



Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles by Chemical Method and Investigation of Their Antimicrobial Properties

Asma Shamsaei¹, Mina Ramezani^{2,*}, Ramin Mohammadi-Alocheh³

1. M.Sc., Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Associated Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Place of Research: Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Article Info

Abstract

Article History:

Received 12.22.2024
Revised 01.22.2024
Accepted 02.08.2024
Online 02.08.2024

KeyWords:

Copper oxide nanoparticles
Staphylococcus aureus
Escherichia coli
Fusarium solani

*Corresponding author:

E-mail address

asma.shamsaei@yahoo.com
mina.ramezani@gmail.com
ramin.p1363@gmail.com

Introduction: Copper oxide is one of the most important metal oxides that has unique properties in various technological applications, such as superconductors, and has been used as an antimicrobial agent against numerous bacterial species.

Aim: In the present study, CuO Nps was synthesized using chemical methods and its antimicrobial activity was investigated.

Materials and Methods: Copper oxide nanoparticles were synthesized using the microwave method, and XRD, EDX, SEM, FTIR, and UV-vis analyses were performed to investigate the physical and chemical properties. The antimicrobial and antifungal effects of copper oxide nanoparticles on pathogenic bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Fusarium solani* were evaluated using MIC and MBC tests and well diffusion assay.

Results: The results showed that at a concentration of 20 mg/mL, copper oxide nanoparticles inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*. Similarly, growth inhibition of *Escherichia coli* was observed at a concentration of 4 mg/mL of nanoparticles. Furthermore, *Fusarium solani* exhibited increased sensitivity to copper oxide nanoparticles at concentrations higher than 50 mg/mL, with a growth inhibition zone diameter of 18 mm at a concentration of 100 mg/mL.

Conclusion: Copper oxide nanoparticles can be introduced as a strong antimicrobial agent.

Cite this article: Shamsaei A, Ramezani M*, Mohammadi-Alocheh R. Synthesis of Copper Oxide Nanoparticles by Chemical Method and Investigation of Their Antimicrobial Properties. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(3):27-41

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



سنتر نانوذرات اکسید مس به روش شیمیایی و بررسی خواص ضد میکروبی آنها

اسما شمسایی^۱، مینا رضانی^۲، رامین محمدی آلوچه^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

مقدمه: اکسید مس، یکی از مهمترین اکسیدهای فلزی واسطه است که دارای خصوصیات منحصر به فردی در مصارف فناورانه مختلفی نظیر ابر رساناها، به عنوان یک عامل ضد میکروبی بر علیه گونه های باکتریایی متعددی استفاده شده است.

هدف: در تحقیق حاضر نانوذرات اکسید مس، با استفاده از روش های شیمیایی تولید و فعالیت ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: نانوذرات اکسید مس به روش میکروویو سنتز شد و آنالیزهای FTIR، SEM، EDX، XRD، UV-vis، جهت بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی انجام شد. ارزیابی تأثیرات ضد میکروبی و ضد قارچی غلظت های مختلف نانوذرات اکسید مس بر روی باکتری های پاتوژن گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی و گرم منفی اشرشیا کلی و قارچ فوزاریوم سولانی با کمک آزمون های MIC و MBC و چاهک گذاری بررسی گردید.

نتایج: نتایج نشان داد در غلظت های ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر از نانوذرات اکسید مس بر روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی ممانعت از رشد ثبت شد. همچنین این ممانعت از رشد برای اشرشیا کلی در غلظت ۴ میلی گرم در میلی لیتر از نانوذرات مشاهده شد. همچنین قارچ فوزاریوم، در غلظت های بالاتر از ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر نانو اکسید مس، حساسیت به نسبت بیشتری نشان می دهد به طوری که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر، قطر هاله عدم رشد ۱۸ میلی متر بود.

نتیجه گیری: می توان نانوذرات اکسید مس را به عنوان یک عامل قوی ضد میکروبی معرفی نمود.

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۱۰/۰۱

بازنگری ۱۴۰۲/۱۱/۰۲

پذیرش ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

نهایی ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

کلمات کلیدی

نانوذرات اکسید مس
استرپتوکوکوس اینیایی
اشرشیا کلی
فوزاریوم سولانی

* نویسنده مسؤل

asma.shamsaei@yahoo.com
mina.ramezani@gmail.com
ramin.p1363@gmail.com

شیوه آدرس دهی این مقاله: شمسایی الف، رضانی م، محمدی آلوچه ر. سنتر نانوذرات اکسید مس به روش شیمیایی و بررسی خواص ضد میکروبی آنها. مجله دانش

زیستی ایران. ۱۴۰۲؛ ۱۸ (۳): ۲۷-۴۱

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا | شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ | شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹۶ | نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

به عنوان یکی از عوامل مهم بروز استرپتوکوکوزیس در گونه‌های متعددی از ماهیان آب شیرین و دریایی، گونه‌های پرورشی و جمعیت‌های وحشی به حساب می‌آید (۹). تلفات حاصله از این باکتری با علائم متنوع بالینی تا ۸۰ درصد نیز می‌رسد. بیماری به هر دو صورت انفرادی و همه‌گیری در ماهیان اتفاق می‌افتد (۱۰).

اشرشیاکلی (*Escherichia coli* یا *E. coli*) زیر گونه O157HV یک عامل بیماری‌زای مهم غذایی است که باعث اسهال خونی و گاهی سندرم همولیتیک اورمیک (HUS) می‌شود (۱۱). این پاتوژن انسانی مشترک انسان و دام می‌تواند در غذا و محیط‌های مربوط به غذا باقی بماند و متعاقباً بیوفیلیم تولید کند. O157HV از طریق مصرف غذاهای آلوده مانند گوشت گاو و لبنیات، سبزیجات و میوه‌ها منتقل می‌شود (۱۱).

بیماری‌های عفونی در آبزیان، می‌تواند توسط برخی عوامل قارچی نیز ایجاد گردد. قارچ‌ها در بهداشت آبزیان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و به عنوان عاملی اساسی در تعیین وضعیت بهداشتی مزارع پرورش ماهی مدنظر می‌باشند (۱۲).

برخی از گونه‌های قارچی مانند فوزاریوم سولانی (*Fusarium solani*) نیز به عنوان عوامل موثر در فوزاریوزیس، مطرح می‌باشند (۱۲). این قارچ‌ها عمدتاً از دسته قارچ‌های ناقص هستند و گونه‌های مختلفی از آنها در ماهی و میگو ایجاد بیماری می‌کنند. عفونت ناشی از فوزاریوم از کوسه، لاک پشت‌های دریایی، ماهی آزاد اطلس و برخی انواع خرچنگ‌ها گزارش شده است (۱۱، ۱۲). به علت مقاومت گونه‌های فوزاریوم در برابر داروهای ضدقارچی، شناسایی سریع و دقیق آنها برای کنترل تبعات عفونت امری مهم و ضروری است. با توجه به مطالب ذکر شده، هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات اکسید مس و بررسی خواص ضد میکروبی آنها می‌باشد.

