Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 5 (November -December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

# Antibacterial Activities of Copper Oxide (CuO) Nanoparticles in Combination With Nisin and Ultrasound Against Foodborne Pathogens

**Mahboubeh Mirhosseini[1], Samaneh Houshmand Marvasti [2]**

1.Department of Biology, Payame Noor University, Iran
2.Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran

## *Article Information*

**Article history:**
Received: 2017/07/26
Accepted: 2017/10/25
Available online: 2017/11/20

**Article Subject:**
Antimicrobial Substance

**IJMM 2017; 11(5): 125-135**

**Corresponding author:**

**Mahboubeh Mirhosseini**

**Department of Biology, Payame Noor University, Yazd, Iran**

**Tel: 0983535216134**

**Email:**
**m.mirhossaini@gmail.com**

## *Abstract*

**Background and Aims:** Recently inorganic nano materials characterized with high level thermal stability and new physical and chemical properties were considered for antimicrobial therapy. One of the important feature of nanoparticles is their antimicrobial activity against bacteria and food borne pathogens. The aim of this study was to investigate antibacterial activities of copper oxide nanoparticles in combination with nisin and ultrasound against foodborne pathogens.

**Materials and Methods:** The antibacterial properties of copper oxide nanoparticles (CuO NP) were investigated alone or in combination with other antimicrobials (nisin and ultrasound stimulation) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in culture media and milk. Also effect of nanoparticle were investigated by scanning electron microscopy individually and combination of CuO and Nisin on morpholohy of *S. aureus* and *E. coli* bacteria.

**Results:** The results show that there was an increasing synergistic effect between CuO NP in combination with nisin. However, the addition of ultrasound stimulation to CuO NP did not enhance the antibacterial activity of CuO. The results show that combined effect of copper oxide nanoparticles and nisin in milk medium were reduced the growth of bacteria. Also the results of the SEM were revealed that CuO nanoparticles and nisin leads to significant change in cell morphology and membrane integrity on bacteria and could be the cause of cell death.

**Conclusions:** Copper oxide nanoparticles and nisin with regard to the allowed concentration, have a significant effect on the bacteria and perhaps they can be used in food industry, pharmaceutical can be used.

**KeyWords:** Nanoparticles, Copper oxide, Nisin, ultrasound stimulation, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Electron microscopy.

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

**How to cite this article**:

Mirhosseini M, Houshmand Marvasti S. Antibacterial Activities of Copper Oxide (CuO) Nanoparticles in Combination With Nisin and Ultrasound Against Foodborne Pathogens. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (5) :125-135

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۵ – آذر و دی ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

# بررسی خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسید مس به همراه نایسین و امواج فراصوت در برابر باکتری‌های پاتوژن منتقله از طریق مواد غذایی

محبوبه میرحسینی[۱]، سمانه هوشمند مروستی[۲]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، ایران

۲. مرکز تحقیقات زیست‌فناوری پزشکی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، یزد، ایران

**اطلاعات مقاله**

**تاریخچه مقاله**

**دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۰۴**

**پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۰۳**

**انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۸/۲۹**

**موضوع:**

مواد ضدمیکروبی

**IJMM1396;11(5): 125-135**

**نویسنده مسئول:**

**محبوبه میرحسینی**

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، یزد، ایران

**تلفن:** ۰۳۵۳۵۲۱۶۱۳۴

**پست الکترونیک:**

**m.mirhossaini@gmail.com**

## چکیده

**زمینه و هدف:** اخیراً نانومواد غیر آلی با ثبات دمایی بالا و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی جدید برای درمان ضدمیکروبی در نظر گرفته شده‌اند. یکی از ویژگی‌های مهم نانوذرات، فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها در برابر باکتری‌ها و عوامل پاتوژن غذایی است. هدف از این مطالعه بررسی خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسید مس به همراه نایسین و امواج فراصوت در برابر باکتری های پاتوژن منتقله از طریق مواد غذایی می باشد.

**مواد و روش کار:** در این پژوهش خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسید مس به‌تنهایی یا در ترکیب با عوامل ضدمیکروبی دیگر (نایسین و امواج فراصوت) علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس۶اورئوس* در محیط کشت و شیر بررسی گردید. سپس اثر نانوذرات اکسید مس و نایسین به‌صورت منفرد و توأم بر مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس۶اورئوس* با میکروسکوپ الکترونی ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که یک اثر هم‌افزایی در زمان ترکیب نانوذرات اکسید مس و نایسین وجود داشت. به‌هرحال افزودن امواج فراصوت به نانودرات اکسید مس خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسید مس را افزایش نداد. یافته‌های پژوهش نشانگر آن است که در محیط شیر، اثر ترکیبی نانو ذرات اکسید مس و نایسین باعث کاهش رشد هر دو باکتری شده بود. همچنین نتایج میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذرات اکسید مس و نایسین تغییرات قابل‌توجهی بر مورفولوژی و یکپارچگی غشاء باکتری‌ها داشته و درنهایت منجر به مرگ سلول باکتری شده‌اند.

**نتیجه‌گیری:** نانوذرات اکسید مس و نایسین با توجه به غلظت‌های مجاز، بر باکتری‌های آزمایش‌شده اثر بسیار زیادی دارند و شاید بتوان در آینده در صنایع غذایی و داروسازی از ترکیب نانوذرات اکسید مس و نایسین استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** نانوذرات، اکسید مس، نایسین، امواج فراصوت، میکروسکوپ الکترونی، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

## مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها جزء داروهایی هستند که در طب مدرن اغلب برای درمان بیماری‌ها تجویز می‌شوند. متأسفانه ظهور باکتری‌های مقاوم باعث ایجاد مشکلات درمانی در بیمارستان‌ها شده است. در اروپا هرساله حدود ۲۵۰۰۰ مرگ‌ومیر در اثر عفونت‌های ایجادشده توسط باکتری‌های مقاوم به چند دارو رخ می‌دهد (۱)؛ بنابراین توجه عمومی به سمت نانومواد که امروزه به‌سرعت استفاده از آن‌ها در حال پیشروی است، برای مقابله با آلودگی‌های باکتریایی، جلب شده است. ذرات نانومس در کشتن طیفی از باکتری‌ها که در عفونت‌های بیمارستانی دخالت دارند، مؤثر بوده‌اند و مطالعاتی برای ارزیابی پتانسیل نانوذرات اکسید مس قرارگرفته در طیفی از مواد پلی‌مری انجام شده است. در مقایسه با توانایی انتشار کشتار، توانایی کشتار تماسی کمتری در برابر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به پنی سیلین دیده شده است. این امر نشان می‌دهد که آزادسازی یون‌ها به درون محیط موضعی برای فعالیت ضدمیکروبی بهینهٔ نانوذرات اکسید مس مورد نیاز است (۲).

