دو فصلنامه
بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی
سال سوم، شماره ۱ و ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۳

بررسی تاثیر دوزهای مختلف نانوذرات نقره روی ژنوم باکتری اشریشیاکلی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD

سودا تبریزی[۱]، بهرام گلستانی ایمانی[۲] *، فرخ کریمی[۳]

[۱] کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران
[۲] استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران
[۳] استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

چکیده

نقره به عنوان یکی از مهم ترین مواد ضدمیکروبی در جهان محسوب می شود که در سال های اخیر به سبب خواص منحصر به فرد نانوذرات نقره، بیشتر مورد توجه بوده است. با توجه به اثرات سمی نانوذرات نقره روی میکروارگانیسم ها، از آن ها در درمان عفونت ها استفاده می شود. در مطالعه حاضر، اثرممانعت رشد نانوذرات نقره نسبت به دوز و زمان های مواجهه مختلف بررسی گردید. برای این منظور، مدل باکتری گرم منفی اشریشیاکلی سویهO157:H7 انتخاب شد. جهت بررسی تاثیر نانوذرات نقره ابتدا محلول استوک نانوذرات نقره تهیه شد و غلظت‌های متفاوت ۷۵ و ۹۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول استوک نانوذرات به هر کدام از لوله‌های حاوی محیط کشت باکتری تلقیح شدند، بعد از ۱، ۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور شیکردار، از DNA نمونه های تیماراستخراج انجام گرفت. تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمراز رپید(RAPD-PCR) جهت بررسی تنوع ژنتیکی به کار گرفته شد. مارکرهای رپید (RAPD) با استفاده از نرم افزار NTSYS-PC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بر اساس ماتریس تشابه، بین باکتری های تیمار شده و کنترل فاصله ژنتیکی زیادی مشاهده شد. مکانیسم های بسیاری درباره نحوه اثر نانوذرات نقره روی میکروارگانیسم ها پیشنهاد شده است. در این مطالعه رویکرد ژنوتوکسیک نانوذرات نقره در نظر گرفته شده است که نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که غلظت های مذکور بر رشد باکتری گرم منفی اشریشیاکلی اثرمهاری شدیدی بعد از ۲۴ ساعت تیمار داشتند. نتایج حاصل از بررسی مهارکنندگی رشد نانوذرات نقره در این تحقیق حاکی از تغییرتوالی DNA باکتری می باشد.

واژه‌های کلیدی: اشرشیاکلی، تغییر ژنتیکی، نانوذرات نقره، RAPD-PCR

مقدمه

یکی از شاخه‌های کاربردی در زمینه نانوتکنولوژی، استفاده از فن‌آوری نانوسیلور می‌باشد. در این تکنولوژی، یون‌های نقره به صورت کلوئیدی در محلول به حالت سوسپانسیون قرار داده می‌شوند (۱ و ۲). نانو نقره‌ها، خوشه‌هایی از اتم‌های نقره با اندازه‌های ۱–۱۰۰ نانومتر می‌باشند و به سبب خواص فیزیکی و شیمیایی منحصربفرد، به طور وسیع در زمینه‌های گوناگون مورد استفاده قرار می‌گیرند(۳). در

* **مسئول مکاتبات:** golestani_bahram@yahoo.com

سال‌های اخیر، اثرات ضد میکروبی نمک‌های آمونیوم، نمک های محلول فلزی و آنتی بیوتیک‌ها به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند که متاسفانه، برخی از این عوامل، توکسیک بوده و یا اثر بسیار ضعیفی دارند. از طرفی مقاومت‌های آنتی بیوتیکی نیز در حال افزایش است؛ اما در مقابل، نقره، غیر سمی و دارای خواص ضدعفونی است که می‌تواند عفونت‌های باکتریایی را به طور چشمگیری کاهش دهد (۴). در واقع مواد در ابعاد نانومتر شاخصه هایی را از خود نشان می‌دهند که مطالعه آن‌ها عرصه جدیدی را در علم به خود اختصاص داده است(۵). تاکنون در مورد تأثیرات ضدباکتری نانوسیلور مطالعات گسترده‌ای صورت گرفته است که همگی بر ویژگی‌های ضد باکتری نانوذرات نقره و کاربرد مؤثر آن در این راستا تأکید داشته‌اند (۸– ۶). به گفته محققان یون‌های نقره با ۴ ترکیب مهم باکتری واکنش می‌دهند: با پپتیدوگلیکان‌های دیواره سلولی (۹)، غشای پلاسمایی(۱۰)، DNA سیتوپلاسمیک باکتری (۱۱و ۱۲) و پروتئین‌های باکتریایی به خصوص آنزیم‌هایی که در مراحل حیاتی سلول همانند زنجیره انتقال الکترون شرکت دارند(۱۱و۹).