نانوذرات اکسید مس (CuO Nps)، در میان سایر نانومواد اکسید، توسط آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده به عنوان یک عامل ضد میکروبی ایمن، ساده و مؤثر برای استفاده انسانی مورد تایید، و از قرن نوزدهم به‌شدت مورد استفاده قرار گرفته‌است (۱، ۲، ۳). با توجه به چالش مقاومت دارویی، فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس آنها را به عنوان کاندیدای قوی برای استفاده به عنوان عوامل درمانی تبدیل کرده است (۴). مکانیسم‌های زیستی متفاوتی برای نانوذرات بر علیه میکروارگانیسم‌ها پیشنهاد شده است که سه مکانیسم پذیرفته‌تر می‌باشد. ۱: تجمع و انحلال نانوذرات در غشای باکتری باعث تغییر نفوذپذیری آن می‌شود و متعاقباً آزادسازی لیپوپلی‌ساکاریدها، پروتئین‌های غشایی و بیومولکول‌های داخل سلولی و اتلاف نیروی محرکه پروتون در غشای پلاسمایی. ۲: تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و آسیب به ساختار سلولی. ۳: جذب یون‌های فلزی مشتق‌شده از نوکلئو پروتئین‌ها و به دنبال آن کاهش تولید ATP درون سلولی و اختلال در همانندسازی DNA. در این راستا، روز به روز چندین استراتژی سنتز نانوذرات بهبود یافته در حال توسعه است که شامل فرآیندهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی است (۵، ۶، ۷، ۸).

بیماری‌های باکتریایی ماهی یکی از جدی‌ترین مشکلاتی است که صنعت ماهی با آن مواجه است، زیرا شیوع آن‌ها منجر به خسارات اقتصادی بالایی می‌شود، بنابراین کنترل آن‌ها از اولویت جهانی برخوردار است. سوء استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل بیماری‌های باکتریایی ماهی منجر به ایجاد مقاومت در باکتری‌ها می‌شود که در برابر اکثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاومت می‌کنند و یک خطر برای سلامت عمومی محسوب می‌شوند (۱۰). استرپتوکوکوس‌ها از جمله مهم‌ترین پاتوژن‌های ماهی محسوب می‌شوند و در این میان استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*)

مواد و روش ها

سنتر نانوذرات اکسید مس (CuO Nps)

سنتر نانوذرات اکسید مس به روش شیمیایی انجام گردید. مقدار ۶ گرم نیترات مس به ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از مخلوط شدن، با استفاده از سدیم هیدروکسید، pH محلول تا مقدار ۹ یا ۱۰ رسانده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه ماکروویو گردید. نمونه مورد نظر سانتریفیوژ شد. محلول رویی را خارج کرده و رسوب حاصل از سانتریفیوژ با استفاده از آب مقطر و الکل ۷۰ درصد شستشو داده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا نانوذرات اکسید مس تشکیل شوند. به منظور ارزیابی نانوذرات اکسید مس تولید شده از طیف سنجی مرئی فرابنفش (UV)، تفرق یا پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپی الکترونی روبشی (FE-SEM)، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS یا EDAX) و آنالیز مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) استفاده گردید.

ارزیابی خاصیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس

در این مطالعه از سویه‌های استاندارد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیا کلی و قارچ فوزاریوم سلوانی به ترتیب با کد ثبتی، PTCC 1887، IBRC-M 11106 و IBRC-M 30506 تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی و مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران، به منظور ارزیابی های ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس استفاده گردید. در ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری و قارچ مورد آزمایش، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند (CFU/ml $10^8 \times 1/5$) تهیه گردید.

تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی پاتوژن های باکتریایی

ابتدا از کشت تازه هر یک از سویه های مورد مطالعه، با استفاده از سواب استریل، بر روی محیط مولر هینتون آگار پاساژ داده شد. سپس با استفاده از پنس استریل، دیسک های آنتی بیوتیک ریفامپین (RA)، پنی سیلین (P)، مروپنم (Men) و تتراسایکلین

(Te) برای گونه گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی و از دیسک های آنتی بیوتیک جنتامایسین (GM)، سیپروفلوکساسین (CP)، آموکسی کلاو (AMO) و پنی سیلین برای گونه گرم منفی اشرشیا کلی با فاصله مناسب از یکدیگر بر روی سطح محیط قرار داده شدند. انکوباسیون ۴۸ ساعته در ۳۷ درجه سانتی گراد، قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها با خط کش استاندارد (برحسب میلی متر) اندازه گیری گردید.

فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید مس سنتر شده، بر اساس انتشار در آگار و با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از سوسپانسیون نیم مک فارلند (CFU/ml $10^8 \times 1/5$) باکتری های پاتوژن مورد آزمون با سواب استریل در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت یکنواخت تهیه شد. سپس چاهک هایی به قطر ۸ میلی متر در محیط حفر شد و پس از تهیه غلظت های مختلف نانوذره در غلظت های ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری اشرشیاکلی و غلظت های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره اکسید مس در داخل چاهک ها ریخته و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک ها حساسیت یا مقاومت باکتری های مورد آزمون نسبت به نانوذرات اکسید مس تعیین گردید.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC)

کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذره اکسید مس سنتر شده نیز بر اساس کدورت سنجی و با استفاده از روش میکرودايلوشن در محیط مایع در پلیت های ۹۶ چاهکی انجام شد. برای این منظور رقت های مختلف نمونه های نانوذره (۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲، ۱۰۲۴، ۲۰۴۸ و ۴۰۹۶ میلی گرم بر میلی لیتر) در محیط کشت مولر هینتون برآث تهیه شده و

آن کلنی مشاهده نشد به عنوان کمترین غلظت باکتری کشی تعیین و گزارش گردید. بررسی اثر ضد قارچی با تعیین قطر هاله بازدارنده به روش چاهک

از سویه قارچی فوزاریوم سولانی تهیه شده، سوسپانسیون میکروبی دارای کدورتی مطابق آنچه که در مراحل قبل گفته شد، تهیه گردید. سپس با استفاده از سواب پنبه ای استریل، کشت قارچی به صورت یکنواخت در محیط سابرو دکستروز آگار انجام گرفت. پس از آن با استفاده از پیپت پاستور شیشه ای استریل، چاهک هایی به قطر ۸ میلی متر در محیط های کشت حفر شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نانوذره اکسید مس با غلظت های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر به داخل چاهک ها انتقال داده شد. انکوباسیون پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد انجام شد و پس از طی این مدت قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری و ثبت گردید.

در مجاورت سوسپانسیون معادل $10^8 \times 1/5$ CFU/ml از هر کدام از باکتری های پاتوژن مورد آزمون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. البته، ابتدا سوسپانسیون باکتری به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد تا تراکم 10^1 CFU/ml بدست آید و پس از مخلوط شدن با حلال، غلظت نهایی باکتری 10^0 CFU/ml شد. در این مطالعه کنترل مثبت (حاوی محیط مولر هینتون براث و سوسپانسیون باکتری معادل 10^8 CFU/ml) و کنترل منفی (حاوی محیط مولر هینتون براث و نانوذره) بود. پس از این مدت آخرین رقتی که در آن کدورت میکروبی مشاهده نشد به عنوان MIC تعیین شد. تست های حداقل غلظت مهاری برای هر باکتری با سه مرتبه تکرار انجام پذیرفت و میانگین نتایج برای آنها در این ارزیابی به ثبت رسید.

