

## بررسی مقایسه اثرات آنتی باکتریال نانو پار تیکل های نقره و اکسید روی بر رشد باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتر

مریم راکبی زاده<sup>۱</sup>، مهشید زاهدی زاده<sup>۲</sup>، سعید حبیب اخیری<sup>۳</sup>، یدالله عدالت پناه<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد میکروبیولوژی و کارشناس بخش میکروب شناسی آزمایشگاه مهر دهدشت، دهدشت، ایران.

<sup>۲</sup> کارشناسی ارشد بیوشیمی و کارشناس بخش بیوشیمی آزمایشگاه مهر دهدشت، دهدشت، ایران.

<sup>۳</sup> متخصص پاتولوژی و مسئول فنی آزمایشگاه مهر دهدشت، دهدشت، ایران.

<sup>۴</sup> دانشجوی دکتری بیوشیمی و مدرس گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور دهدشت، دهدشت، ایران.

### چکیده

نانوتکنولوژی جایگاه موفقیت آمیزی به عنوان یکی از تحقیقات حیاتی در قرن بیست و یکم پیدا کرده است و نانو ذرات اکسید روی و نقره با توجه به خواص ضد میکروبی که دارند در این تحقیق علیه سویه های جدا شده ی سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتر مورد بررسی قرار گرفتند. نانو ذرات اکسید روی و نقره با قطر ذرات ۲۵-۲۰ نانومتر خریداری و بصورت محلول با غلظت های ۱mM، 3mM، 5mM و 8mM تهیه گردیدند. بر روی محیط کشت آگار از محلول های تهیه شده علیه باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتر استفاده شد. دستگاه اسپکتروفوتومتر در 600nm تنظیم و در غلظت های 1mM، 3mM، 5mM و 8mM ضریب جذب باکتری ها اندازه گیری شد. سه بار آزمایش ها تکرار و برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون آماری ANOVA استفاده گردید. نتایج این مطالعه در خصوص اندازه گیری قطر عدم تشکیل هاله نشان داد که نانوذره نقره نسبت به اکسید روی خاصیت ضد میکروبی قوی تری داشته و در غلظت های 5mM و 8mM نسبت به 1mM و 3mM قطر عدم تشکیل هاله حداکثر بوده که در سطح  $p < 0.05$  این تفاوت معنادار بوده است. نتایج اندازه گیری ضریب جذب باکتری نشان داد نانوذره نقره نسبت به اکسید روی خاصیت ضد میکروبی قوی تری داشته است. نتایج این مطالعه نشان داد نانوذره نقره نسبت به اکسید روی خاصیت ضد باکتریایی قوی تری داشته که این نانو ذرات بر روی سودوموناس آئروژینوزا نسبت به انتروباکتر تاثیر ضد میکروبی قوی تری داشته اند.

**کلمات کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر، نانو اکسید روی، نانو ذره نقره و نانو پار تیکل

## ۱- مقدمه:

نانو ذرات در چرخه حیات و اکوسیستم، پایین ترین سطح سمیت را از خود نشان داده اند لذا استفاده از این مواد برای مبارزه با میکروب های بیماری زا می تواند انتخاب مناسبی باشد. نانو ذرات اکسید فلزی، بر اساس نسبت سطح به حجم، خاصیت ضد باکتریایی متفاوتی از خود نشان می دهند. باکتری های گرم مثبت در مقایسه با باکتری های گرم منفی در مقابل نانو ذرات فلزی، مقاومت بیشتری از خود نشان می دهند که این می تواند به ساختار دیواره سلولی ارتباط داشته باشد. (بنیو، ۲۰۱۱).

تحقیقات متعدد، مبتنی بر واکنش های احتمالی بین نانو ذرات با ماکرومولکول های موجودات زنده انجام گرفته است. اختلاف بین بار منفی میکروارگانیزم و بار مثبت نانوذره، به صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروب و نانوذره عمل کرده و باعث اتصال نانوذره به سطح سلول شده و در نتیجه می تواند باعث مرگ سلول شود (وینرو، ۲۰۱۰). در نهایت تعداد زیادی از این تماس ها منجر به اکسیدشدن مولکول های سطحی میکروب ها و مرگ سریع آن ها می شوند. احتمال داده می شود یون های آزاد شده از نانو مواد با گروه های تیول پروتئین های سطحی سلول های باکتریایی واکنش دهند. تعدادی از این پروتئین های غشای سلول های باکتریایی عمل انتقال مواد معدنی از سطح دیواره را به عهده دارند؛ که نانو مواد با اثر بر روی این پروتئین ها باعث غیر فعال شدن و نفوذ ناپذیری غشاء می شوند (تیلی، ۲۰۱۲).

