. Malakootian, PhD.
Environmental Health Department
Faculty of Health, Kerman
University of Medical Sciences.
Kerman, Iran
Tel: +98 341 3205105
Email:
m.malakootian@yahoo.com

تأثیر نانوذرات اکسید روی بر روی گونه‌های جنس ویبریو جدا شده از آبهای بخش ساحلی خلیج فارس

دکتر محمد ملکوتیان^۱ علی طولابی^۲ علی جوادی^۳ محمد احمدیان^۴ محمدرضا زند منقرد^۵

^۱ استاد گروه بهداشت محیط، مرکز تحقیقات بهداشت محیط^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان^۳ مربی گروه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بم^۴ کارشناس ارشد بهداشت محیط، مرکز تحقیقات توسعه اجتماعی و ارتقاء سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه^۵ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

مجله پزشکی هرمزگان سال هفدهم شماره سوم مهر و آبان ۹۲ صفحات ۲۷۵-۲۶۹

چکیده

مقدمه: استفاده از نانوذرات اکسید روی به عنوان کاتالیز در حذف باکتریهای شاخص آلودگی مدفوعی آب به عنوان یک مدل آلودگی باکتریایی مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه با هدف بررسی سمیت و انتخاب شاخص مناسب جهت بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی بر روی باکتری‌های گونه‌های جنس ویبریو جدا شده از آبهای بخش ساحلی بندر بوشهر انجام شد. **روش کار:** در این مطالعه تجربی، تعداد ۱۰۰ نمونه از آب دریای سواحل خلیج فارس در استان بوشهر از مناطق مختلف ساحلی از ابتدا تا پایان سال ۱۳۹۰ برداشت شد. ۱۰ سی‌سی از هر نمونه بر روی محیط کشت TCBS کشت داده شد. در مرحله بعد آزمایشهای افتراقی بر روی کلنی‌های اکسیژان مثبت صورت گرفت، سپس غلظتهای مشخصی از نانو ذره تهیه شد و در مرحله بعدی دیسکهای کاغذی را به آن غلظت‌ها آغشته و پس از آن از هر ایزوله باکتریایی طبق ۰/۵ مک فارلند سوسپانسیون تهیه شد. سپس در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت انبوه کشت داده شد. پس از انکوبه کردن هاله، عدم رشد بر حسب میلی‌متر در هر غلظت گزارش شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام گردید. **نتایج:** سوبه‌های باکتری تشخیص داده شده حاصل از کشت نمونه‌ها آب خام شامل ویبریو کلرا، ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو میمیکوس و ویبریو ولنیفیکوس بود. کمترین و بیشترین تعداد سوبه‌های ویبریو به ترتیب مربوط به ویبریو کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس بود. میزان حذف سوبه‌های ویبریو کلرا، ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو میمیکوس و ویبریو ولنیفیکوس در غلظت ۶۰۰ mg/L نانو ذره اکسید روی به ترتیب ۹۵٪، ۹۰٪، ۷۵٪ و ۷۰٪ بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به تأثیر معنی‌دار این نانو ذره در حذف جنس‌های ویبریو، لازم 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 صنعت آب استفاده گردد.

کلیدواژه‌ها: اکسید روی - ویبریو - بوشهر - خلیج فارس

نویسنده مسئول:

دکتر محمد ملکوتیان
گروه بهداشت محیط، دانشکده
بهداشت دانشگاه علوم پزشکی کرمان
کرمان - ایران
تلفن: ۰۵۱۰۲۲۰۳۳۱ ۹۸+
پست الکترونیکی:
m.malakootian@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۱/۷/۳ اصلاح نهایی: ۹۱/۱۲/۱۴ پذیرش مقاله: ۹۱/۱۲/۲۱

مقدمه:

پیشرفت در علم نانو تکنولوژی فرصتهای خوبی را جهت توسعه فرآیندهای تصفیه آب فراهم نموده است (۳،۴). مطالعه حذف عوامل بیماری‌زای موجود در منابع آب با استفاده از نانو ذرات به ویژه نانو اکسید روی، یکی از مهمترین پیشرفت‌ها در طی دهه اخیر است (۲،۴). امروزه کاربرد نانو تکنولوژی در زمینه‌های مختلف، در بسیاری از کشورها یکی از اولویتهای اصلی تحقیقاتی شده است، اکسیدهای فلزی نانوذرات در مقیاس وسیعی هم در صنعت و هم در موارد خانگی کاربرد دارند (۱،۵). در بین نانوذرات، نانو ذرات اکسید روی (ZnO) و اکسیدتیتانیوم

آب برای ادامه حیات ضروری است. آب آشامیدنی علاوه بر تأمین آب مورد نیاز جهت فعالیتهای حیاتی بدن، یکی از راههای تأمین املاح ضروری بدن نیز می‌باشد. کیفیت نامطلوب آب آشامیدنی و تصفیه ناقص آب از جمله مهمترین علل مرگ و میر به ویژه کودکان در سطح جهان است. مطابق گزارش سازمان جهانی بهداشت در هر ۸ ثانیه یک کودک و سالانه پنج میلیون نفر به ویژه کودکان در اثر مصرف آبهای آلوده به عوامل بیماری‌زا می‌میرند. حذف این عوامل از آبهای آشامیدنی، یکی از نگرانی‌های صنعت آب در سطح جهان است (۱،۲). امروزه

ساخت کارخانه مرک آلمان کشت و آنها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار در انکوباتور داده شدند. پس از رشد کلنی‌ها در محیط TCBS، تست اکسیداز انجام شد. از این مرحله به بعد تست‌های افتراقی که شامل (LDC) تست های لیزین دکربوکسیلاز، VP، ONPG، رشد در حضور نمک صفر و ۶ درصد، Acid from: D-cellobiose بود، جهت تشخیص نوع گونه‌ها بر روی کلنی‌های اکسیداز مثبت صورت گرفت (۱۴).

سنجش تأثیر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف نانوذرات به روش دیسک دیفیوژن بعد از تشخیص گونه‌ها غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی، روی آنها تأثیر داده شد. حداقل تعداد غلظت های موردنیاز نانوذرات برای تعیین سمیت طبق روش استاندارد، مدت ۵ غلظت است (۱۳) که در این تحقیق جهت نتایج بهتر، ۱۵ غلظت (۷۰۰۰، ۶۰۰۰، ۵۰۰۰، ۴۰۰۰، ۳۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۳۰، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) نانوذره اکسید روی ساخت کارخانه مرک آلمان استفاده شد. درجه خلوص نانو ذره مورد استفاده ۹۹ درصد، اندازه آن $50 \text{ nm} \geq$ و سطح ویژه آن $90 \text{ m}^2/\text{g}$ بود. گرچه اندازه نانو ذرات قبلاً توسط شرکت مرک آلمان مشخص شده بود، برای اطمینان بیشتر اندازه آنها مجدداً با استفاده از تکنیک میکروسکوپ الکترونی روبشی Scanning Electron Microscope (SEM) مجهز به سیستم Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDX) مدل

CamScan MV 2300 تأیید شد (شکل شماره ۱).

پس از تعیین و آماده سازی غلظت‌های مختلف نانو ذره آنها را با دیسکهای کاغذی آغشته نموده و پس از آن از هر ایزوله باکتریایی طبق ۰/۵ مک فارلند سوسپانسیون تهیه و در سطح محیط کشت مولر هیتون اگر (۳۴ گرم در یک لیتر آب مقطر، ساخت شرکت MERCK VM984550) به صورت انبوه در داخل پلیت کشت داده شد. سپس دیسک با پنس استریل روی محیط کشت قرار گرفت. پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس هاله عدم رشد هر کدام از گونه‌ها گزارش شد. جهت آنالیز و تعیین ارتباط خاصیت ضدباکتریایی و غلظت نانو ذرات از ضریب همبستگی پیرسن با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد.