به منظور تعیین MBC، از چاهک ثبت شده به عنوان MIC و همینطور غلظت های بالاتر آن در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و آخرین رقتی که در

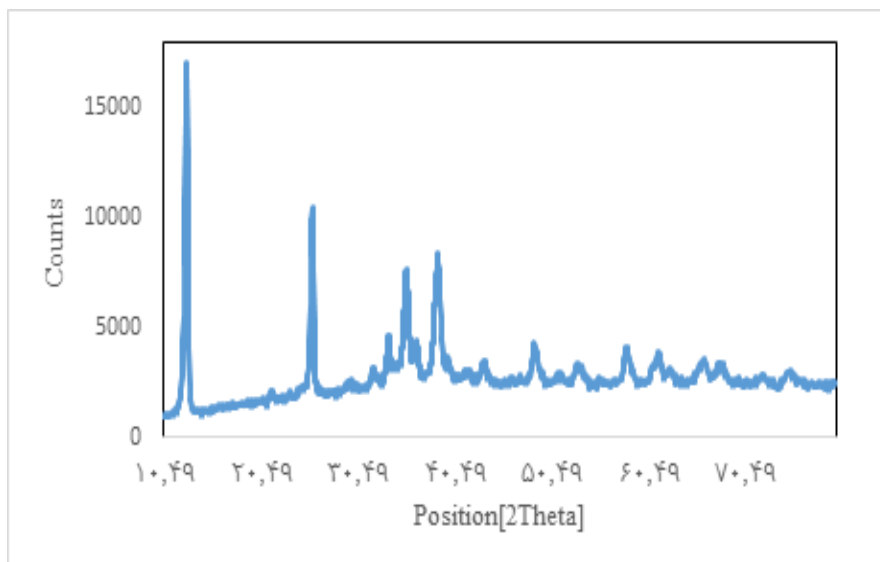
نتایج

تهیه نانوذرات اکسید مس به روش میکروویو

در طی سنتز نانوذرات اکسید مس به روش شیمیایی، نانوذرات دچار تغییر رنگ از آبی شفاف به کدر و سپس سیاه به دلیل احیاء یون های مس و تجمع آنها به صورت نانوذره در محلول شدند (شکل ۱).



شکل ۱: تغییر رنگ نانوذرات اکسید مس در طی فرایند تولید از آبی شفاف به کدر و سپس سیاه



نمودار ۱: طیف XRD نانوذرات اکسید مس سنتز شده

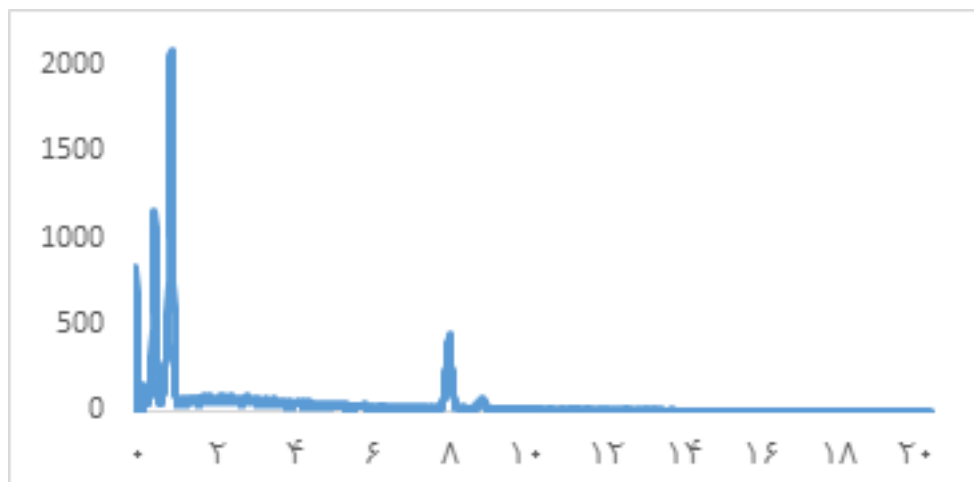
ورودی پایین تر، جذب الکترون بالاتری را از خودش نشان می دهد. البته علت این امر را می توان ناشی از ویژگی های سطحی مس بیان نمود. با توجه نمودار ۲، مشخص شد که ۶۴/۴۴ درصد مس و ۳۵/۵۶ درصد اکسیژن در نمونه وجود دارد.

همانطور که در آنالیز MAP امکان ارائه توزیع فراوانی عناصر موجود در یک تصویر امکان پذیر خواهد بود برای ذرات اکسیژن و مس به صورت مجزا و در ترکیب باهم (اکسید مس) در شکل ۲ قابل رصد و ارزیابی بود.

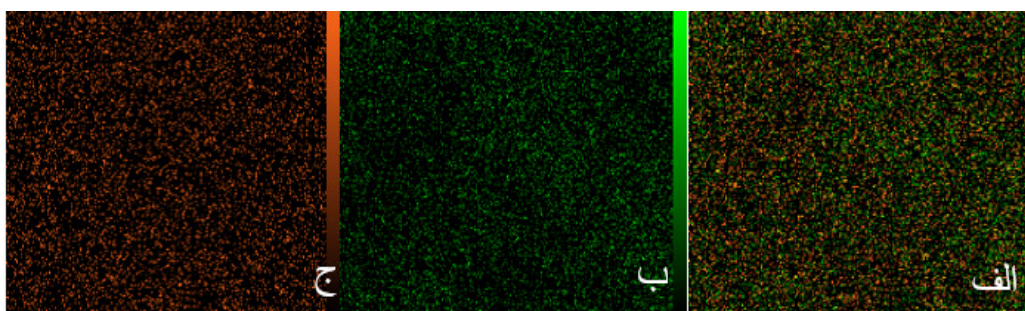
ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز FT-IR در ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز FT-IR نتایج بدست آمده از آنالیز در طول موج های بین $4003/15 \text{ cm}^{-1}$ - 397 صورت پذیرفت. در طیف FT-IR مربوط به نانوذرات مس اکسید شده، پیک O-H از $3467/38 \text{ cm}^{-1}$ و به خاطر اتصال گروه های عاملی مذکور به نانوذرات اکسید مس است. پیک های دیگر در $1076/08$ و $1403/92 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به یون نیترات حاصل از ترکیب مس نیترات احیا شده است. جذب $1639/20 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی گروه C=C حلقه های فنولی می باشد. با توجه به گروه های عاملی حاصل از نتایج FT-IR، این آنالیزها تایید کننده نتایج حاصل از EDS می باشد (نمودار ۳).

ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز XRD در بررسی و ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز XRD مشخص گردید طبق استاندارد JCPDS به شماره ۳۶-۱۴۵۱ نتایج این آزمون از زاویه حدود ۱۰ درجه آغاز و تا زاویه حدود ۸۰ درجه به عنوان نقطه پایان ادامه داشته است که از دلایل تایید و صحت سنتز موفق این نانو ذرات می باشد. بر اساس نمودار ۱ الگوی پیک های XRD، مربوط اندیس های میلر در سطوح مختلفی بوده که مربوط به زوایای ۲ تا بوده و نشان دهنده ساختار مکعبی مراکز سطحی fcc (Face-centered cubic) در طیف نمونه نانوذرات اکسید مس می باشد. بر اساس فرمول ذکر شده میانگین نانوذرات در نتایج حاصل از XRD به طور متوسط ۶۸ نانومتر محاسبه گردید.

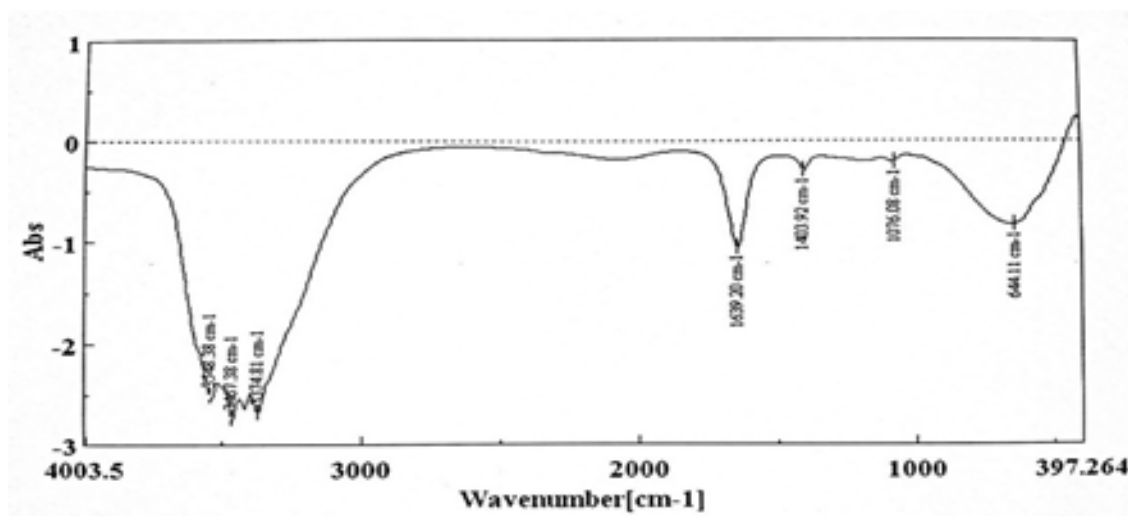
ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز EDS ارزیابی های ساختاری نانوذره سنتز شده، ترکیب عنصری آن نیز به کمک طیف سنجی پراش اشعه ایکس مورد ارزیابی قرار گرفت. در نمودار ۲ همانطور که مشخص است مس در پتانسیل ورودی ۱ keV حضوری تقریباً کامل و در ولتاژ ۸ keV نیز حضور نسبی از خود نشان داده است که با نتایج پژوهش های پیشین مطابقت خوبی دارد (۱۲). لازم بذکر است که معمولاً مس در ولتاژ های



نمودار ۲: گراف مربوط به آنالیز نانوذره اکسید مس طی آنالیز EDS



شکل ۲: تصاویر Mapping ذرات مس و اکسیژن به صورت مجزا و در ترکیب باهم طی آنالیز EDS. الف: مس، ب: اکسیژن و ج: ترکیبی از مس و اکسیژن (اکسید مس) می باشد.



نمودار ۳: نمودار مربوط به طیف FT-IR نانوذرات اکسید نیکل سنتز شده

را از رشد در ناحیه حضور اکسید مس باز داشتند. این در حالی بود که در غلظت های کمتر از ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر، بر روی این باکتری و طی این روش، اثر بازدارندگی مشاهده نشد. در این ارزیابی گونه گرم منفی اشرشیا کلی حساس تر بود و در غلظت های پایین تر نانوذره، قطر هاله بازدارنده داشت. این اندازه گیری در غلظت های ۱۰، ۸، ۶ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر اکسید مس به ترتیب معادل ۱۵، ۱۱، ۹ و ۷ میلی متر بود (جدول ۲).

نتایج تعیین MIC و MBC نانوذرات اکسید مس علیه گونه های باکتری

در بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد باکتری، کمترین غلظت نانوذره اکسید مس که در حضور آن کدورت قابل جذبی در دستگاه الیزا ثبت نگردید به عنوان MIC در نظر گرفته شد. همانطور که مشخص است برای باکتری استرپتوکوکوس اینیایی این مقدار ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است. همینطور برای باکتری اشرشیا کلی نیز حداقل غلظت مهارتی همین مقدار (۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر) بود. پس از تعیین میزان MIC از چاهک های فاقد کدورت بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و نتایج پس از گذشت ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظتی که باعث مرگ باکتری های تلقیح شده گردد، به عنوان حداقل غلظت کشنده (MBC) در نظر گرفته می گردد. نتایج حاکی از آن بود که برای استرپتوکوکوس اینیایی مقدار MBC نانوذرات اکسید مس با MIC آن برابر و به میزان ۱۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر بوده است، در حالی بود که برای اشرشیا کلی مقدار MBC بیشتر و ۲۵۶ میکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد.

نتایج تعیین قطر هاله بازدارنده رشد قارچ فوزاریوم در روش چاهک

همچنین برای قارچ فوزاریوم سولانی مشخص گردید در غلظت های بالاتر از ۵۰ میلی گرم نانوذره، حساسیت به نسبت بیشتری در مقایسه با غلظت های کمتر از این مقدار دارد به طوری که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با قطر هاله ۱۸ میلی متری از رشد بازداشته می شود (جدول ۳).

ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آنالیز میکروسکوپی FESEM

در این پژوهش، تعیین اندازه و شکل نانوذرات اکسید مس سنتز شده از طریق میکروسکوپ الکترونی FESEM مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر به دست آمده از آنالیز FESEM نشان می دهد که شکل نانوذرات سنتز شده کروی می باشد و در برخی نقاط تجمع ذرات و آگلومریزه شدن نانو ذرات مشاهده می شود. همچنین ابعاد نانوذره سنتز شده در بازه ۵۱/۵۳۵ تا ۱۴۳/۸۷۵ نانومتر می باشند. نتایج حاصل FESEM تایید کننده نتایج بدست آمده از XRD می باشد تصاویر قابل مشاهده در شکل ۳ با بزرگنمایی های متفاوت تهیه و ثبت شده اند (شکل ۳).