دو شکل معمول اکسید مس، کوپروس اکساید ($Cu_2O$) و کوپریک اکساید ($CuO$) هستند (۳). کوپریک اکساید یک نیمهٔ رسانای نوع P با ساختار شبکهٔ تک‌میلی (Monoclinic) دارای باند انرژی ۱/۲-۱/۷ ev در دمای اتاق و با پارامترهای شبکهٔ $a=4.6837\ A$ ،$b=3.4226A$ ،$c=1.1288\ A$ و $\beta=99.54°$

است (۴)، اما کوپروس اکساید یک نیمهٔ رسانای نوع p با ساختار شبکهٔ مکعبی با گاف انرژی مستقیم en ۲/۰ است (۵-۴). ویژگی های بسیار خوب اکسید مس موجب شده تا از آن در کاربردهای مختلفی همچون کاتالیست‌های غیرمتجانس، حس‌گرهای گازی، سوئیچ‌های نوری، سلول‌های خورشیدی، رسانه‌های ذخیرهٔ مغناطیسی، ابزار نشر میدان و همانند این‌ها استفاده شود (۸-۶). نانو مواد اکسیدی همچون CuO و $Cu_2O$، اکسید آهن ($Fe_2O_3$, $Fe_3O_4$) و اکسید روی (ZnO) دارای ویژگی‌های فیزیکی- شیمیایی منحصربه‌فردی هستند که ناشی از تأثیر اندازهٔ کوانتومی و سطح مؤثر گسترده آن‌هاست؛ به‌طوری این خصوصیات باعث می‌شود که خواص آن‌ها که با حالت تودهٔ آن‌ها متفاوت باشد (۹-۸).

نایسین در سال ۱۹۲۸ توسط Rogers و گروه کاریی‌اش کشف شد. اثر باکتریوسیدی نایسین در برابر اکثر باکتری‌های اسیدلاکتیک تأیید شده است. طی چند دههٔ اخیر گرایش روزافزونی برای استفاده از باکتریوسین‌ها به‌عنوان مواد نگهدارندهٔ طبیعی، گزارش شده است. در این میان به نایسین حاصل از گونه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* بسیار توجه شده است؛ به دلیل اینکه مانع از رشد بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت، همچون پاتوژن‌ها و آلوده‌کننده‌های مواد غذایی، میکروارگانیسم‌های مولّدِ فساد و برخی از باکتری‌های گرم منفی (که دچار آسیب‌دیدگی غشاء بیرونی شده‌اند) می‌شود. این ترکیب همچنین می‌تواند از از جوانه‌زنی اسپورها جلوگیری کند (۱۱-۱۰).

از میان روش‌های کنترل میکروارگانیسم‌ها، استفاده از امواج فراصوت یکی از روش‌هایی است که از گذشته برای غیرفعال کردن و کنترل باکتری‌ها استفاده شده است (۱۲). مطالعات زیادی در مورد غیرفعال کردن باکتری‌ها توسط امواج فراصوت (۱۴- ۱۳) و ترکیب امواج فراصوت با عوامل ضدمیکروبی دیگر وجود دارد (۱۶-۱۵).

در مطالعات مختلف، خواص ضدمیکروبی این فلزات و استفادهٔ مفید از آن در زمینهٔ بیوتکنولوژی و مهار اختصاصی میکروب‌ها بررسی شده است؛ بنابراین در مطالعهٔ پیش رو، فعالیت‌های ضدباکتری ترکیب نانوذرات CuO با امواج فراصوت یا نایسین در محیط کشت و شیر ارزیابی شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضدمیکروبی ترکیب نانوذرات CuO با امواج فراصوت یا نایسین برنامه‌های کاربردی بالقوهٔ آن‌ها در مهار دو پاتوژن مواد غذایی بوده که از نقاط قوت این پژوهش است؛ زیرا استفاده از ترکیب عوامل ضدمیکروبی مختلف به‌صورت هم‌زمان، احتمال ایجاد مقاومت میکروبی را کم می‌کند.

## مواد و روش‌ها

### محیط کشت و باکتری‌های استفاده‌شده

سویه‌های باکتری استفاده‌شده در این آزمایش شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC۱۴۳۱) و *اشریشیاکلی* (PTCC۱۳۹۴) بود. باکتری‌های نامبرده از کلکسیون میکروبی ایران تهیه شد. آمپول‌های باکتری‌های نامبرده تا زمان مورداستفاده در دمای ۸۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. باکتری‌ها بر روی محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار (لیوفیلکم ایتالیا) کشت و در ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شدند و تا زمان استفاده در ۰ تا ۲ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. نانوذرات اکسید مس از SIGMA-ALDRICH آمریکا با قطر کمتر از ۵۰ نانومتر و نایسین به‌صورت تجاری از شرکت SIGMA-ALDRICH آمریکا خریداری شد. این مطالعه به‌صورت تجربی آزمایشگاهی در زمستان ۱۳۹۴ انجام شده است.

### تعیین MIC

سوسپانسیون نایسین با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. نیم میلی‌لیتر از محیط کشت تریپتیکاز سوی براث در لوله‌ها ریخته شد. نیم میلی‌لیتر از ماده به لولهٔ شمارهٔ یک ریخته شد. نیم میلی‌لیتر از لولهٔ اول به لولهٔ دوم منتقل شد و این کار تا انتقال به لولهٔ شاهد ادامه یافت. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری ($10^7$ cell/mL) به تمام لوله‌ها افزوده شد. آخرین لوله که حاوی تریپتیکاز سوی براث (لیوفیلکم ایتالیا؛ TSB) و سوسپانسیون باکتری بود، به‌عنوان لولهٔ کنترل در نظر گرفته شد. لوله‌های آماده‌شده به مدت یک شب در انکوباتور با دمای ۳۵ تا ۳۷ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. پس از انکوباسیون، کمترین غلظت عامل ضدمیکروبی که از رشد میکروارگانیسم جلوگیری کرده بود، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. بدین منظور از دستگاه اسپکتروفتومتر برای سنجش میزان جذب نوریِ هر لولهٔ آزمایش استفاده شد. دستگاه روی طول موج ۶۰۰ نانومتر تنظیم شد و آنگاه میزان جذب نوری محلول‌ها تعیین شد. بدین صورت که شفاف‌ترین لوله‌ای که حاوی رقیق‌ترین محلول ضدمیکروبی (نسبت به لولهٔ شاهد) بود، مشخص و غلظت آن محاسبه شد و با واحد میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

### روش تعیین MBC

در روش استاندارد (مرجع) پس از انجام تست رقیق‌سازی و تعیین MIC، از هر لوله‌ای که عدم رشد را نشان می‌دهد، ۵۰

میکرولیتر برداشته و بر روی محیط کشت TSA برده شد. کشت سطحی داده پس از قرار دادن پلیت ها به مدت یک شب و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس در انکوباتور ، تعداد کلنی‌های رشدیافته بر روی پلیت ها شمارش شدند. پس از یک شب گرماگذاری در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس، پلیتی که حاوی رقیق‌ترین محلول کلوئیدال بود و تعداد کلنی‌ها به میزان یک‌هزارم رسیده بود، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۷).

**بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات اکسید مس و امواج مافوق صوت**

محیط TSB حاوی (۲ و ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس تهیه شد، سپس این ارلن‌هایِ حاوی محیط‌های TSB به‌صورت جداگانه با $10^7$ cell/mL باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *یا اشریشیاکلی*، تلقیح شدند و این ارلن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه درون حمام اولتراسونیک جای گرفتند. پس از انجام تیمار امواج فراصوت، ارلن‌ها در ۵۰ دور در دقیقه در ۳۷ درجهٔ سلسیوس تکان داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، از هرکدام از نمونه‌ها سری رقت تهیه شد و تعداد باکتری‌ها به روش شمارش کلنی شمارش شد (۱۹-۱۸).

**بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات اکسید مس و نایسین بر روی منحنی رشد باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس-اورئوس* در محیط‌کشت مایع**

برای بررسی اثر نانوذرات اکسید مس و نایسین در محیط کشت مایع، از محیط کشت تریپتیکازسوی‌براث (TSB) استفاده شد. ابتدا ۹ ارلن برای هر باکتری در نظر گرفته شد. آنگاه غلظت-های (۲ و ۴) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اکسید مس و غلظت‌های (۰/۰۱ و ۰/۰۰۸) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نایسین به‌تنهایی و غلظت‌های توأم (۲ اکسید مس + ۰/۰۰۸ نایسین، ۲ اکسید مس + ۰/۰۱ نایسین، ۴ اکسید مس + ۰/۰۱ نایسین، ۴ اکسید مس + ۰/۰۰۱ نایسین) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ارلن‌های مربوط افزوده شد. برای هر باکتری یک ارلن به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد که فقط شامل محیط کشت استریل و بدون هیچ‌گونه نانوذرات است. سپس به هرکدام از ارلن‌ها به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی ($10^7$ cell/mL) که از پیش آماده شده بود، تلقیح شد و ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شد. میزان رشد باکتری‌ها به روش شمارش کلنی در حضور غلظت‌های موردنظر نانوذرات اکسید مس و نایسین در ۲۴ ساعت هر ۲ ساعت تعداد باکتری ها تعیین شد. بدین ترتیب که در هر زمان ۱ میلی‌لیتر از محتویات ارلن ها برداشت شد و از آن سری رقت تهیه شد و بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت TSA کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شد و میزان رشد پس از ۲۴ ساعت یک بار بررسی شد (۲۰).

**بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات اکسید مس، نایسین و حرارت ملایم به‌صورت توأم بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* در مواد غذایی**

**تهیهٔ سوسپانسیون باکتریایی**

سوسپانسیون باکتریایی از کشت تازهٔ سویه‌های استاندارد خریداری‌شده تهیه شد. حدود ۵ کلنی از باکتری‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *اشریشیاکلیِ* رشدکرده بر روی محیط TSA برداشته شد و در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیکاز سوی براث استریل به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی هر باکتری برداشت شد و با دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. آنگاه محلول رویی دور ریخته شد و به تودهٔ سلولیِ به‌دست‌آمده به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی افزوده شد. این کار سه بار تکرار شد. بدین‌گونه مخلوط دو باکتری در سرم فیزیولوژی تهیه شد.

**بررسی اثر ضدمیکروبی نانوذرات اکسیدمس، نایسین و حرارت ملایم به‌صورت توأم بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* در شیر**

برای بررسی اثر نانوذرات بر باکتری‌ها در مواد غذایی از شیر استفاده شد. بدین ترتیب که طبق محاسبات انجام‌شده، به‌جای محیط کشت از شیر بهره برده شد و نانوذرات و سوسپانسیون باکتریایی ($10^7$ cell/mL) به آن‌ها افزوده شد و رشد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله ۱۲ ارلن در نظر گرفته شد که برای سه دمای متفاوت ۴ ارلن مورد نیاز بود. نانوذرات اکسید مس و نایسین با غلظت‌های (۰/۰۰۸ نایسین، ۰/۰۱ اکسیدمس و ۲ اکسید مس + ۰/۰۱ نایسین) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر ارلن افزوده شد.

در ادامه پس از تلقیح ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی که از قبل آماده شده بود، ارلن‌ها در شرایط دمایی مختلف قرار داده شدند. بدین ترتیب که دستهٔ اول از ارلن‌ها در دمای محیط و دستهٔ دیگر از سری ارلن‌ها در دمای ۵۰ درجهٔ سلسیوس و دستهٔ سوم در دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. برای بهینه‌سازی شرایط دمایی، از حمام آب استفاده شد. سپس طی ۲۴ ساعت، هر ۳ ساعت، از هرکدام از نمونه‌ها سری رقت تهیه شد و تعداد باکتری‌ها به روش شمارش کلنی شمارش

شد. محیط EMB (ائوزین متیلن بلو آگار، مرک، آلمان) و MSA (مانیتول سالت آگار، مرک، آلمان) به ترتیب برای شمارش *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد (۲۱).

**بررسی اثر توأم نانوذرهٔ اکسید مس و باکتریوسین نایسین بر مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌وسیلهٔ میکروسکوپ الکترونی**

برای بررسی اثر توأم نانوذرات اکسید مس و نایسین بر مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*، از محیط کشت TSB استفاده شد.

مقدار ۰/۰۱ mg/mL نایسین و ۴ mg/mL نانوذرهٔ اکسید مس و ۰/۰۱mg/mL نایسین با ۴ mg/mL نانوذرهٔ اکسید مس به‌صورت ترکیبی به محیط کشت مایع حاوی باکتری *اشریشیاکلی* و یا *استافیلوکوکوس اورئوس* افزوده شدند. پس از ۲۴ ساعت، ۱ میلی‌لیتر از هر لوله نمونه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. آنگاه ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های سلولی روی ورق میکا برده شد. پس از خشک شدن میکاها در مجاورت هوا به مدت ۴۵ دقیقه، میکاها با یک محلول ثابت‌کنندهٔ ۲/۵٪ گلوتارآلدئید و ۰/۰۱ مولار بافر ایمیدازول (pH ۷/۲) به مدت ۲ ساعت تثبیت شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از محلول ۰،۱ مولار بافر ایمیدازول تثبیت شدند. در ادامه نمونه‌ها با استفاده از غلظت‌های متفاوتی از محلول‌های اتانول ۵۰،۸۰ و ۱۰۰ درصد آبگیری شدند. ورقه‌های میکا حاوی نمونه‌های مورد آزمایش روی پایهٔ SEM با زبانه‌های چسبناک کربن نصب شدند، پس از آن پوشش‌های تک‌لایه طلا برای کوت کردن روی نمونه‌ها افزوده شدند و سپس تصاویر سلول‌های باکتریایی *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تیمار شده و تیمار نشده با میکروسکوپ الکترونی PHENOM PROX با بزرگنمایی ۲۵۰۰۰ گرفته شدند (۲۲).