نتایج:

مهمترین گونه‌های و بیبریو تشخیص داده شده مطابق با تستهای بیوشیمیایی در جدول شماره ۱ آورده شده است. از

(TiO₂) جزء مهمترین نانوذراتی هستند که در تصفیه بیولوژیکی آب و فاضلاب مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵-۸). مکانیسم‌های اصلی تأثیر نانو ذرات روی باکتریها از طریق آسیب به پروتئین، DNA و تخریب دیواره سلولی آنهاست (۳،۶،۹). تاکنون مطالعات زیادی در این زمینه صورت گرفته است. Mortimer و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در استونی نشان دادند که نانوذرات اکسید روی و اکسید مس قادر به حذف ۹۰/۶ تا ۹۹/۵ درصد آلاینده‌های میکروبی می‌باشند (۱۰). در مطالعه دیگر که توسط Raffia و همکاران در سال ۲۰۱۰ در پاکستان انجام شد، مشخص گردید که نانو ذرات اکسید مس قادر به نابود کردن ۹۳ درصد باکتری اشرشیاکلی است (۱۱). همچنین در مطالعه دیگری که توسط Shantikumar و همکاران در سال ۲۰۰۹ در هند انجام گرفت، مشخص شد که نانو ذره اکسید روی خاصیت ضد باکتریایی قوی دارد (۱۲). Margit Heinlaan و همکاران در سال ۲۰۰۸ در استونی حذف باکتری و بیبریو توسط نانو ذره اکسید روی را مؤثر دانستند (۵).

این مطالعه به منظور تعیین تنوع گونه باکتریایی و بیبریو از آب سواحل بندر بوشهر و حذف آنها بوسیله نانو ذره اکسید روی جهت مشخص نمودن درجه تصفیه‌پذیری این باکتری با نانو ذره اکسید روی انجام گرفت.

روش کار:

در این مطالعه تجربی، تعداد ۱۰۰ نمونه (۲۵۰ سی سی) از آب سواحل خلیج فارس در استان بوشهر در مناطق مختلف ساحلی از عمق ۲۰ سانتی متری آب در طول هر ۳۰۰ متر برداشت شد. نمونه برداری در فاصله زمانی فروردین لغایت اسفند سال ۱۳۹۰ انجام شد. نمونه ها در کوتاهترین زمان، طبق روشهای مندرج در کتاب روش‌های استاندارد آزمایش آب و فاضلاب شماره (8010 D) به آزمایشگاه منتقل و آزمایشات لازم مطابق ذیل روی آنها انجام گردید (۱۳).

جهت تشخیص گونه‌های و بیبریو در شرایط استریل ۱۰ سی سی از هر نمونه آب توسط پیپت استریل به لوله آزمایش منتقل شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۳ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. سپس یک سی سی از محلول زیرین هر لوله آزمایش به ۹ سی سی محیط آب پپتون قلیایی با یک درصد نمک منتقل شد و محیطها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد بر روی محیط‌های آگار Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS)

نتایج نشان می‌دهد که بین غلظت نانوذره و درصد حذف باکتری ارتباط مستقیم وجود دارد که این ارتباط از نظر آماری نیز معنی‌دار است ($P < 0.05$).