ارزیابی نانوذره اکسید مس از طریق آزمون UV-Vis

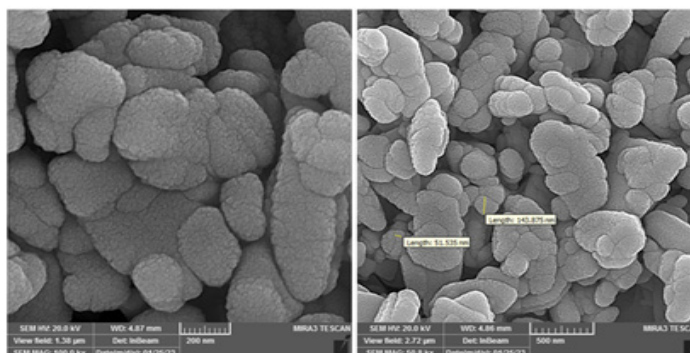
نتایج بدست آمده از آزمون UV-Vis نشان داد، در بازه طول موج ۹۰۰ - ۱۹۰ جذب انرژی صورت گرفته که نانو ذرات اکسید مس بیشترین جذب را در طول موج ۲۰۵ نانومتر نشان دادند و این نشان دهنده وجود نانوذرات سنتز شده درون محلول می باشد (همودار۴).

نتایج بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها

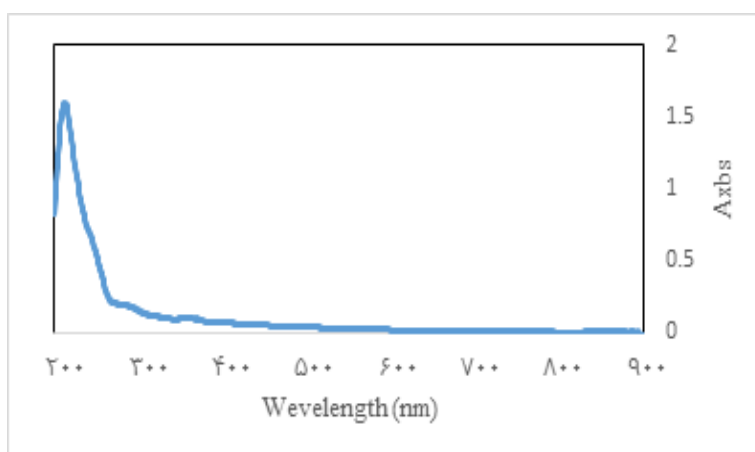
در بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها مشخص گردید که استرپتوکوکوس اینیایی نسبت به آنتی بیوتیک های ریفامپین و مروپنم حساس و در برابر آنتی بیوتیک های پنی سیلین و تتراسایکلین مقاوم می باشد. همچنین باکتری اشرشیا کلی نیز در حضور آنتی بیوتیک های جنتامایسین و سیپروفلوکساسین حساسیت نشان داد در حالی که در برابر دو داروی دیگر یعنی آموکسی کلاو و پنی سیلین مقاوم بود (جدول ۱).

نتایج تعیین قطر هاله بازدارنده از رشد باکتری ها در روش چاهک

در بررسی نتایج مربوط به تعیین قطر هاله بازدارنده از رشد باکتری ها در روش چاهک بیشترین قطر هاله عدم رشد در غلظت های بالای نانوذرات اکسید مس بر روی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی مشاهده گردید که این میزان ۱۵ میلی متر ارزیابی و ثبت شد. پس از آن نیز غلظت های ۸۰، ۶۰، ۴۰ و ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذره با ظهور قطر های بازدارنده ای به ترتیب به میزان ۱۳، ۱۲، ۱۱ و ۱۰ میلی متر، این گونه باکتریایی



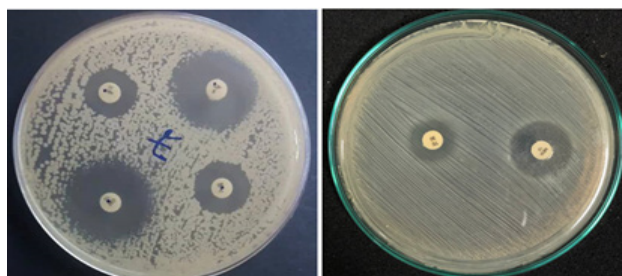
شکل ۳: مورفولوژی و اندازه نانوذرات اکسید مس در تصاویر FESEM



نمودار ۴: نمودار جذب نور مرئی - فرابنفش نانوذرات اکسید مس

جدول ۱: نتایج بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی گونه های باکتریایی به روش دیسک دیفیوژن (اعداد بر حسب میلی متر)

	ریفامپین	پنی سیلین	مروپنم	تتراسایکلین
<i>Streptococcus iniae</i>	۲۵	۰	۲۲	۱۶
	جنتامایسین	سیپروفلوکساسین	آموکسی کلاو	پنی سیلین
<i>Escherichia coli</i>	۲۸	۲۷	۱۷	۱۷



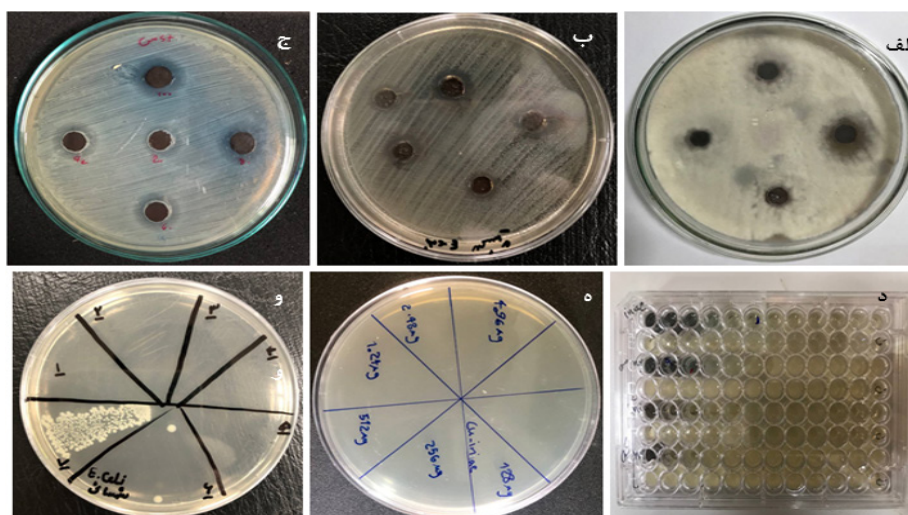
شکل ۴: هاله ممانعت از رشد در بررسی مقاومت آنٹی بیوتیکی باکتری ها در روش دیسک
الف: پلیت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی
ب: پلیت باکتری اشرشیا کلی

جدول ۲: اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در روش چاهک

	۴ mg/ml	۶	۸	۱۰	۲۰	۴۰	۶۰	۸۰	۱۰۰
<i>Streptococcus iniae</i>	۰	۰	۰	۰	۱۰ mm	۱۱ mm	۱۲ mm	۱۳ mm	۱۵ mm
<i>Escherichia coli</i>	۷ mm	۹ mm	۱۱ mm	۱۵ mm	—	—	—	—	—

جدول ۳: اندازه قطر هاله عدم رشد در بررسی اثر ضد قارچی نانوذرات اکسید مس علیه فوزاریوم سولانی در روش چاهک

	۱۰۰ mg/ml	۵۰ mg/ml	۲۵ mg/ml	۱۲/۵ mg/ml
<i>solani Fuzarium</i>	۱۸ mm	۱۱ mm	۱۰ mm	۱۰ mm



شکل ۵: نتایج مربوط به بررسی تأثیرات ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس

الف: قطر هاله بازدارنده رشد قارچ فوزاریوم سولانی در روش چاهک. ب: قطر هاله بازدارنده رشد باکتری اشرشیا کلی. ج: قطر هاله بازدارنده رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی. د: حداقل غلظت مهار کننده (MIC) باکتری های استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیا کلی. ه: حداقل غلظت کشنده (MBC) باکتری استرپتوکوکوس اینیایی. و: حداقل غلظت کشنده (MBC) باکتری اشرشیا کلی.