مواد و روش‌ها

این بررسی به روش تجربی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد ارومیه طی مراحل زیر انجام پذیرفت.

مواد. محیط‌های‌کشت مورد نیاز Eosin Methylene Blue، Blood agar و Brain Heart Broth ساخت شرکت مرک آلمان، از آزمایشگاه باکتری شناسی دانشکده دامپزشکی تهیه شد. پودر نانوذرات نقره با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر توسط گروه شیمی آلی دانشگاه دولتی مراغه سنتز شد. مواد مورد استفاده در الکتروفورز شامل پودر آگاروز– مارکر لدر که از شرکت اکسیر آزما و loading buffer و Red safe از شرکت ویراژن تهیه شدند. جهت استخراج DNA ،کیت استخراج DNA و الکل ۹۶ مورد استفاده قرار گرفت. کیت PCR شامل - $dNTP\ mix$ -$MgCl_2$ - PCR Buffer - Taq DNA pol که از شرکت سیناژن تهیه گردیدند و پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق توسط آقای دکتر فرخ کریمی از دانشگاه مراغه تهیه شد. توالی و مشخصات پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

روش شناسی در مطالعه حاضر، اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره نسبت به دوز و زمان های مواجهه مختلف بررسی گردید. برای این منظور، مدل باکتری گرم منفی اشریشیاکلی سویهO157:H7 انتخاب شد. جهت بررسی تاثیر نانوذرات نقره ابتدا محلول استوک نانوذرات نقره تهیه و غلظت‌های متفاوت ۷۵ و ۹۰ میکروگرم بر میلی لیتر از محلول استوک نانوذرات به هر کدام از لوله‌های حاوی محیط کشت باکتری تلقیح شدند. بعد از ۱، ۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون در انکوباتور شیکردار، از DNA نمونه‌های تیماراستخراج انجام گرفت. تکنیک RAPD-PCR جهت بررسی تنوع ژنتیکی به کار گرفته شد.

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورداستفاده

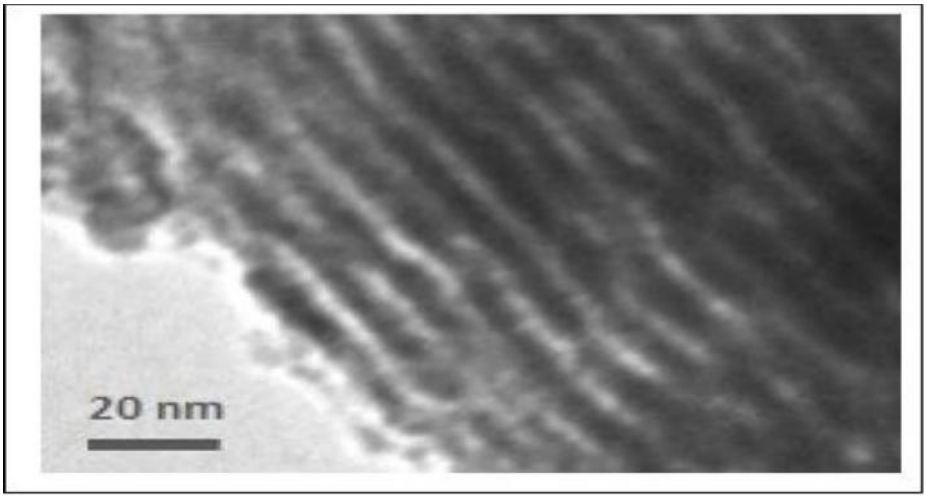
نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی پرایمر
OPT14	AATGCCGCAG
OPB	GTTTCGCTCC
OPD	ACCGCGAAGG
OPS11	AGTCGGGTGG
OPQ17	GAAGCCCTTG
OPA10	GTGATCGCAG
OPS05	TTTGGGGCCT
OPA11	CAATCGCCGT