**آنالیزهای آماری**

آزمایش‌ها مختلف در سه تکرار انجام شد و اثرات غلظت‌های متفاوت اکسید مس و ترکیب اکسید مس با نایسین و امواج فراصوت بر میزان رشد باکتری‌ها به‌وسیلهٔ ANOVA یک‌طرفه بررسی شدند. درصدهای به‌دست‌آمده در تست ANOVA برای تعیین اختلافات معنی‌دار بین میانگین‌های گروه‌ها مقایسه شدند. post hoc analysis برای مقایسه‌های چندگانه با درجهٔ اطمینان ۹۵٪ به کار رفت. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار Spss انجام گرفت. P values < ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

**تعیین حداقل غلظت بازداری (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) نایسین برای باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس***

جدول ۱ نتایج مربوط به مقدار MIC و MBC نایسین بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت مایع را نشان می‌دهد. مقدار MIC علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی* ۰/۰۱۷ mg/mL است. مقدار MIC علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* ۰/۰۱ mg/mL است. هم‌چنین مقدار MBC نایسین برای باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۰/۰۲ mg/mL و ۰/۰۱۵ است.

جدول ۱. مقادیر حداقل غلظت بازداری (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) نایسین برای باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

| | MIC | MBC |
|---|---|---|
| *اشریشیا کلی* | ۰/۰۱۷ | ۰/۰۲ |
| *استافیلوکوکوس اورئوس* | ۰/۰۱ | ۰/۰۱۵ |

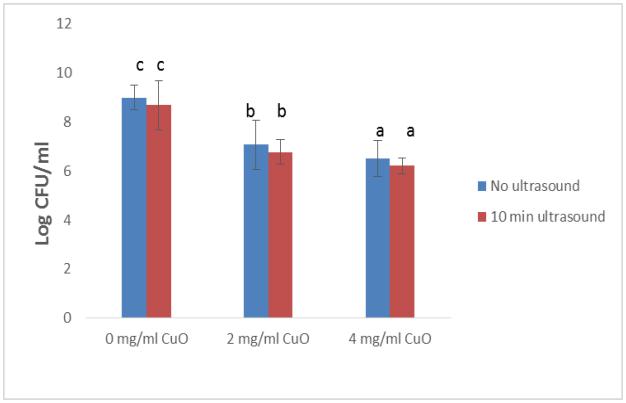
**اثرات ضدباکتری نانوذرات اکسید مس و امواج فراصوت**

ترکیب نانوذرات اکسید مس با امواج فراصوت اثری روی افزایش خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسید مس نداشت (شکل ۱).

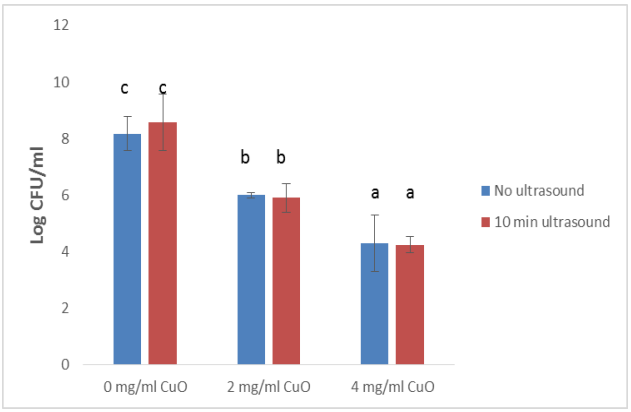
**بررسی اثر نانوذرات اکسید مس و نایسین بر روی منحنی رشد باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت مایع**

در این پژوهش از آزمون آماری ONE WAY ANOVA استفاده شده است. پس از مشخص شدن خطای انحراف معیار، میزان اختلافات معنادار میانگین‌ها (استفاده از نانوذرات) با کنترل (بدون نانوذرات) ۰/۷ Pvalue تعیین و محاسبه شده است. نتایج حاکی از معنادار نبودن این تیمارها طی ۲۴ ساعت است. شکل ۲ اثر نانوذرات اکسید مس و نایسین در غظت‌های مختلف علیه باکتری *اشریشیاکلی* را نشان می‌دهد. داده‌های پژوهش نشان می‌دهد که نانوذرات اکسید مس و نایسین در غلظت‌های (۰/۰۱ نایسین +۴ اکسید مس، ۰/۰۰۸ نایسین +۴ اکسیدمس، ۴ اکسیدمس) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تأثیر مطلوبی بر کاهش رشد باکتری *اشریشیاکلی* دارند. آن‌چنان‌که در این نمودار دیده می‌شود، نانوذرات در غلظت (۰/۰۰۸ نایسین +۴ اکسید مس)

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را بر باکتری *اشریشیاکلی* دارد.



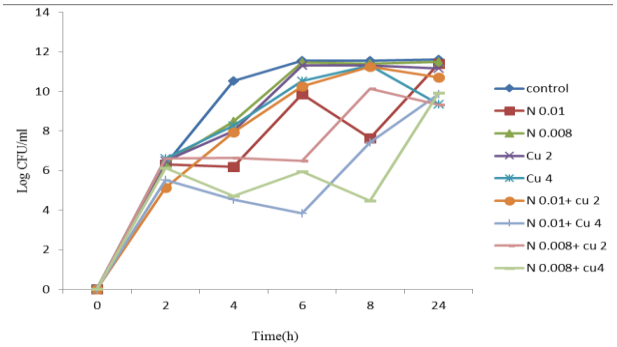

الف



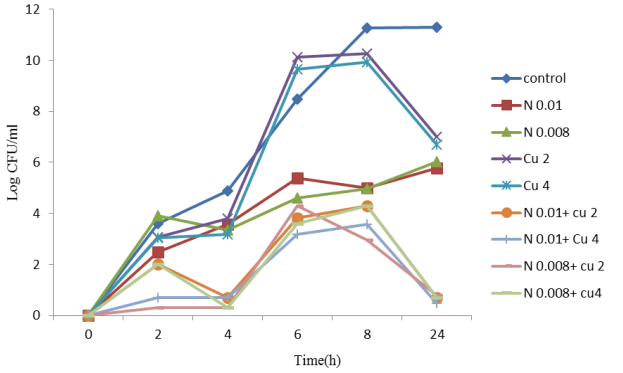

ب

**شکل ۱. اثر نانوذرات اکسید مس و محرّک امواج فراصوت بر *استافیلوکوکوس اورئوس* (الف) و *اشریشیاکلی* (ب) ارزش متوسط± SEM؛ N=۳ ❋ P<۰/۰۵ (نسبت به شاهد). حروف متفاوت (a, b,c) نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش‌شده است.**