ROS توسط نانوذرات متصل به سلول‌های باکتریایی است که به نوبه خود باعث افزایش استرس اکسیداتیو درون سلولی می‌شود. این پارادایم توسط چندین سنجش مانند پراکسیداسیون لیپیدی و سویه های گزارشگر استرس اکسیداتیو تایید شد. علاوه بر این، میکروسکوپ الکترونی نشان داد که نانوذرات کوچک اکسید مس به سلول‌ها نفوذ کرده اند. در مجموع، نتایج گزارش شده در اینجا ممکن است مفاهیم مختلف موجود در گزارشات مربوط به مکانیسم ضد باکتریایی نانوذرات اکسید مس را تطبیق دهد و همچنین پتانسیل توسعه دستگاه‌های مبتنی بر نانوذرات اکسید مس را برای مهار عفونت‌های باکتریایی برجسته کند (۲۲).

در مطالعه ما جهت بررسی مورفولوژی و اندازه نانوذرات اکسید مس سنتز شده توسط فرآیند شیمیایی میکروویو، آنالیز میکروسکوپی FESEM مورد استفاده قرار گرفت. همانطور که از تصاویر FESEM قابل استنتاج است، در طی روش سنتز اکسید مس، مورفولوژی تقریباً هم محور و کروی نانوذرات با اندازه تقریبی بین ۵۲ تا ۱۴۴ نانومتر قابل تشخیص می‌باشد. با این حال، به دلیل فعالیت سطحی بالای ذرات در مقیاس نانو و تشکیل گروه های هیدروکسیل در حین شستشو، غالباً ذرات اکسید مس سنتز شده به هم می‌چسبند و آگلومر تشکیل می‌دهند که در تصاویر ما نیز این چسبندگی نانوذرات دیده شد. نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که سنتز پودر اکسید مس با روش‌های مختلف باعث مورفولوژی متفاوتی می‌شود. با بررسی اثر شکل و مورفولوژی نانو ذرات اکسید مس بر خواص ضد میکروبی، نشان داده شده است که ذرات با مورفولوژی کروی و ابعاد نانومتری به دلیل نسبت سطح به حجم بالا، توانایی بهتری در از بین بردن میکروارگانیسم ها در محیط کشت دارند (۲۳، ۲۴، ۲۵). طیف‌سنجی FTIR نیز در ادامه و برای شناسایی نانوذرات اکسید مس با استفاده از اتصالات موجود برقرار شده بین ذرات، استفاده گردید. طیف FTIR نانوذره اکسید مس نشان می‌دهد که باند جذب وسیع در $3417/381$ cm^{-1} و مربوط به گروه عاملی هیدروکسیل (OH) است. اوج جذب این نمودار نیز در همین محدوده مشاهده گردید. باند IR در حدود $1639/201$ cm^{-1} را می‌توان به خم

درسال های اخیر، بررسی های آزمایشگاهی نشان داده اند که برخی از داروها در فرم نانومتری دارای فعالیت ضد باکتریایی مؤثرتری هستند (۱۳، ۱۴). یون و همکاران اثرات ضد باکتریایی نانوذرات مس و نقره را برای اثرشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس گزارش کردند، که نانو ذرات مس فعالیت ضد باکتریایی بیشتری در مقایسه با نانو ذرات نقره از خود نشان دادند (۱۵). بطور کلی اطلاعات اندکی در مورد فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات اکسید مس در دسترس است. اما در اکثر مطالعات بر روی نانو ضد میکروب های مبتنی بر فلز، اثربخشی بیولوژیکی این ماده به طور قابل توجهی بالاتر یا طولانی تر از زیست فعالی خود فلز بوده است. این عملکرد به چندین جنبه از جمله خواص وابسته به اندازه نانو فلز، نسبت سطح به حجم بالای ذرات بسیار ریز و در نهایت ویژگی‌های غیر متعارف مربوط به وجود سطح مرتبط گزارش شده است (۱۶، ۱۷). نانوذره اکسید مس نسبت به نانوذره نقره ارزانتر است و به آسانی با پلیمرها مخلوط می‌گردد و از لحاظ فیزیکی و شیمیایی نسبتاً پایدار است. نانو ذرات به شدت یونی اکسید فلزی نظیر اکسید مس، دارای پتانسیل لازم برای کاربرد به عنوان عوامل ضد میکروبی می‌باشند و می‌توانند با ناحیه سطحی بسیار وسیع و مورفولوژی های کریستالی مختلفی تهیه شوند (۱۸، ۱۹). به نظر می‌رسد که مس و ترکیبات حاوی آن، اثر ضد میکروبی خود را با تولید رادیکال های هیدروکسیل فعال اعمال می‌کنند که می‌تواند باعث آسیب های جبران ناپذیری مانند اکسیداسیون پروتئین ها، برش مولکول های DNA و RNA و آسیب غشایی به دلیل پراکسیداسیون لیپیدی شود (۲۰، ۲۱). هنوز دانش قطعی در مورد تعامل نانوذرات اکسید مس با میکروارگانیسم ها و نفوذ احتمالی نانوذرات به سلولهای میکروبی وجود ندارد اما گزارشات دیگری نیز در خصوص مکانیسم اثرات ضد میکروبی این ترکیبات به چشم می‌خورد. به عنوان مثال Applerot و همکارانش با هدف روشن کردن فعالیت ضد باکتریایی اکسید مس وابسته به اندازه (از مقیاس کوچک تا مقیاس نانو) آزمایشاتی انجام دادند. در پژوهش آنها نیز مشخص گردید که فعالیت ضد باکتریایی قوی نانوذرات اکسید مس به دلیل تولید

باکتریایی وسیعی از خود نشان دادند. در مطالعه Swain و همکاران قطر اکسید مس سنتز شده ۹۲ نانومتر بود که غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای استافیلوکوک اورئوس، گونه های ویبریو و سودوموناس آئروژینوزا اثر بازدارندگی داشت و از غلظت ۱ تا ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای سویه های باسیلوس سوبتیلیس، گونه های سیتروباکتر، فلاووباکترها و آئروموناس هیدروفیلا اثر بازدارندگی نشان داد (۲۷). در مطالعه ما نانوذرات اکسید مس با قطر بین ۵۲ تا ۱۴۴ نانومتر در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر به بالا برای استپتوکوکوس اینیایی و در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر برای اشرشیا کلی اثر بازدارندگی نشان داد.