غیر فعال شدن تراوایی غشاء در نهایت باعث مرگ سلول می شود. همچنین نانو مواد چسبیدن سلول باکتری و تشکیل بیوفیلم را به تأخیر می اندازند که این عمل باعث می شود گروهی از باکتری ها نتوانند تثبیت شوند و تکثیر یابند (دوتا و همکاران، ۲۰۱۲). تغییرات ضد میکروبی که از رشد باکتری بیماری زا ممانعت می کنند، یک هدف مطلوب محسوب می شود. عوامل ایجاد کننده عفونت ها می توانند متعدد باشند. تشکیل کلنی، رشد سلول باکتری و تشکیل ماتریکس های بیوفیلمی فشرده میکروبی، باکتری ها را در مقابل سیستم دفاعی میزبان مقاوم می کند، که نانو ذرات از تشکیل این عوامل دفاعی میکروب در برابر سیستم ایمنی میزبان جلوگیری می کند (سلووم و همکاران، ۲۰۱۲).

در سال های اخیر نانو ذرات غیرآلی ساختارشان از نظر فیزیکی، شیمیایی و خصوصیات زیستی مورد توجه بسیاری قرار گرفته اند، پتانسیل بالای نانو مواد در بیولوژی و فارماکولوژی نظر بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. از جمله کاربرد نانو مواد می توان به درمان بیماری ایدز اشاره کرد (پول و همکاران، ۲۰۰۳ و هیت و همکاران، ۲۰۰۳). از نانو ذرات می توان در برنامه های انتقال دارو، تولید تصاویر میکروسکوپی با کیفیت بالا، درمان سرطان و درمان بیماری ها استفاده کرد (تی هسینگ و همکاران، ۲۰۰۷) از کاربردهای نانوتکنولوژی می توان به استفاده از لیپوزوم ها برای انتقال دارو جهت درمان سرطان اشاره کرد. نانوتکنولوژی پزشکی روش درمان بیماری های لیشمانیازیس و ایدز را بیان می کند. ( وارهیت و همکاران، ۲۰۰۴) از جمله نانو ذرات پر کاربرد می توان به نانو ذره اکسید روی اشاره کرد که خاصیت آنتی باکتریال بسیار قوی در برابر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی از خود نشان می دهد. این نانو ذره به عنوان حامل دارویی استفاده می گردد و بر روی فعالیت های باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* اثرگذار است. (بوگونیا و سوگیساکا، ۲۰۰۲). نانو ذره اکسید روی باعث تخریب چربی و پروتئین غشا سلولی باکتری می گردد. و به عنوان یک ماده آنتی باکتریال در برابر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی تلقی می گردد. (براینر و همکاران، ۲۰۰۶). نانو ذره نقره همچون اکسید روی خاصیت ضد میکروبی قوی داشته و با حمله به دیواره باکتری های گرم مثبت و گرم منفی منجر به از بین رفتن غشاء باکتری می گردد و از بیماری زایی باکتری ها جلوگیری می نماید (لارا و همکاران، ۲۰۱۰). نانوذره نقره بر روی باکتری هایی که مقاومت دارویی از خود نشان می دهند تاثیر داشته و از فعالیت آنها جلوگیری می نماید. (شریواستوا و همکاران، ۲۰۱۰). این مطالعه با هدف بررسی مقایسه اثرات آنتی باکتریال نانو پارتیکل های نقره و اکسید روی بر باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* صورت گرفته است و سوالی که باید به آن پاسخ داده شود این است که از میان نانو ذرات اکسید روی و نقره کدام یک خاصیت ضد میکروبی قوی تری دارند؟

**۲- مواد و روش ها:****۲-۱- سویه های مورد استفاده و روش نگهداری آن**

سویه های استفاده شده در این تحقیق شامل *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 29213 و *انتروباکتر* ATCC14584 می باشند که از کلکسیون میکروبی ایران تهیه گردیده اند. این سویه ها در محیط کشت براث به اضافه ۰/۵ درصد عصاره مخمر با ۲۰ درصد گلیسرول در ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده اند (عدالت پناه و همکاران، ۲۰۱۴).