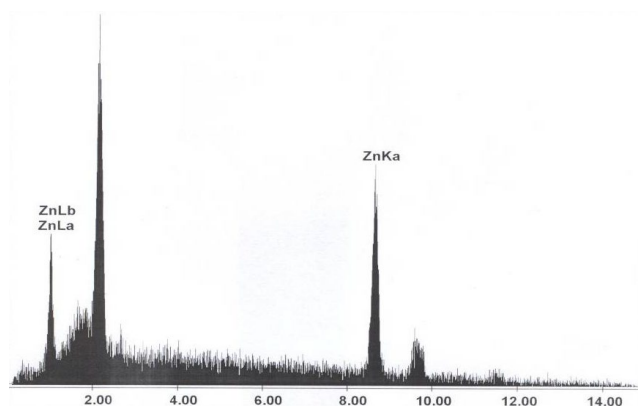
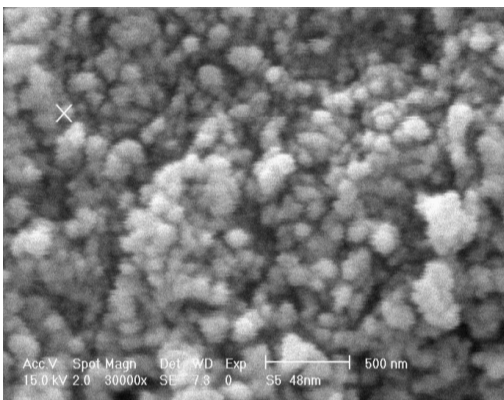
جدول شماره ۱- گونه‌های ویبریو تشخیص داده شده از آبهای ساحلی خلیج فارس

بaktery	تعداد نمونه‌های حاوی گونه‌های مختلف ویبریو	درصد در نمونه‌ها
ویبریو کلرا	۱۰	۱۸/۲
ویبریو پاراهمولیتیکوس	۱۸	۳۲/۷
ویبریو میمیکوس	۱۴	۲۵/۵
ویبریو لنینیفیکوس	۱۳	۲۳/۶
مجموع	۵۵	۱۰۰

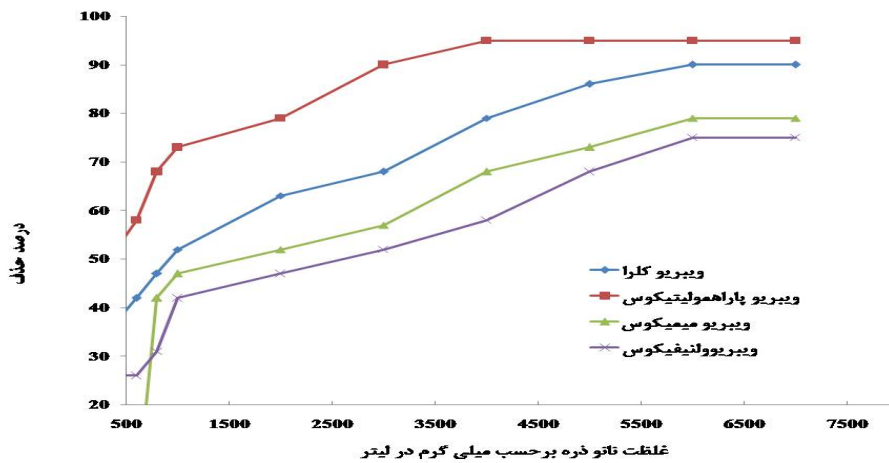
مجموع ۱۰۰ نمونه گرفته شده آب خام، ۵۵ نمونه حاوی گونه‌های مختلف ویبریو بودند. کمترین و بیشترین گونه ویبریو تشخیص داده شده به ترتیب مربوط به ویبریو کلرا و ویبریو پاراهمولیتیکوس بود. پس از اثر دادن غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی بر روی گونه‌های مختلف ویبریو، درصد حذف هر کدام از آنها مطابق شکل شماره ۲ بدست آمد. غلظت بدون اثر بازدارنده (NOEC) نانوذره اکسید روی بر روی گونه‌های ویبریو کلرا، ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو میمیکوس و ویبریو لنینیفیکوس به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر بدست آمد. در غلظت ۶۰۰۰ میلی گرم در لیتر از نانوذره درصد حذف کلیه گونه‌ها متوقف شد. در همین غلظت درصد حذف ویبریو کلرا، ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو میمیکوس و ویبریو لنینیفیکوس به ترتیب ۹۰، ۹۵، ۷۹ و ۷۵ درصد بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲- هاله عدم رشد گونه‌های مختلف ویبریو بر حسب میلی‌متر تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید روی