در پژوهش ما اثرات ضدقارچی قابل توجهی نیز علیه سویه استاندارد آبی فوزاریوم سولانی مشاهده گردید که در غلظت های بیشتر از ۵۰ میلی گرم نانوذره، میزان این بازدارندگی تشدید می شد. در پژوهش های مشابه، گونه های متعددی از جمله آسپرژیلوس به عنوان یک قارچ فرصت طلب، با نانوذرات حاوی مس در اندازه حدوداً ۲۵ نانومتری به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد محیط آنکوبه شدند. در نتایج به دست آمده، جوانه زنی هاگ یا رشد رشته های رویشی مشخص نگردید اما الکتروفورز DNA ژنومی جدا شده پس از قرار گرفتن در معرض نانوذرات، نشان دهنده تکه تکه شدن ژنوم قارچ و نفوذ نانوذره در دیواره سلولی بوده است (۲۸). همچنین بررسی فعالیت نانوذرات مس علیه گونه کاندیدا آلبیکنس طی مطالعه دیگری حاکی از آن بود که مخمر قرار گرفته در معرض یک سطح مسی، در مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۳ درجه سانتی گراد غیرفعال می گردد. در آن مطالعه، رنگ فلورسنت دی هیدروآتیدیوم، برای شناسایی ROS سیتوپلاسمی در کنار یک رنگ حساس به مس که جذب نانوذره را نشان می داد، جهت نشان دادن اهمیت یون های مس در فعالیت قارچ کشی، استفاده شد. رنگ آمیزی بافت های زنده/مردم مخمری نشان داد که غشاها در مواجهه با سطح مس فوراً آسیب می بینند، که این خود نشان می دهد تعامل فیزیکی نانوذرات Cu با سلول مخمری در مکانیسم مرگ سلولی آن، حیاتی می باشد (۲۹).

آروماتیک گروه آلکن (C=C) اختصاص داد. قله های دیگر قابل مشاهده در نمودار، به ارتعاش تغییر شکل باند گروه های آلکانی، الکل های اولیه و ثانویه و نیز ارتعاش خمشی گروه های آروماتیک مربوط بود.

طی پژوهش ما، اثرات هم افزایی یا پوشش دهی نانوذرات اکسید مس با مواد دیگر انجام نشد اما خواص ضدباکتریایی آن بر علیه دو گونه باکتریایی استپتوکوکوس اینیایی و اشرشیا کلی در مقایسه با آنتی بیوتیک ها و همینطور اثرات ضدقارچی نانوذرات علیه گونه فوزاریوم سولانی، که هر سه ساکن محیط های آبی نیز می باشند، بررسی گردید. نتایج نشان داد که اشرشیا کلی طی سنجش بازدارندگی در روش چاهک در غلظت های پایین تری از رشد بازداشته می شود در حالی که در تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC)، حتی در غلظت بالای نانوذره مس اثر خوبی نسبت به آنتی بیوتیک ها نشان نداد که این رفتار، ناشی از تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتریایی آنها نسبت به استپتوکوکوس اینیایی است. بنابراین، باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به طور کلی مقاومت متفاوتی در برابر نانوذرات اکسید فلزی از خود نشان می دهند.

در مطالعه Slosarczyk و همکاران در سال ۲۰۲۳ از نانوذرات اکسید مس برای توقف رشد باکتری های گرم مثبت (باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس) و گرم منفی (باکتری پسدوموناس آئروژینوزا) استفاده شد. در این مطالعه نشان داده شد که نانوذرات اکسید مس، در تمام غلظت های آزمایش شده، خواص ضد باکتریایی دارند. با این وجود، بهترین خواص مکانیکی، نانوذرات اکسید مس در ۰/۲۵ درصد وزنی به دست آمد (۲۶). در مطالعه Swain و همکاران در سال ۲۰۱۴ که به مطالعه فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مبتنی بر فلز در برابر میکروب های مرتبط با بیماری های موجود در آبی پروری پرداختند، نانوذرات فلزی و اکسید فلزی سنتز شده تجاری و آزمایشگاهی مختلف برای فعالیت های ضد میکروبی خود در برابر طیف وسیعی از عوامل باکتریایی و قارچی از جمله سیانوباکتری های خاص آب شیرین غربالگری شدند. در میان نانوذرات مختلف، اکسید مس سنتز شده (CuO)، اکسید روی (ZnO)، فعالیت ضد

فوری برای توسعه جایگزین های جدید در مقابله با میکروارگانیسم های مقاوم به چند دارو و همچنین نقش محافظتی نانوذرات مس و دوره بازیابی مورد نیاز برای ایمن بودن نانوذرات مس برای استفاده به عنوان یک آنتی باکتریال برای هر گونه ماهی در صنعت آبی پروری ضروری خواهد بود.

بطور کلی می توان گفت با وجود پیشرفت عظیم چند دهه اخیر در درک تأثیر مس و نانوذرات حاوی آن بر میکروارگانیسم ها، بسیاری از سؤالات بی پاسخ در مورد اثر ضد میکروبی آنها همچنان باقی مانده است. لذا شناخت کامل این فرآیند و مکانیسم های مرتبط با آن، به ویژه با توجه به استفاده گسترده از مس به عنوان یک عامل ضد میکروبی در کاربردهای مختلف و ضرورت

نتیجه گیری

بیماری زای برجسته مانند استرپتوکوکوس اینیایی و اشرشیا کلی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین نتایج بدست آمده از این مطالعه اثرات قابل توجه ضد قارچی را در تمامی غلظت های به کار رفته از ۱۲/۵ تا ۱۰۰ میلی گرم، نشان داد که این بازدارندگی مطلوب می باشد. به طور کلی، این مطالعه ساده، کم هزینه، سازگار با محیط زیست و بهره‌وری بالا از ساخت نانوذرات اکسید مس را ارائه نمود.

نانوذرات اکسید مس سنتز شده در این پژوهش کروی شکل و به اندازه حدوداً ۵۱ تا ۱۴۴ نانومتر بودند که در محدوده مناسبی جهت کاربرد به عنوان داروهای ضد میکروبی و اهداف پزشکی است. نتایج فعالیت ضد میکروبی نانوذرات اکسید مس تولید شده در این مطالعه، نشان داد که در صورتی که پروسه بالینی آن تأیید شود قابل رقابت با برخی آنتی بیوتیک های باکتریایی تجاری مثل پنی سیلین، تتراسایکلین و آموکسی کلاو، خواهد بود، که می‌توانند از نظر دارویی برای مبارزه با باکتری‌های

تشکر و قدردانی

نویسندگان از همه کسانی که آنان را در انجام این پروژه همیاری کردند کمال امتنان را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که تعارض منافع وجود ندارد.