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی پرایمر
OPA09	GGGTAACGCC
OPR12	ACAGGTGCGT
OPC09	CTCACCGTCC
OPT17	TCTGGTGAGG
OPD04	TCTGGTGAGG
OPR11	GTAGCCGTCT
OPS14	AAAGGGGTCC

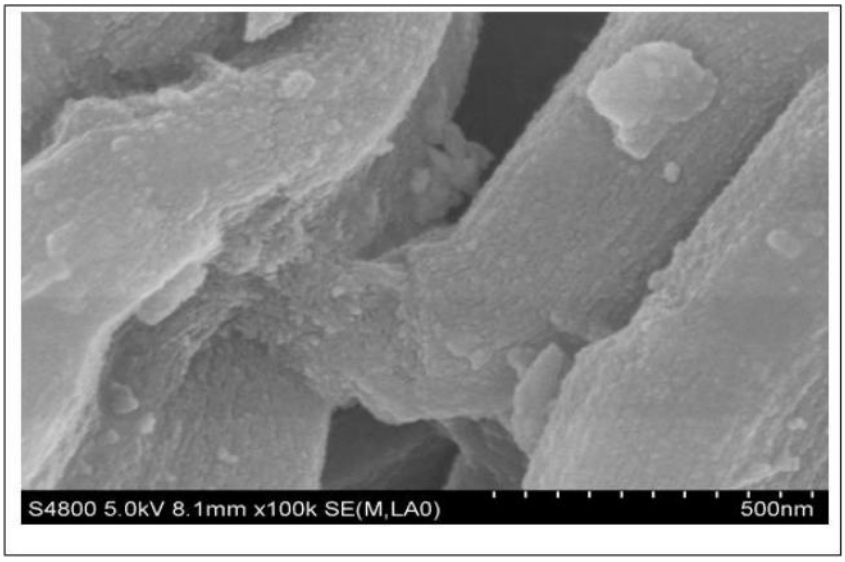
مارکرهای RAPD با استفاده از نرم‌افزار NTSYS-PC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بر اساس ماتریس تشابه، بین باکتری‌های تیمار شده و کنترل فاصله ژنتیکی زیادی مشاهده شد.

نتایج

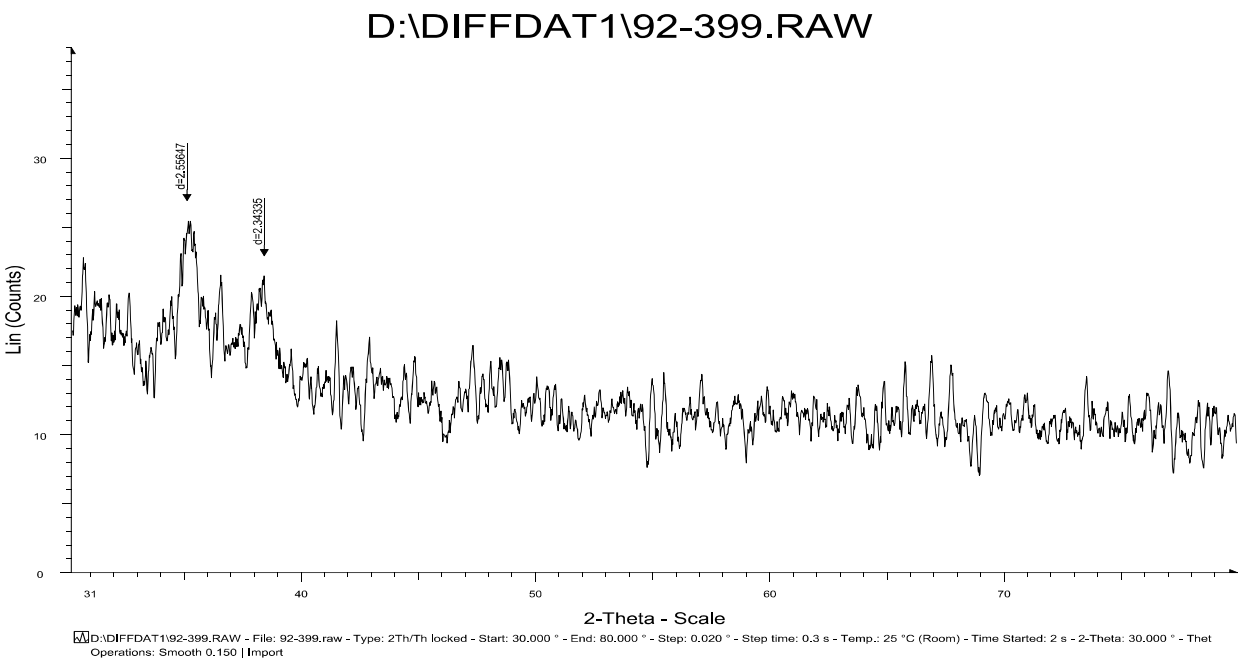
جهت مطالعه مورفولوژی و تخمین اندازه نانوذرات نقره تولیدی از میکروسکوپ الکترونی TEM و SEM ، استفاده شد. که نتایج آنها در اشکال ۱، ۲ و۳ آمده است.