شکل ۳ نتایج حاصل از تأثیر نانوذرات اکسید مس و نایسین علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان می‌دهد. پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ONE WAY ANOVA و مشخص شدن خطای انحراف داده‌ها( ۰/۰۱ =Pvalue )مشخص شد که نانوذرات اکسید مس و نایسین تأثیر مطلوبی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد. این نتایج نشان می‌دهد که غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۰۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نایسین و غلظت‌های ترکیبی ۰/۰۱ نایسین +۲ اکسید مس، ۰/۰۱ نایسین +4 اکسید مس، ۰/۰۰۸ نایسین + ۲ اکسیدمس و ۰/۰۰۸ نایسین + ۴ اکسید مس میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تأثیر مطلوبی بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند. همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد که باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتری نسبت به باکتری *اشریشیاکلی* در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین در مقایسه با گروه کنترل دارد.




**شکل ۲. اثر نانوذرات اکسید مس و نایسین بر باکتری اشریشیاکلی در محیط کشت مایع. ارزش متوسط± SEM؛ N=۳ ❋ P<۰/۰۵ (نسبت به شاهد).**



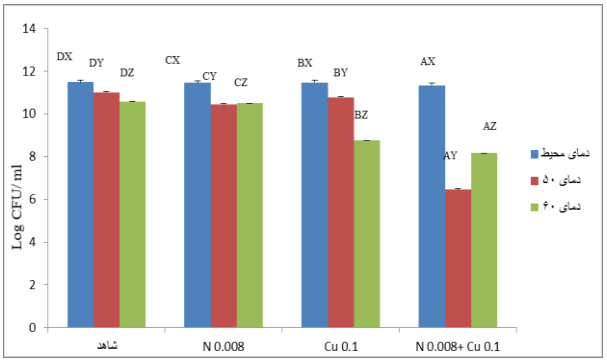

***شکل ۳. اثر نانوذرات اکسید مس و نایسین بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت مایع. ارزش متوسط± SEM؛N=۳ ❋ P < ۰/۰۵ (نسبت به شاهد).***

## بررسی اثر نانوذرات اکسید مس، نایسین و حرارت بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در مادهٔ غذایی شیر

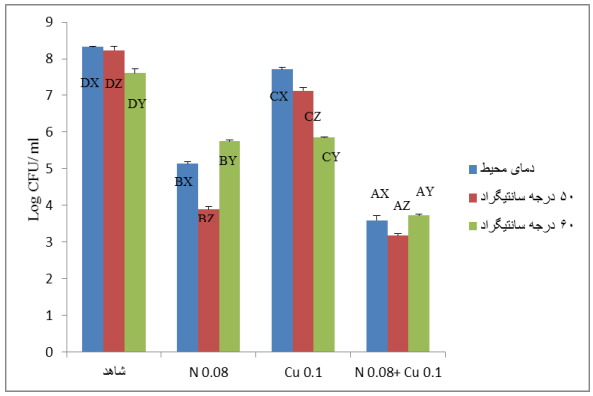
نتایج میزان رشد باکتری‌های *اشریشیاکلی*، در مدت زمان ۸ ساعت، به کمک آزمون ONE WAY ANOVA انجام شد. پس از مشخص شدن خطای انحراف معیار( ۰/۰ =Pvalue) تعیین شد. نتایج نشان می‌دهد که میزان رشد باکتری در حضور غلظت‌های مختلف نانوذرات نسبت به شاهد، کاهش رشد معناداری داشته است. نمودار نشان می‌دهد که ترکیب نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین بهترین اثر بازدارندگی را داشته است.

همچنین نتایج نشان می‌دهد که با افزایش دما شاهد افزایش بازدارندگی نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین بوده‌ایم؛ بدین‌گونه که در دمای ۶۰ درجه، بیشترین اثر بازدارندگی نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین دیده شده است (نک: شکل ۴).

نتایج مربوط به رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در بازه زمانی ۸ ساعت در دماهای مختلف نشان داد که میزان رشد باکتری در حضور غلظت‌های اعمال‌شدهٔ نانوذره اکسید مس و نایسین نسبت به شاهد، اثر مهاری خوبی داشته و نتایج با (Pvalue= ۰/۰) معنادار بوده است. دماهای مختلف اثر مهاری خوبی داشتند و در دمای ۵۰ درجه بیشترین اثر بازدارندگی از رشد نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین دیده شده است (شکل ۵)؛ بنابراین اثر هم‌افزایی در ترکیب نانوذرهٔ اکسید مس، نایسین و درجه حرارت تایید می‌شود.



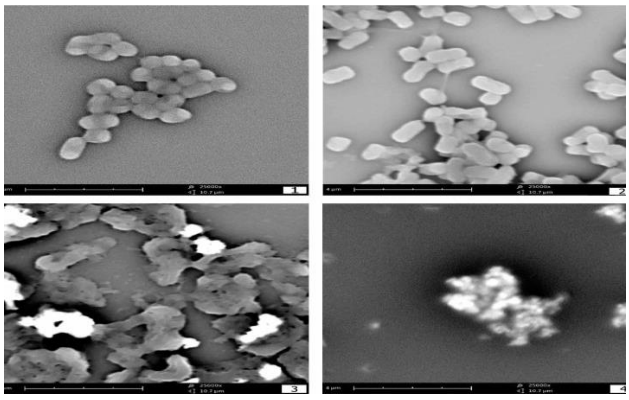

**شکل ۴. بررسی اثر نانوذرات اکسید مس و نایسین روی باکتری‌های *اشریشیاکلی* در سه دمای محیط، ۵۰ درجه و ۶۰ درجهٔ سلسیوس در شیر. ارزش متوسط± SEM؛ N = 3. * P < ۰/۰۵ (نسبت به شاهد). حروف متفاوت ( A, B, C, D,X, Y, Z) نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایش‌شده است.**