گونه	غلظت (mg/L)														
	۷۰۰۰	۶۰۰۰	۵۰۰۰	۴۰۰۰	۳۰۰۰	۲۰۰۰	۱۰۰۰	۸۰۰	۶۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۳۰	۱۰
ویبریو کلرا	۱۹	۱۹	۱۷	۱۵	۱۳	۱۲	۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۰	۰	۰
ویبریو پاراهمولیتیکوس	۱۸	۱۸	۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۱	۱۰	۱۰	۸	۶	۰	۰	۰	۰
ویبریو میمیکوس	۱۵	۱۵	۱۴	۱۳	۱۱	۱۰	۹	۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
ویبریو لنینیفیکوس	۱۴	۱۴	۱۳	۱۱	۱۰	۹	۸	۶	۵	۵	۴	۰	۰	۰	۰



شکل ۱: تصویر الکترونی نانوذره ZnO (SEM) مجهز به سیستم Energy Dispersive X-ray (EDX) spectroscopy



بحث و نتیجه‌گیری:

نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌های آب سواحل خلیج فارس در بندر بوشهر نشان داد که این منبع آب حاوی گونه‌های متنوعی از باکتری ویبریو است، مقایسه گونه‌های ویبریو نشان داد که هر سویه باکتری، مقاومت خاصی از خود در مقابل نانو اکسید روی نشان می‌دهد. بنابراین شدت اثر سمیت یا اثر ضدباکتریایی نانو ذره اکسید روی به نوع و گونه باکتری بستگی دارد. همچنین رابطه مستقیم بین غلظت نانو ذره و درصد حذف باکتری نشان داده شد که با مطالعه Malakootian و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایران که تأثیر نانوذرات را در حذف باکتریهای گرم مثبت و منفی از فاضلاب شهری توسط نانوذرات اکسید روی، اکسید تیتانیوم و اکسید مس، مورد بررسی قرار داده بودند، مطابقت دارد (۱۵). با افزایش غلظت نانو ذره میزان کشندگی یا هاله عدم رشد در کلیه گونه‌های ویبریو به دلیل افزایش سطح تماس دیواره سلولی باکتری با نانو ذره افزایش یافت و این نتیجه با تحقیق انجام شده توسط Khanjani و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایران که اثر نانو ذرات مختلف بر روی باکتریهای عامل عفونت بیمارستانی انجام شده بود، همخوانی کامل داشت (۱۶). مکانیسم پاسخ‌های متفاوت به دوزهای مشابه نانوذرات در بین گونه‌های ویبریو به دلیل تفاوت فیزیولوژیکی، متابولیسم‌های درون باکتریایی و نفوذپذیری انتخابی غشاهای دیواره سلولی آنها می‌باشد.

در پژوهش حاضر، غلظت بدون اثر بازدارندگی رشد (NOEC) No Observed Effect Concentration برای گونه‌های ویبریو کلرا، ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو میمیکوس و ویبریو ولنیفیکوس به ترتیب ۱۰۰، ۲۰۰، ۸۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و در غلظت ۶۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو اکسید روی کلیه گونه‌های ویبریو ۷۵ الی ۹۵ درصد حذف شدند (شکل شماره ۲). نتایج بدست آمده با مطالعه‌ای که توسط Adams و همکاران صورت گرفت، متفاوت بود. به طوری که طی مطالعه آنها غلظت بازدارنده رشد در حدود ۵۰ درصد از باکتریهای اشرشیاکلی در غلظت ۱۰۰۰ ppm از نانوذرات ZnO بود که این تفاوت علاوه بر اختلافات ژنتیکی و گونه‌ای باکتریهای استفاده شده توسط هر دو گروه، به علت تفاوت در ساختار نانو ذره و روش اجرای آزمایشات می‌باشد (۱۷). بنابراین در روشهای مختلف تعیین تأثیر یک ماده واحد، تستی که سمیت بیشتری را نشان دهد، ضریب اطمینان بالاتری دارد، به طوری که تکیه بر نتایج آن می‌تواند اطمینان بالاتری جهت پیش‌بینی اثرات آن بر روی میکروارگانیسم‌ها ایجاد کند. با توجه به تأثیر زیاد این نانو ذره در حذف گونه‌های ویبریو به ویژه پاراهمولیتیکوس که بیشترین تأثیرپذیری را داشت، 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 صنعت آب استفاده گردد. پیشنهاد می‌شود، در مورد