شکل ۱- عکس میکروسکوپی Transmission electron microscopy (TEM) از نانو ذرات نقره.
نقاط سیاه نشان دهنده نانو ذرات نقره می باشد. اندازه نانوذرات نقره کمتر از ۲۰ نانو متر می باشد.



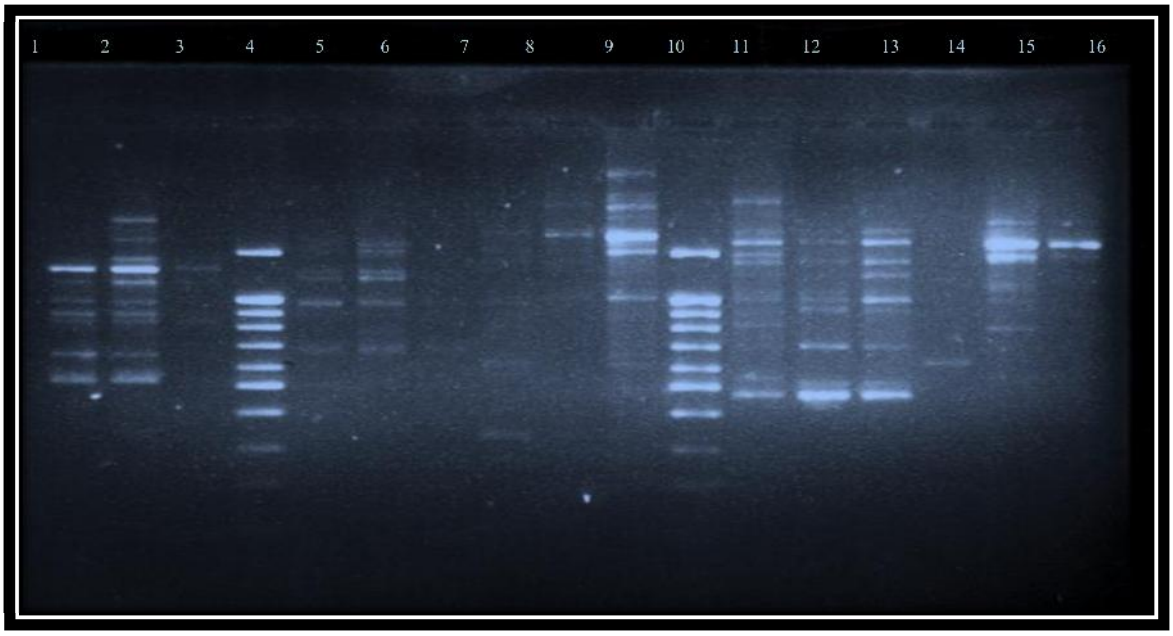
شکل۲- عکس میکروسکوپی Scanning electron microscopy (SEM) که وجود منافذ در نانوذرات را نشان می دهد.