**۲-۲- نحوه تهیه محلول نانوذره اکسید روی**

نانو ذرات اکسید روی و نقره از شرکت TECONAN ساخت اسپانیا (قطر ذرات ۲۵-۲۰ نانومتر) خریداری شد. درصد خلوص نانو ذرات اکسید روی و نقره بیش از ۹۹.۹۸٪ بود. نانو ذرات اکسید روی و نقره در آب دوباره تقطیر استریل حل شدند و سونیکیت شدند به طوریکه آنها پراکنده شدند و تعلیق کلوئیدی یکسان را تشکیل دادند. تمام آزمایشات با استفاده از یک سیستم تعلیق تازه آماده کلوئیدی انجام گرفت. (عدالت پناه و همکاران، ۲۰۱۴).

**۲-۳- اثر نانو ذرات اکسید روی و نقره بر روی محیط کشت آگار علیه باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر*:**

محلول های نانو ذرات اکسید روی و نقره با غلظت های ۱mM، 3mM، 5mM و 8mM آماده گردید و بر روی محیط کشت آگار حاوی باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* در نقاط مشخص ریخته و بعد از گذشت ۲۴ ساعت که پلیت ها در اکوباتور (صنایع پزشکی ایران تولید) با دمای ۳۷ درجه نگهداری شد و بوسیله خط کش قطر عدم تشکیل هاله اندازه گیری گردید. (عدالت پناه و همکاران، ۲۰۱۴).

**۲-۴- اندازه ضریب جذب باکتری بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتری:**

برای اندازه گیری ضریب جذب باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت سیگما) را در طول موج ۶۰۰ نانومتر تنظیم و از غلظت های ۱mM، 3mM، 5mM و 8mM نانوذره اکسید روی و نقره در محیط کشت براث که قبل از افزودن محلول نانو ذرات با افزودن باکتری ها آلوده گردید برای اندازه گیری ضریب جذب باکتری ها در یک بازه زمانی ۴۸ ساعت استفاده گردید. (عدالت پناه و همکاران، ۲۰۱۴).

**۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری:**

برای تجزیه و تحلیل آماری از آزمون واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده گردید و در سطح  $P < 0.05$  سطح معناداری مورد بررسی قرار گرفت و تعداد تکرار برای هر آزمایش ۳ بوده است.

**۳- نتایج:**

نتایج اندازه گیری عدم تشکیل قطر هاله در اثر افزودن محلول نانو نقره در محیط کشت آگار برای باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* نشان داد در غلظت های 5mM و 8mM بیشترین قطر عدم تشکیل هاله مشاهده گردید که در سطح  $p < 0.05$  این تفاوت معنادار بوده است. در ارتباط با تاثیر نانو نقره بر روی باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* نتایج نشان داد که *انتروباکتر* مقاومت بیشتری نسبت به نانو نقره در مقایسه با *سودوموناس آئروژینوزا* داشته است. همچنین در خصوص افزودن نانو اکسید روی نتایج نشان داد در غلظت های 5mM و 8mM بیشترین قطر عدم تشکیل هاله مشاهده گردید که در سطح  $p < 0.05$  این تفاوت معنادار بوده است و *انتروباکتر* مقاومت بیشتری نسبت به نانو اکسید روی در مقایسه با *سودوموناس آئروژینوزا* داشته است. در ارتباط با مقایسه تاثیر نانوذره اکسید روی و نانو نقره بر رشد باکتری های *سودوموناس*