مصوبات پژوهشی

شناسه اخلاق: IR.IAU.CTB.REC.1401.087

References

1. Anuj SA, Gajera HP, Hirpara DG, Golakiya BA. Interruption in membrane permeability of drug-resistant *Staphylococcus aureus* with cationic particles of nano silver. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;127:208-16.
2. Anuj SA, Gajera HP, Hirpara DG, Golakiya BA. Bactericidal assessment of nano-silver on emerging and re-emerging human pathogens. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2019;51:219-25.
doi: 10.1016/j.jtemb.2018.04.028
3. Baptista PV, McCusker MP, Carvalho A, Ferreira DA, Mohan NM, Martins M, Fernandes AR. Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria—“A Battle of the Titans”. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1441.
doi: 10.3389/fmicb.2018.01441
4. Karunakaran C, SakthiRaadha S, Gomathisankar P. Photocatalytic and bactericidal activities of hydrothermally and sonochemically prepared Fe₂O₃-SnO₂ nanoparticles. *Materials Science in Semiconductor Processing*. 2013;16(3):818-24.
https://doi.org/10.1016/j.mssp.2012.12.030
5. Elemike EE, Onwudiwe DC, Nundkumar N, Singh M. CuO and Au-CuO nanoparticles mediated by *Stigmaphyllon ovatum* leaf extract and their anticancer potential. *Inorganic Chemistry Communications*. 2019;104:93-7.
https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.03.03
6. Saravanakumar K, Sathiyaseelan A, Mariados AV, Xiaowen H, Wang MH. Physical and bioactivities of biopolymeric films incorporated with cellulose, sodium alginate and copper oxide nanoparticles for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;153:207-14.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.250
7. 7- Khoshhal Z, Vaziri A, Rahbarian R. Green production of silver nanoparticles from *Eryngium planum* and its antibacterial effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2023; 17(4): 77-92
10.30495/ZISTI.2023.1983554.1158
8. Farazandeh AR, Noorbakhsh F, Honarmand jahromi S. Effect of silver nanoparticles on surface hydrophobicity and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2021;16(1),19-31
9. Dagher S, Haik Y, Ayesh AI, Tit N. Synthesis and optical properties of colloidal CuO nanoparticles. *Journal of Luminescence*. 2014;151:149-54.
https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2014.02.015
10. Grigore ME, Biscu ER, Holban AM, Gestal MC, Grumezescu AM. Methods of synthesis, properties and biomedical applications of CuO nanoparticles. *Pharmaceuticals*. 2016;9(4):75.
https://doi.org/10.3390/ph9040075
11. Nations S, Long M, Wages M, Maul JD, Theodorakis CW, Cobb GP. Subchronic and chronic developmental effects of copper oxide (CuO) nanoparticles on *Xenopus laevis*. *Chemosphere*. 2015;135:166-74.
12. Ali Soomro R, Tufail Hussain Sherazi S, Memon N, Raza Shah M, Hussain Kalwar N, Richard Hallam K, Shah A. Synthesis of air stable copper nanoparticles and their use in catalysis. *Advanced Materials Letters*. 2014;5(4):191-8.
13. Qamar H, Rehman S, Chauhan DK, Tiwari AK, Upmanyu V. Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanomaterial derived from *Momordica charantia*. *International journal of nanomedicine*. 2020;2541-53.
14. Talebian S, Shahnavaaz B, Nejabat M, Abolhassani Y, Rassouli FB. Bacterial-mediated synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles with antibacterial, antioxidant, and anticancer potentials. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023;11:1140010.
15. Atri A, Echabaane M, Bouzidi A, Harabi I, Soucase BM, Chaâbane RB. Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Ephedra Alata* plant extract and a study of their antifungal, antibacterial activity and photocatalytic performance under sunlight. *Heliyon*. 2023;9(2), e13484.
https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13484
16. Yoon KY, Byeon JH, Park JH, Hwang J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 2007;373(2-3):572-5.
doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.11.007.
17. Applerot, G., Lellouche, J., Lipovsky, A., Nitzan, Y., Lubart, R., Gedanken, A. and Banin, E. (2012),

Understanding the Antibacterial Mechanism of CuO Nanoparticles: Revealing the Route of Induced Oxidative Stress. *Small*, 2012;8(21): 3326-3337.

<https://doi.org/10.1002/sml.201200772>

18. Vorobyova V, Vasyliiev G, Uschapovskiy D, Lyudmyla K, Skiba M. Green synthesis, characterization of silver nanoparticles for biomedical application and environmental remediation. *Journal of Microbiological Methods*. 2022;193:106384.

19. Saha T, Mobarak MB, Uddin MN, Quddus MS, Naim MR, Pinky NS. Biogenic synthesis of copper oxide (CuO) NPs exploiting *Averrhoa carambola* leaf extract and its potential antibacterial activity. *Materials Chemistry and Physics*. 2023;305:127979.

20. Alavi M, Dehestaniathar S, Mohammadi S, Maleki A, Karimi N. Antibacterial activities of phytofabricated ZnO and CuO NPs by *Mentha pulegium* leaf/flower mixture extract against antibiotic resistant bacteria. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2021;11(3):497.

21. Bandeira M, Giovanela M, Roesch-Ely M, Devine DM, da Silva Crespo J. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: A review of the synthesis methodology and mechanism of formation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2020;15:100223.

<https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100223>

22. Franco D, Calabrese G, Guglielmino SP, Conoci S. Metal-based nanoparticles: Antibacterial mechanisms and biomedical application. *Microorganisms*. 2022;10(9):1778.

23. Applerot G, Lellouche J, Lipovsky A, Nitzan Y, Lubart R, Gedanken A, Banin E. Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: revealing the route of induced oxidative stress. *Small*. 2012;8(21):3326-37.

24. Zhang Q, Zhang K, Xu D, Yang G, Huang H,

Nie F, Liu C, Yang S. CuO nanostructures: synthesis, characterization, growth mechanisms, fundamental properties, and applications. *Progress in Materials Science*. 2014;60:208-337.

25. Sathiyavimal S, Vasantharaj S, Kaliannan T, Garalleh HA, Garaleh M, Brindhadevi K, Chi NT, Sharma A, Pugazhendhi A. Bio-functionalized copper oxide/chitosan nanocomposite using *Sida cordifolia* and their efficient properties of antibacterial, anticancer activity against on breast and lung cancer cell lines. *Environmental Research*. 2023;218:114986.

26. Hong MZ, Li JM, Chen ZJ, Lin XY, Pan JS, Gong LL. Global burden of major gastrointestinal cancers and its association with socioeconomic, 1990–2019. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:942035.

27. Ślosarczyk A, Klapiszewska I, Parus A, Balicki S, Kornaus K, Gapiński B, Wiczorowski M, Wilk KA, Jesionowski T, Klapiszewski Ł. Antimicrobial action and chemical and physical properties of CuO-doped engineered cementitious composites. *Scientific Reports*. 2023;13(1):10404.

28. Swain P, Nayak SK, Sasmal A, Behera T, Barik SK, Swain SK, Mishra SS, Sen AK, Das JK, Jayasankar P. Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;30:2491-502.

29. Goma EZ, Housseiny MM, Omran AA. Fungicidal efficiency of silver and copper nanoparticles produced by *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17397 against four *Aspergillus* Species: A molecular study. *Journal of Cluster Science*. 2019;30:181-96.

30. Quaranta D, Krans T, Espírito Santo C, et al. Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(2):416-426