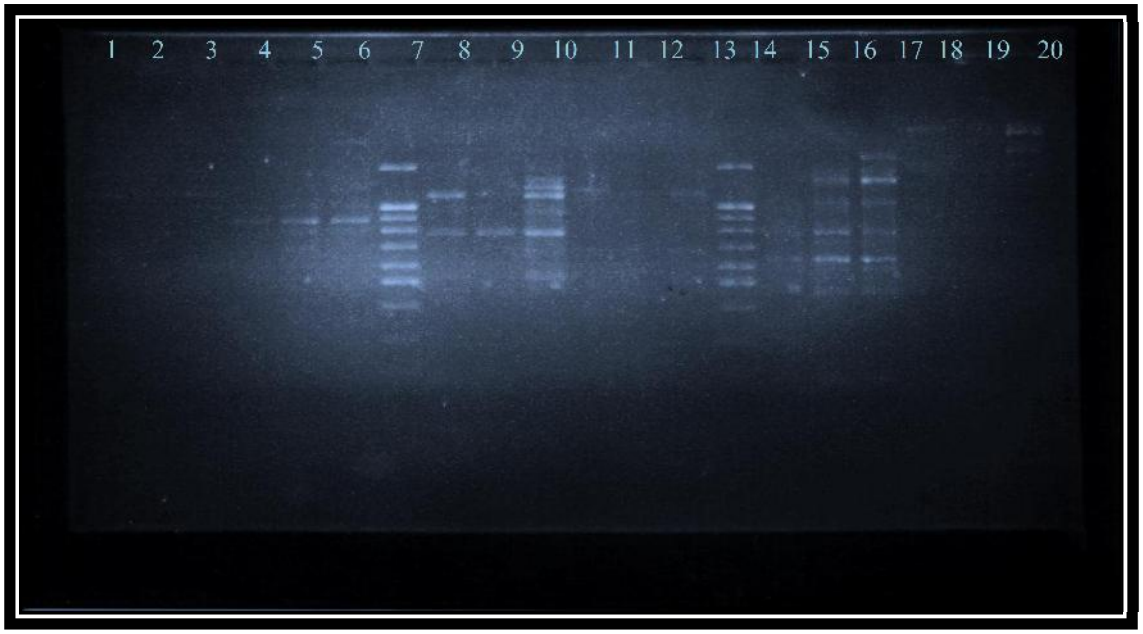
شکل۳: آنالیز XRD

نتایج مربوط به بررسی خاصیت بازدارندگی رشد باکتری‌ها در غلظت و زمان‌های مختلف نانوذرات نقره بر سویه اشریشیاکلی نشان داد که در صورت تیمارباکتری‌ها با غلظت های مختلف نانوذرات نقره بعد از زمان‌های ۱، ۲ و ۲۴ ساعت، تغییرات قابل توجهی بر میزان کاهش باکتری‌های تحت مطالعه در غلظت‌های بیشتر از ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده گردید. بیشترین تاثیر مربوط به زمان ۲۴ ساعت بود. هرچند در زمان‌های ۱ و۲ ساعت نیز خاصیت بازدارندگی رشد باکتری‌ها حدودا در حد ۲۴ ساعت بعد از تیمار بود. نکته جالب توجه در این مطالعه و سایر مطالعات صورت گرفته این است که غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر از نانوذرات نقره، اثر ضد میکروبی بسیار بالایی علیه باکتری اشریشیاکلی دارد و این تحقیق به خوبی نشان می‌دهد که غلظت ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر و غلظت‌های بیشتر از این مقدار مانند باکتری هایی که به مدت ۲ ساعت با غلظت ۹۰ میکروگرم بر میلی لیتر با نانوذرات نقره تیمار شده بودند وپس از ۲ ساعت از آن ها استخراج DNA انجام گرفته بود، در مدت زمان‌های بررسی شده، نشان داد که به خوبی باکتری‌های مذکور را از رشد وتقسیم بازمی دارد.