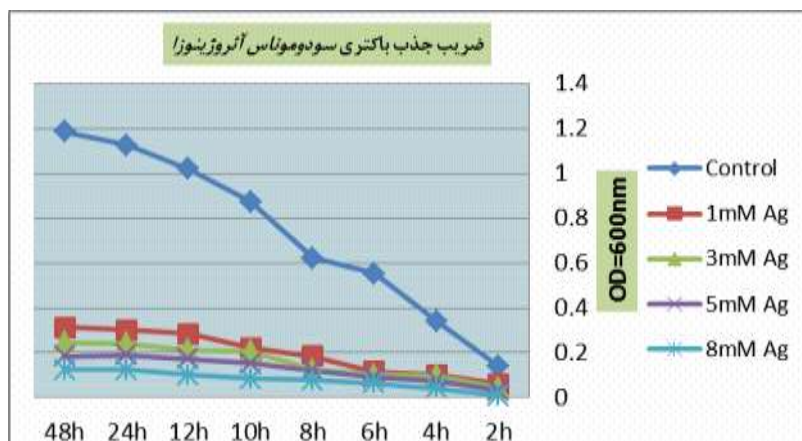
آئروژینوزا و انتروباکتر نتایج نشان داد که نانو نقره نسبت به نانو اکسید روی خاصیت ضد میکروبی قوی تری داشته است. (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج اندازه گیری عدم تشکیل قطر هاله با افزودن محلول نانو نقره و اکسید روی در محیط کشت آگار

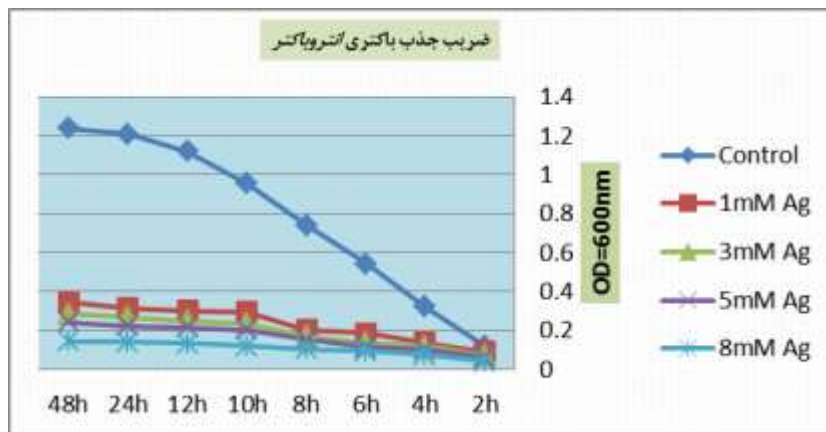
نوع باکتری		غلظت
انتروباکتر	سودوموناس آئروژینوزا	
8±1mm	12±2mm	1mM ZnO
9±3mm	14±3mm	3mM ZnO
11±2mm	16±2mm	5mM ZnO
13±2mm	18±1mm	8mM ZnO
9±3mm	13±3mm	1mM Ag
10±2mm	16±4mm	3mM Ag
12±4mm*	19±3mm*	5mM Ag
15±3mm*	23±2mm*	8mM Ag

\* در سطح  $P < 0.05$  این تفاوت نسبت به 1mM و 3mM معنادار است.

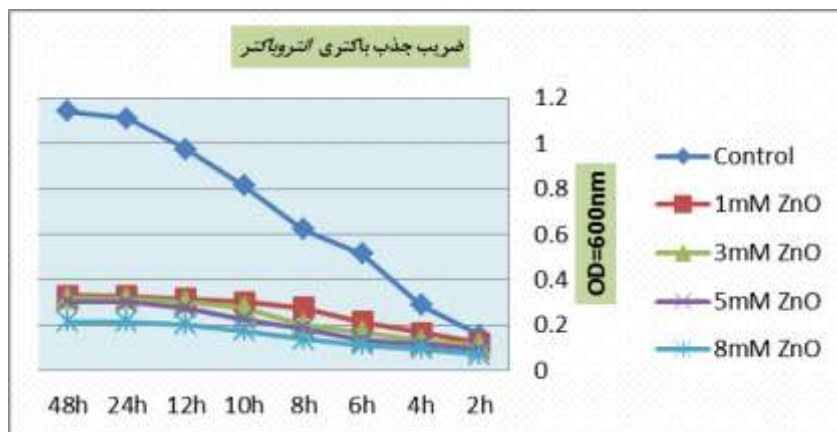
نتایج اندازه گیری ضریب جذب باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتر نشان داد که با گذشت زمان ضریب جذب باکتری در اثر افزودن غلظت های نانو ذرات اکسید روی و نقره افزایش و بعد از گذشت ۱۰ ساعت این رشد متوقف گردید. در خصوص غلظت های مورد استفاده علیه باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتر نتایج نشان داد که بیشترین خاصیت ضد میکروبی مربوط به غلظت 8mM بوده است. همچنین نتایج نشان داد که ضریب جذب باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به انتروباکتر پایین تر بوده که این نشان از مقاومت بیشتر انتروباکتر به نانو ذرات اکسید روی و نانو نقره نسبت به سودوموناس آئروژینوزا بوده است. در مقایسه اثر ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی و نقره علیه باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتر نتایج نشان داد که نقره تاثیر بیشتری بر مهار رشد باکتری ها داشته است. (شکل ۱، ۲، ۳ و ۴).