**شکل ۵. بررسی اثر نانوذرات اکسید مس و نایسین روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در سه دمای محیط، ۵۰ درجه و ۶۰ درجه سلسیوس در شیر. ارزش متوسط± SEM؛ N = 3. * P < ۰/۰۵ (نسبت به شاهد). حروف متفاوت (A, B, C, D,X, Y, Z) نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایش‌شده است.**

## بررسی اثر توأم نانوذرات اکسید مس و نایسین بر مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

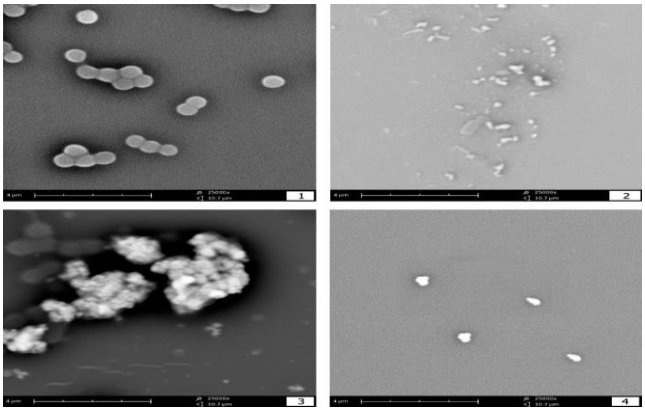
از غلظت‌های مختلف نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین که به ترتیب شاهد (بدون نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین)، ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نایسین، ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اکسید مس، و ۰/۰۱ نایسین+ ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اکسید مس برای اثر روی این دو باکتری استفاده شدند. پس از بازهٔ زمانی ۲۴ ساعت تصویر SEM از باکتری‌های تیمارشده، گرفته شد. همان‌طور که شکل A۶ نشان می‌دهد، سلول‌های باکتری *اشریشیاکلی* به‌وضوح میله‌ای هستند و اندازه‌های نرمال و ساختاری سالم و دست‌نخورده دارند. تصویر B-۶ نشان می‌دهد که باکتری *اشریشیاکلی* در مجاورت نایسین، در سطح سلول تغییرشکل ایجاد کرده و فرورفتگی‌هایی نیز در این باکتری ایجاد شده است. تصویر C-۶ باکتری *اشریشیاکلی* را در مجاورت نانوذرهٔ اکسید مس نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد نانوذرهٔ اکسید مس باعث ایجاد سطوح ناصاف و نامنظم در این باکتری شده است و همچنین سلول باکتری صدمه دیده است. تصویر D-۶ نشانگر آن است که ترکیب نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین، باعث ایجاد انقباض در سلول باکتری و همچنین باعث ایجاد فروپاشیدگی سلول باکتری نسبت به سلول‌های سالم باکتری شده است.



**شکل ۶- تصویر SEM مورفولوژی باکتری‌های *اشریشیاکلی* را در بزرگنمایی ۲۵۰۰۰x نشان می‌دهد؛ A. باکتری *اشریشیاکلی* (شاهد) B. ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نایسین؛ C. ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید مس؛ D. ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید مس و ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نایسین.**

شکل ۷، SEM سلول‌های باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل۷، A می‌توان دید، سلول‌های باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* به‌وضوح کروی هستند و اندازه‌های

نرمال و ساختاری سالم و دست‌نخورده دارند. شکل ۷، B باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* را در مجاورت نایسین نشان می‌دهد؛ نایسین باعث ایجاد سطوح نامنظم در این باکتری شده و همچنین باعث ایجاد صدمه در سلول این باکتری شده است. در تصویر ۷- C باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* را در مجاورت نانوذرهٔ اکسید مس می‌توان دید که در اثر اعمال تیمار نانوذرهٔ اکسید مس، سلول باکتری آسیب دیده و ساختاری نامنظم در آن ایجاد شده است. تصویر ۷- D نیز نشان می‌دهد که ترکیب نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین، باعث منقبض شدن سلول باکتری و ایجاد فروپاشیدگی در آن شده و درنهایت باعث از بین رفتن سلول این باکتری شده است.



**شکل ۷. تصویر SEM مورفولوژی باکتری‌های *استافیلوکوکوس‌اورئوس* را در بزرگنمایی ۲۵۰۰۰x نشان می‌دهد. A. باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* (شاهد) B. ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نایسین C. ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید مس D. ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نانوذرات اکسید مس و ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نایسین.**

## بحث

یکی از تلاش‌های اخیر برای از بین بردن عوامل بیماری‌زایِ مقاوم، استفاده از مواد نانو است. مواد نانو باعث از بین بردن عوارض جانبی بیوفیلم مقاوم در برابر سیستم ایمنی بدن می‌شوند. یکی از ویژگی‌های مهم نانوذرات فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و عوامل بیماری‌زایِ مواد غذایی است (۲۳). نانومواد به‌وسیلهٔ پیوند با ماکرومولکول‌های زیستی باعث غیرفعال شدن آن‌ها و درنتیجه موجب مرگ باکتری ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها می‌شوند (۲۴).

در این پژوهش اثر نانوذرات اکسید مس در غلظت‌های منفرد و در ترکیب با امواج فراصوت و نایسین بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* بررسی شده است. نتایج نشان داد که ترکیب نانوذرات اکسید مس با امواج فراصوت، اثری روی افزایش خاصیت ضدمیکروبی نانوذرات اکسید مس نداشته است (شکل ۱) که این نتایج با مشاهدات Justin و همکاران متفاوت است(۱۹). شاید دلیل آن زمان تابش کم امواج فراصوت باشد؛ چون فاکتور مهمی که بر خاصیت ضدمیکروبی امواج فراصوت تأثیرگذار است، مدت زمان تابش امواج فراصوت روی باکتری‌هاست (۲۶-۲۵). نتایج همچنین بیانگر آن بود که باکتری ها در مجاورت نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین به‌صورت ترکیبی بیشترین کاهش رشد را داشته‌اند؛ بنابراین افزودن نایسین به نانوذرات اکسید مس باعث افزایش خاصیت ضدمیکروبی آن‌ها شده که این نتایج به‌وسیلهٔ تصاویر SEM تأیید شده است (شکل ۶ و ۷).

Mirhosseini و همکاران فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسیدمنیزیم را در ترکیب با نایسین بر روی *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* بررسی کرده‌اند و نتایج آن‌ها نشان داده است که نانوذرات اکسید منیزیم فعالیت ضدباکتریایی داشته‌اند و همچنین نانوذرات اکسید منیزیم در ترکیب با نایسین اثر هم‌افزایی از خود نشان داده‌اند (۲۱).