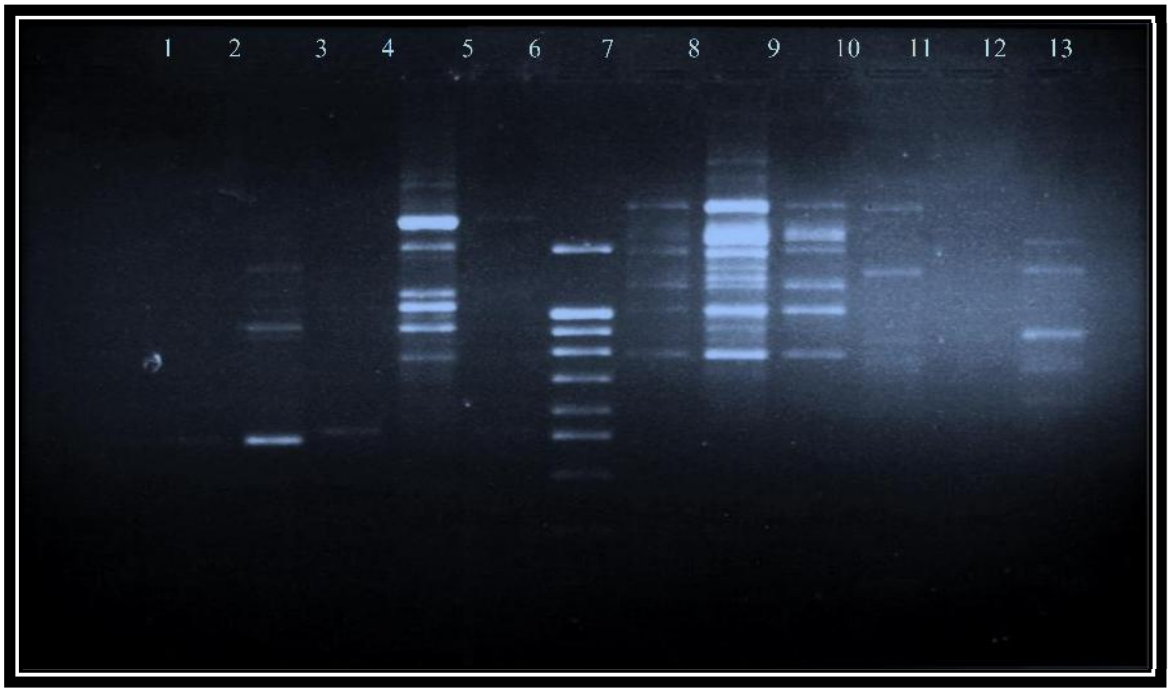
نتایج حاصل از PCR پرایمرهای RAPD بعد از ژل الکتروفورز به منظور بررسی خاصیت اثر مهار رشد باکتری‌ها، نانوذرات نقره در غلظت‌های ۷۵ و۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر باکتری گرم منفی اشریشیاکلی در اشکال شماره ۴و ۵ و۶ ملاحظه می‌گردد. باندهای حاصل از تجزیه RAPD براساس وجود یا عدم وجود آنها در نمونه‌ها، به ترتیب بصورت یک و صفر امتیازدهی گردید که نتایج آنها در جدول ۲ آمده است.



شکل۴: عکس الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز، ستون‌های شماره ۱و۲و۳: پرایمر OPT14; ۱.شاهد ۲.تیماراول ۳.تیماردوم، ستون شماره۴: مارکر، ستون‌های شماره۵و۶و ۷: پرایمرOPB; ۵.شاهد ۶.تیماراول ۷.تیماردوم، ستون‌های شماره ۸ و ۹ و۱۰ : پرایمرOPD; ۸ .شاهد ۹.تیماراول ۱۰.تیماردوم، ستون شماره ۱۱: مارکر، ستون‌های شماره۱۲و۱۳و۱۴:پرایمرOPS11; ۱۲. شاهد ۱۳.تیماراول ۱۴.تیماردوم، ستون‌های شماره۱۵و۱۶و۱۷:پرایمرOPQ17; ۱۵.شاهد ۱۶.تیماراول ۱۷.تیماردوم