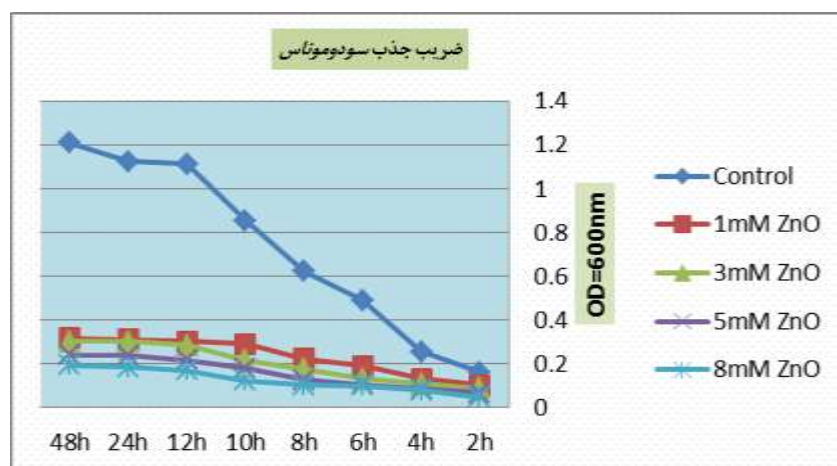
شکل ۱: ضریب جذب باکتری سودوموناس آئروژینوزا در اثر افزودن نانو نقره



شکل ۲: ضریب جذب باکتری *انتروباکتر* در اثر افزودن نانو نقره



شکل ۳: ضریب جذب باکتری *انتروباکتر* در اثر افزودن نانو اکسید روی



شکل ۴: ضریب جذب باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در اثر افزودن نانو اکسید روی

## ۴- بحث و نتیجه گیری:

این باور که نانو تکنولوژی عصر دیگری از علوم است و تلفیقی از مهندسی و زیست شناسی، شیمی، پزشکی و فیزیک می باشد را عموم دانشمندان پذیرفته اند. بررسی ها نشان داده است که هر چه اندازه نانو ذرات کوچک تر باشد، خصوصیات و فعالیت های جدید و متفاوت تری از خود نشان می دهند. این ویژگی ها باعث شده است که امروزه سرعت استفاده از نانو مواد بسیار سریع گسترش پیدا کند به طوری که در تمام ابعاد زندگی هم چون سیستم های الکتریکی، مبارزه با میکروب ها، تشخیص و درمان بیماری ها کاربرد آن شناخته شود (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۰).

نانو مواد که پایه آن ها از یون های فلزی است، دارای فعالیت سلول کشی گسترده ای هستند که علیه باکتری، قارچ و ویروس فعالیت دارند. نانو مواد و به خصوص نانو مواد فلزی به علت داشتن بار سطحی و نسبت سطح به حجم خود، آنزیم ها و DNA میکروارگانیسم ها را با تعادل الکترون بین گروه های دهنده الکترون مثل تیول، کربوکسیلات، آمید، ایمیدازول، اندول و هیدروکسیل غیر فعال می نمایند (روپارلیا و همکاران، ۲۰۰۹).