با توجه به یافته‌های این تحقیق بیشترین تأثیر نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین روی باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* (گرم مثبت) در مقایسه با باکتری *اشریشیاکلی* (گرم منفی) بوده است که علت آن ساختار دیوارهٔ سلولی در باکتری گرم مثبت می‌تواند باشد.

نایسین به دلیل تعامل و واکنش با ترکیبات فسفولیپیدی غشای سیتوپلاسمی دیوارهٔ سلولی باکتری‌های گرم مثبت، عملکرد غشاء را مختل می‌کند، ولی باکتری‌های گرم منفی چون ساختار دیوارهٔ سلولی آن‌ها محتوی لیپوپلی ساکارید است، به‌عنوان یک مانع برای نایسین عمل می‌کند. به همین دلیل اثر نایسین بر باکتری *اشریشیاکلی* کمتر دیده می‌شود؛ بنابراین با افزودن یک عامل شلاته‌کننده، مانند نانوذرات اکسید مس، می‌توان غشای باکتری‌های گرم منفی را نسبت به نایسین نفوذپذیر ساخت.

Chung و همکارانش (۲۰۰۴) پیشنهاد کرده‌اند که میزان تجمع بار منفی بر روی سطح سلولی باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است؛ بنابراین برهم‌کنش بین نانوذراتِ دارای بار مثبت و دیوارهٔ سلولیِ دارای بار منفی منجر به نشت محتویات درون سلول باکتری و درنهایت مرگ باکتری‌ها می‌شود (۲۷).

در این پژوهش همچنین اثر نانوذرات اکسید مس و نایسین بر روی باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس‌اورئوس* در مادهٔ غذایی شیر تحت شرایط دمایی مختلف بررسی شده است.

بررسی نتایج مربوط به رشد باکتری *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در دماهای مختلف نشان داده است که بین تیمارها (ترکیب نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین) و افزایش دما اثر هم‌افزایی وجود دارد که با افزایش دما اثر ضدمیکروبی نایسین و نانوذرهٔ اکسید مس افزایش می‌یابد. این نتایج مشابه نتایج Mirhosseini و همکاران و Netten و همکاران است. (۲۱،۲۸)

Mirhosseini و همکاران و Netten و همکاران پیشنهاد داده‌اند که وقتی غلظت مادهٔ ضدمیکروبی افزایش می‌یابد، اثر ممانعتی آن نیز بالا می‌رود، همچنین دما که افزایش می‌یابد، اثر مادهٔ ضدمیکروبی بالا می‌رود و بار میکروبی کمتر می‌شود (۲۸، ۲۱).

یون‌های فلزات سنگین اثرات گوناگونی بر عملکرد سلول باکتری می‌گذارند. یون‌های مس باعث اکسیداسیون و شوک سلولی و به هم زدن چرخهٔ اکسیداسیون و احیاء می‌شوند، درنتیجه منجر به کاهش گلوتاسیون و تأثیر بر گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها و سبب غیرفعال شدن آنزیم‌ها می‌شوند. نیز یون‌های فلزات سنگین باعث تخریب DNA و اکسید شدن لیپیدها می‌شوند (۲۹). همچنین اثرات ضدباکتریایی نانوذرات به غلظت نانوذرات و غلظت ابتدایی باکتری وابسته است (۳۰).

نایسین به دلیل ایجاد حفره‌های بزرگ در غشای سلول‌های حساس باعث رهاسازی یون‌ها، آمینواسیدها و ATP و درنهایت فروپاشی نیروی پروتونی و همچنین باعث مهار بیوسنتز پپتیدوگلیکانِ غشایِ سلولیِ باکتری‌ها می‌شوند (۳۳-۳۱)؛ بنابراین فرضیه‌ای که اثر هم‌افزایی نایسین، نانوذرهٔ اکسید مس و افزایش دمای ملایم را شرح می‌دهد این است که نایسین با ایجاد حفره در غشای سلولی باعث افزایش ورود نانوذرات اکسید مس به درون سلول و ایجاد رفتار هم‌افزایی بین نانوذرات اکسید مس و نایسین می‌شود. همچنین افزایش دما، با اثر گذاشتن بر روی دیوارهٔ سلولی و غشای خارجیِ باکتری، باعث نفوذپذیری بیشتر دیوارهٔ باکتری و غشای خارجی باکتری گرم منفی می‌شود؛ بنابراین دسترسی نایسین به غشای سلولی را افزایش می‌دهد که این امر موجب افزایش اثر نایسین و نانوذره می‌شود (۲۲ -۲۱).

امروزه استفاده از نانوذرات در سلامت مواد غذایی رو به افزایش است؛ برای نمونه اکسید روی کوانتومی به‌عنوان تیمار ضدمیکروبی در نمونهٔ سفیدهٔ تخم‌مرغ مایع استفاده شده و نتایج نشان داده است که با افزایش غلظت اکسید روی کوانتومی، رشد *لیستریا منوسیتوژنز* و *سالمونلا انتریدیس* در سفیدهٔ تخم‌مرغ مایع به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافته است (۳۴). اثرات مهاری مشابه برای نانوذرات اکسید روی بر کاهش *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* در نمونه‌های شیر دیده شده است (۲۰). نانوذرات آهن به‌عنوان یک مکمل سلامت در رفع آلودگی آب به کار می‌رود که در آن با شکستن آلاینده‌های آلی و کشتن عوامل بیماری‌زای میکروبی، آلودگی را رفع می‌کنند. بااین‌وجود، نمی‌توان غلظت نانوذرات را به نسبت زیاد بالا برد؛ زیرا استفاده از این مواد در مواد غذایی دارای یک حد مجاز است که میزان آن در سازمان FDA که سازمان جهانی غذا و دارو است تعیین شده است. این میزان در مورد نانوذرات مختلف و همچنین بسته به جنسیت و وزن بدن مصرف‌کننده متفاوت است (۲۱). مثلاً میزان مصرف مسِ مجاز در رژیم غذایی، برابر توصیهٔ انجمن جهانی غذا و تغذیه، در بزرگسالان بین ۱/۵ تا ۳ میلی‌گرم در روز تعیین شده است (۳۵).

سازمان غذا و داروی آمریکا عنوان کرده که نایسین ایمن و مورد تأیید است و هم‌اکنون در ۵۷ کشور استفاده می‌شود (۳۶).

## نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، استفاده از نانوذرهٔ اکسید مس و نایسین برای کاهش رشد باکتری‌ها، مؤثر به نظر می‌رسد و ازآنجاکه استفاده از نانوذرات به صورت متداول در صنایع غذایی استفاده می شوند و همچنین با توجه به استفادهٔ روتین از باکتریوسین نایسین در مواد غذایی، شاید بتوان در آینده از نانوذره و نایسین به‌صورت ترکیبی برای بررسی بیشتر به جهت استفاده در صنایع غذایی بهره برد.