شکل ۵: عکس الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز، ستون‌های شماره ۱و۲و۳: پرایمرOPA10; ۱.کنترل ۲.تیماراول ۳.تیماردوم، ستون‌های شماره ۴و۵و۶: پرایمر OPS05; ۴.کنترل ۵.تیماراول ۶.تیماردوم، ستون۷:مارکر، ستون‌های ۸و۹و۱۰:پرایمرOPA11; ۸.کنترل ۹.تیماراول ۱۰.تیماردوم، ستون‌های ۱۱و۱۲و۱۳:پرایمرOPA09 ;۱۱.کنترل ۱۲.تیماراول ۱۳.تیماردوم، ستون۱۴:مارکر bp ۱۰۰، ستون‌های ۱۵و۱۶و۱۷:پرایمرOPR12; ۱۵.کنترل ۱۶.تیماراول ۱۷.تیماردوم، ستون‌های ۱۸و۱۹و۲۰:پرایمرOPC09; ۱۸.کنترل ۱۹.تیماراول ۲۰.تیماردوم



شکل ۶: عکس الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز، ستون‌های شماره ۱و۲و۳:پرایمرOPT17; ۱. کنترل ۲. تیماراول ۳. تیماردوم، ستون‌های شماره ۴و۵ و۶:پرایمرOPD04; ۴.کنترل ۵.تیماراول ۶.تیماردوم، ستون شماره۷ : مارکر، ستون‌های شماره ۸ و ۹ و۱۰ :پرایمرOPR11; ۸.کنترل ۹.تیماراول ۱۰.تیماردوم، ستون‌های شماره۱۱و۱۲و۱۳:پرایمرOPS14; ۱۱.کنترل ۱۲.تیماراول ۱۳.تیماردوم

جدول۲- نتایج باندهی مربوط به پرایمرها

پرایمر	باند (bp)	C	T_1	T_2
OPT14	>1500	0	1	0
	1400	0	1	0
	1300	1	1	1
	1200	0	1	0
	1000	1	1	0
	900	1	1	0
	650	1	1	0
	550	1	1	0
OPB	1500	0	1	0
	1300	1	1	0
	950	1	1	0
	700	1	1	0
OPD	>1500	0	1	0
	1500	0	0	1
	1000	0	0	1
	250	1	0	0
	250	1	0	1
OPS11	>1500	1	1	1
	1500	1	0	0

پرایمر	باند (bp)	C	T_1	T_2
	1400	1	0	1
	1300	0	0	1
	1000	0	0	1
	900	0	1	0
	450	0	1	1
OPQ17	>1500	0	1	0
	1600	0	1	1
	1500	0	1	0
	110	0	1	0
	800	0	1	0
	650	1	0	0
OPA10	1100	1	1	1
	1000	0	0	1
OPS05	>1500	0	0	1
	950	0	1	1
	900	1	1	1
	800	0	1	1
	700	0	1	0
OPA11	1300	0	0	1
	1100	1	0	1
	950	0	0	1
	800	1	1	1
	700	0	0	1
	550	0	0	1
OPA09	1200	1	0	0
	1100	0	0	1
	650	0	0	1
OPR12	1500	0	0	1
	1250	0	1	1
	1000	0	1	1
	800	1	1	1
	650	1	1	1
	450	1	1	1
	200	0	1	1
OPC09	>1500	1	0	1
	1500	0	1	1
OPT17	>1500	0	0	1
	1300	0	0	1
	900	0	0	1
	500	0	1	1
OPD04	>1500	0	1	1
	1500	0	1	0
	1200	0	1	0
	1100	0	1	0

پرایمر	باند (bp)	C	T_1	T_2
	900	0	1	0
	770	0	1	0
	500	1	0	1
	370	0	1	0
OPR11	>1500	1	1	1
	1450	1	1	1
	1300	0	1	0
	1200	1	1	1
	1000	0	1	1
	900	1	1	1
OPS14	1250	1	0	0
	900	0	0	1
	800	0	0	1
	600	0	0	1
	150	1	0	0