مکانیسم عمل اکسید روی، شبیه سایر نانو ذرات است ولی بیشتر از طریق تخریب دیواره باکتری عمل می کند با توجه به این ویژگی نانو ذره اکسید روی به عنوان یکی از پرکاربردترین نانو ذرات برای مقابله با باکتری های گرم منفی و گرم مثبت مورد استفاده قرار گرفته است (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

مکانیسم عمل نانو نقره به این صورت است که تنفس سلولی در حضور غلظت های مختلف نانونقره در گروه های مختلف باکتریایی یک الگوی مشابه را مطرح می کنند و آن کاهش تدریجی میزان تنفس سلولی به موازات افزایش غلظت نانو نقره است (هانکسون و همکاران، ۲۰۰۹).

طی مطالعه حاضر ما اثرات ضدباکتریایی نانو نقره و نانو اکسید روی را بر روی باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* مورد بررسی قرار دادیم. نتایج این مطالعه در خصوص عدم تشکیل قطر هاله نشان داده که هر چه غلظت کوچکتری از نانو ذرات علیه باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* بکار گرفته شود قطر عدم تشکیل هاله بزرگتر است بطوریکه نتایج این مطالعه نشان داده است که در غلظت 8mM بیشترین خاصیت ضد باکتریایی مشاهده گردید و از طرفی نانو نقره در مقایسه با نانو اکسید روی تاثیر بیشتری بر عدم تشکیل قطر هاله داشته است که یافته های این مطالعه با نتایج مطالعه عدالت پناه و همکاران (۲۰۱۴) در ارتباط با خاصیت ضد باکتریایی اثر مکملی نانو اکسید روی و اسید استیک بر رشد باکتری *سالمونلا* تیپیفی موریوم که نتایج نشان داد در غلظت 8mM بیشترین خاصیت ضد میکروبی را باکتری از خود نشان داده، مطابقت دارد. همچنین یافته های این پژوهش با نتایج مطالعه هومبرتو و همکاران (۲۰۱۰) که اثر مهار نانو ذرات نقره را بر روی باکتری هایی که مقاومت های دارویی زیادی از خود نشان می دهند بررسی نمودند و مشاهده کردند که نانو ذرات نقره اثر باکتریوستاتیک قابل ملاحظه ای بر روی این باکتری ها دارند همسو می باشد.

نتایج اندازه گیری ضریب جذب باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* در OD=600nm نشان داد که همچون محیط کشت جامد بیشترین خاصیت ضد میکروبی مربوط به غلظت 8mM بوده و گذشت زمان سبب شده که تا ۱۰ ساعت بعد از گذشت تزریق غلظت های محلول نانو ذرات به محیط کشت بر اثر ضریب جذب افزایش و بعد از آن متوقف شده است. با مقایسه نمودار ضریب جذب باکتری نتایج نشان می دهد که با افزودن نانو ذرات اکسید روی و نانونقره ضریب جذب باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* پایین تر از *انتروباکتر* بوده که می توان گفت *انتروباکتر* در برابر نانو ذرات از خود مقاومت بیشتری نشان می دهد. با مقایسه تاثیر نانو ذرات اکسید روی و نقره بر رشد باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتر* نتایج نشان داده که نانونقره خاصیت ضد میکروبی قوی تری دارد. نتایج این مطالعه با یافته های میر حسینی و همکاران (۲۰۱۴) که به بررسی تاثیر اثر مکملی نانوذره اکسید روی و اسید سیتریک بر رشد باکتری های گرم منفی و گرم مثبت صورت دادند و یافته های تحقیق نشان داد در غلظت های 8mM و 5mM ضریب جذب حداقل بوده همسو می باشد. همچنین یافته های این

مطالعه با نتایج نپی پور و همکاران (۱۳۹۴) که به بررسی مقایسه ای اثرات آنتی باکتریال نانو پارتیکل های نقره و روی بر باکتری های پاتوژن سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس پرداختند ، همسو می باشد. با توجه به کاربرد گسترده ای که نانو ذرات دارند و این ترکیبات نسبت به اکسیدهای فلزی از وزن کمتری داشته و سمیت آنها نیز کمتر است، از این ترکیبات برای مهار باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مقاوم به ترکیبات دارویی لازم است استفاده گردند.