## سپاسگزاری

این پروژه توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد اشکذر و پژوهشکدهٔ پوشش‌های نانوساختار دانشگاه پیام نور استان یزد حمایت شده است. نویسندگان از همکاری صمیمانهٔ این مرکزها سپاسگزارند.

## References


1. Yu H, Chen S, Cao P. Synergistic bactericidal effects and mechanisms of low intensity ultrasound and antibiotics against bacteria. Ultrason Sonochem 2012; 19 (3):377–382.
2. Morteza-Semnani K, Saeedi M, Mahdavi MR, Rahimi F. Antimicrobial effects of methanolic extracts of some species of Stachys and Phlomis. J Mazandaran Univ Med Sci 2007; 17(57):57-66.
3. Eriksen HM, Iversen BG, Aavitsland P. Prevalence of nosocomial infections in hospitals in Norway, 2002 and 2003. J Hosp Infect 2005; 60(1):40-5.
4. Hadi M, Shokoohi R, Ebrahimzadeh Namvar AM, Karimi M, Solaimany Aminabad M. Antibiotic resistance of isolated bacteria from urban and hospital wastewaters in Hamadan city IJHE. 2011; 4(1):105-114.
5. Phiwdang K, Suphankij S, Mekprasart W, Pecharapa W. Synthesis of CuO nanoparticles by precipitation method using different precursors. Energy Procedia 2013; 34: 740-745.
6. Goddard WA., Brenner Donald, Lyshevski SE, Iafrate GJ. Handbook on Nanoscience, Engineeering and Technology, 2nd ed., CRC Press, Taylor and Francis, 2007.
7. Amiri M, Etemadifar Z, Daneshkazemi A, Nateghi M. Antimicrobial effect of Copper Oxide nanoparticles on some oral bacteria and Candida species. Dent Mater J 2017;4(1):347-352.
8. Midander K, Cronholm P, Karlsson HL, Elihn K, Möller L, Leygraf C et al. Surface characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-sized copper and copper(II) oxide particles: a cross-disciplinary study. Small. 2009 Mar;5(3):389–99.
9. Ashajyothi C, Jahanara K, Kelmani Chandrakanth R. Biosynthesis and characterization of copper nanoparticles from Entrococcus faecalis. Int J Pharm Bio Sci 2014;5(4):204 – 211.
10. Hasper HE, Kramer NE, Smith JL, Hillman JD, Zachariah C, Kuipers OP, et al. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. Science 2006; 15,313(5793):1636-7.
11. Deegan LH.; Cotter PD, Hill C, Ross P. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int Dairy J 2006; 16(9):1058-1071.
12. Harvey E, Loomis A. The destruction of luminous bacteria by high frequency sound waves. J Bacteriol 1929;17(5):314-318.
13. Hamre D. The effect of ultrasonic waves upon Klebsiella pneumoniae, Saccharomyces cerevisiae, Miyagawanella felis and Influenza virus A. J Bacteriol 1949; 57(3):279-295.
14. Jacobs,SE, Thornley MJ. The lethal action of the ultrasonic waves on bacteria suspended in milk and other liquids. J Appl Bacteriol 1954; 17(1):38-56.
15. Ahmed FIK, Russell C. Synergism between ultrasonic waves and hydrogen peroxide in the killing of microorganisms. J Appl Bacteriol 1975;39(1):31-41.
16. Burleson GR, Murray TM, Pollard M. Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. Appl Microbiol 1975;29(3):340-344.
17. Wikler MA, Cockerill FR, Craig WA, Bush K, Dudley MN, Hardy D. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard J 2009 ;29(2):552-558.
18. Seil JT. Synergistic antibacterial effect of zinc oxide nanoparticles and ultrasound stimulation. Brown University, 2012. Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. in the School of Engineering at Brown University
19. Justin T, Seil JT, Webster TJ. Antibacterial effect of zinc oxide nanoparticles combined with ultrasound. Nanotechnology 2012; 23(49):495101.
20. Mirhosseini M, Firouzabadi F. Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticle suspensions on food-borne pathogens. Int J Dairy Technol 2013;66(2):291-295.
21. Mirhosseini M, Afzali M. Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of magnesium oxide nanoparticles in combination with nisin and heat against Escherichia coli and Staphylococcus aureus in milk. Food Control 68:208-2015.
22. Jin T, He Y. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. J Nanopart Res 2011;13 (12):6877-85
23. Akbar AK, Anal AK. Zinc oxide nanoparticles loaded active packaging, a challenge study against Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus in ready-to-eat poultry meat. Food Control 2014;38: 88-95.
24. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ..The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology 2005; 16(10):23-46.
25. Scherba G, Weigel RM, O'Brien WDJr. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic

energy. Appl Environ Microbiol 1991;57(7):2079-84.

26. Maleki A, Shahmoradi B, Daraei H, Kalantar E. Assessment of ultrasound irradiation on inactivation of gram negative and positive bacteria isolated from hospital in aqueous solution. J Adv Environ Health Res 2013;1(1):9-14.
27. Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JC, et al. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. Acta Pharmacol Sin 2004; 25 (7):932-6.
28. Netten PV, Huis Intveld JH. The effect of Lactic acid decontamination on the microflora on meat. J Food Safety 1994;14(3): 243-257.
29. Cioffi N, Torsi L, Ditaranto N, Tantillo G, Ghibelli L, Sabbatini L, et al. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. Chem Mater 2005;17(21):5255-5262.
30. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Radic Biol Med 1995;18(2):321-336.
31. Hauben KJA, Wuytack EY, Scootjens CCF, Michiels CW. High-Pressure transient sensitization of Escherichia coli to lysozyme and nisin by disruption of outer-membrane permeability. J Food Prot 1996; 59(4): 350–35.
32. Henning S, Metz R, Hammes WP. Studies on the mode of action of nisin. Int J Food Microbiol 3(3):121–134
33. Moll GN, Clark J, Chan WC, Bycroft BW, Roberts GC, Konings WN, et al. Role of transmembrane pH gradient and membrane binding in nisin pore formation. J Bacteriol 1997;179(1):135-40.
34. Jin T, Sun D, Su JY, Zhang H, Sue HJ. Antimicrobial Efficacy of Zinc Oxide Quantum Dots against Listeria monocytogenes, Salmonella Enteritidis, and Escherichia coli O157:H7. J Food Sci 2009;74(1):M46-M52.
35. Klevay LM. Lack of a recommended dietary allowance for copper may be hazardous to your health. J Am Coll Nutr 1998; 17(4): 322–326.
36. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. J Am Diet Assoc 2001; 101(3): 294-301.