تأثیر نانوذرات (که در محیط‌های آبی قابلیت چسبندگی و ته‌نشینی دارند) همزمان از روشهایی که در آنها نانوذرات در یک محیط غیرمایع، ثابت شده باشند نیز استفاده شود تا اثرات ضد میکروبی نانوذرات بهتر آشکار گردد.

سپاسگزاری:

این پژوهش در مرکز تحقیقات بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه مذکور به انجام رسیده است. بدینوسیله از کلیه دست‌اندرکاران آن معاونت سپاسگزاری به عمل می‌آید.

References

منابع

1. Christensen P, Curtis TP, Egerton TA, Kosa SAM, Tinlin JR. Photoelectrocatalytic and photocatalytic disinfection of E. coli suspensions by titanium dioxide. *Applied Catalysis B*. 2003;41:371-386.
2. Pilar F. Solar disinfection of drinking water, Innovative Processes and Practices for Wastewater Treatment and Re-use. *Innova-Med*. 2007;6:8-11.
3. Belapurkar AD, Sherkhane P, Kale SP. Disinfection of drinking water using photocatalytic technique. *Current Science*. 2006;91:73-76.
4. Raina M. Environmental Microbiology Academic Press; 2000:491-493.
5. Heinlaan M, Iva SKA, Blinova I, Dubourguier HC, Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans. *Daphnia Magna and Thamnocephalus Platyrus*. 2008;71:1308-1316.
6. Andrew M, Evan M. The nanotechnology consumer products inventory Woodrow Wilson. *International Center for Scholars*. 2005;57:614-624.
7. Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Pu nnoose A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl Phys Lett*. 2007;90:2139021-2139023.
8. Wang X, Lu J, Xu M, Xing B. Sorption of Pyrene by Regular and Nanoscaled Metal Oxide Particles Influence of Adsorbed Organic Matter. *Environ Sci Technol*. 2008;42: 7267-7272.
9. Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*. 2005;213:66-73.
10. Mortimer M, Kasemets K, Kahru A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology*. 2010;269:182-189.
11. Raffi M, Mehrwan S. Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichiacoli*. *Ann Microbiol*. 2010;60:75-80.
12. Nair S, Sasidharan A, Diyya Rani VV, Menon D, Nair S, Manzoor K, et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20:235-241.
13. APHA (American Public Health Association) A.A.W.W.A and WEF (Water Environment Federation) Standard methods for the examination of water and wastewater 2005: Washington DC USA.

14. Forbes AB, SAhm DF, Weissfeld AS. Diagnostic microbiology. London: Bailey & Scott's Press; 2007:750-790.
15. Malakootian M, Toolabi A. Determining and comparing the effect of nanoparticle CuO, TiO₂ and ZnO in removing gram positive and negative bacteria from Wastewater. *Toloo-e-Behdasht*. 2010;9:1-10. [Persian]
16. Toolabi A, Ahmadian M, Khanjani N, Javadi A, Hashemi M, Rajabizadeh A, et al. CuO, TiO₂ and ZnO Nanoparticles for Disinfecting contaminated Hospital Surfaces. *Word Applaid Sciences*. 2011;13:1827-1832.
17. Adams LK, Lyon D, Alvarez PJ. Comparative eco-toxicity of nonoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res*. 2006; 40: 3527-3532.