#### ۵- تشکر و قدردانی:

از کارکنان آزمایشگاه مهر دهدشت که در انجام این مطالعه نهایت همکاری را بعمل آوردند تقدیر و تشکر بعمل می آوریم.

#### منابع:

1. Binyu Yu. Synthesis of Ag-TiO<sub>2</sub> composite nano thin film for antimicrobial application. *Nanotechnology* 2011;22:115-603.
2. Wenru Li. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010;2:23-7.
3. Tailee Hu. Anti-bacterial study using nano silver doped high density polyethylene pipe. *Sustain Environ Res* 2012;22:153-8.
4. Dutta R.K, et al. Studies on antibacterial activity of zno nanoparticles by ros induced lipid peroxidation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;94:143-50.
5. Selvam S, et al. Antibacterial effect of novel synthesized sulfated beta-cyclodextrin crosslinked cotton fabric and its improved antibacterial activities with zno, tio(2) and ag nanoparticles coating. *Int J Pharm* 2012;1-2:366-74.
6. Poole, C. P. J., Owens. F. J. (2003). *Introduction to Nanotechnology*. Hoboken, NJ, Wiley-Interscience.
7. Heath, J. R., Phelps, M. E., Hood, L. (2003). *NanoSystems biology*. *Mol. Imaging Biol.* 5, 312-325.
8. Te-Hsing, W., Yi-Der, T., Lie-Hang, S. (2007). The novel methods for preparing antibacterial fabric composites containing nano-material. *Solid State Phenomena*. 124, 1241-1244.
9. Morawski, A. M., Winter, P. M., Crowder, K. C., Caruthers, S. D., Fuhrhop, R. W., Scott, M. J., Robertson, J. D., Abendschein, D. R., Lanza, G. M., Wickline, S. A. (2004). Targeted nanoparticles for quantitative imaging of sparse molecular epitopes with MRI. *Magn. Reson. Med.* 51, 480-486.
10. Warheit, D. B., Laurence, B. R., Reed, K. L., Roach, D. H., Reynolds, G. A., Webb, T. R. (2004). Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 77, 117-125.
11. Bogunia-Kubik, K., Sugisaka, M. (2002). From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. *Biosystems*. 65, 123-138.
12. Brayner, R., Ferarri-Iliou, R., Brivois, N., Djediat, S., Benedetti, M. F., Fiévet, F. (2006). Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultra fine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.* 6, 866-870.
13. Lara HH. Ayalanunez NV, Ixtepan LC, Rodriguez P. CBactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2010;26:615-21.
14. Shrivastava S, Jyung wo, lungue M. Characterization of enhanced antibacterial effects of nano silver nano particles. *J Nanotechnol* 2010;25:103-25.

15. Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Daskalakis N, Jeuken L, Povey M. Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli. *J Nanoparticle Res* 2010;12:1625-36.
16. Ruparelia JP, Kumar A, Dutttagupta SP, Diao M, Yao M. Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes. *Water Res* 2009;43:5243-51.
17. Wang H, Wick RL, Xing B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Poll* 2009;77-1171:157.
18. Hanxuan Zh, Uwesiegert M, Ranliu F. Facile fabrication of ultrafine copper nanoparticles in organic solvent, nanoscale. *Res Lett* 2009;4:705-8.
19. Edalatpanah , Yadullah., Rahedan, Freshteh., Rostami, Manejeh., Rezaei ,Hadi., Sanaeiyan, Khadeigeh., Hosseini Alvand , Parisa ., Investigation of antibacterial activity of ZnO nanoparticles suspension containing citric acid against *Salmonella typhimurium* in mango and carrot juice, volume 3, issue 2, 2014, pages: 25-28
20. Barzegari Firouzabadi ,Fatemeh., Noori , Mohsen ., Edalatpanah, Yadolah., Mirhosseini ,Mahboubeh ., ZnO nanoparticle suspensions containing citric acid as antimicrobial to control *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in mango juice, *Food Control* 42 (2014) ,42:3, pp 310-314
21. Nabipour Y, Rostamzad A, Ahmadyasbchin S2 The Evaluation of Antimicrobial Properties of Zinc and Silver Nanoparticles on Pathogenic Bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*, *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, 2015, 23:5, pp 174-183.