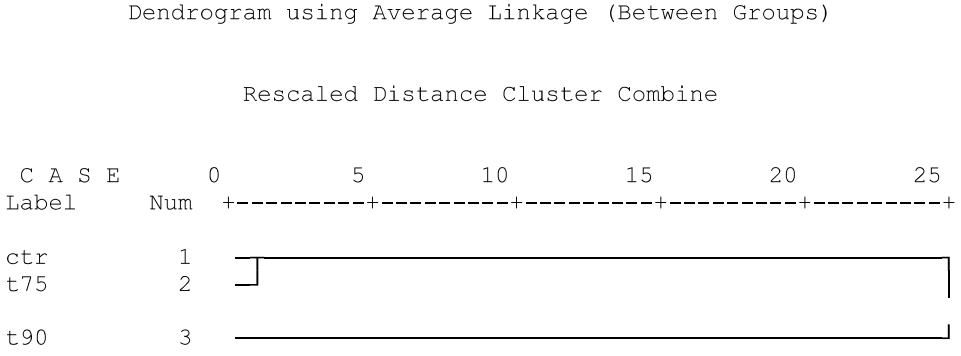
در جدول ۳و شکل شماره ۷، نتایج حاصل از نرم‌افزار NTSYS-PC به منظور مقایسه تنوع ژنتیکی ایجادشده بین نمونه کنترل و نمونه‌های پس از تیمار نشان داده شده است.

جدول۳- ماتریکس تشابه برای نمونه های کنترل و تیمار شده

Proximity Matrix

Case	Dice (Czekanowski or Sorenson) Measure		
	1:ctr	2:t75	3:t90
1:ctr	1.000	.500	.453
2:t75	.500	1.000	.495
3:t90	.453	.495	1.000

This is a similarity matrix



شکل ۷- دندروگرام حاصل از تجزیه بر اساس آزمون رپید

بحث

طی تحقیقی که به منظور بررسی اثر نانوذرات نقره بر روی ژنوم باکتری اشریشیاکلی انجام گرفت، از مجموع ۱۵ پرایمر به کار رفته، فقدان یا وجود باندهای بدست آمده حاکی از آن بود که پرایمرها به توالی های DNA چسبیده و تکثیر یافته اند. هدف از انجام این تحقیق در وهله اول بررسی اثر دوزهای مختلف نانوذرات نقره در زمان‌های متفاوت روی ژنوم باکتری و در مرحله بعد، بررسی تغییرات احتمالی در روند همانندسازی این باکتری بود. نتایج حاصل از این پژوهش، حاکی از فعالیت مهار کنندگی بالای نانوذرات نقره برروی ژنوم باکتری اشریشیاکلی بود که ما در پژوهش حاضر به نتایج قابل قبولی دست یافتیم. در تحقیق مشابهی، فعالیت ضدمیکروبی نقره از طریق بلوکه کردن سیستم انتقال الکترون، تغییر عملکرد غشای باکتریایی و ممانعت از همانندسازی DNA آشکار شده است. تقابل بین یون های نقره با گروه های تیول در آنزیم‌ها و پروتئین‌ها نقش اساسی در فعالیت ضدمیکروبی یون های نقره بازی می‌کنند، اگرچه دیگر ترکیبات سلول‌ها مانند پیوندهای هیدروژنی نیز ممکن است درگیر باشد(۱۳). در همین راستا، درنتیجه‌ی اثر نانوذرات نقره روی ژنوم باکتری‌ها، توالی‌های DNA تغییر یافته بودند، بنابراین پرایمر این توالی ها را شناسایی نکرده و تکثیر نیافتند، از اینرو نتایج پژوهش اخیر ممکن است مبین تاثیر نانوذرات بر روند تغییر توالی ژنومیک باکتری ها باشد واینطور استنباط می شود که نانوذرات نقره علاوه بر اینکه سبب تغییرات گسترده ای در ساختار DNA کروموزومی باکتری که شکستگی هایی در مولکول DNA ایجاد می کنند و از آنجایی که این قطعات به صورت تصادفی ایجاد شده اند در نتیجه بسیاری از این قطعات توسط پرایمرها شناسایی نشده و تکثیر نیافتند. افزون براین، براساس نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر، استنباط می شود که نانوذرات ممکن است سبب اختلال در ژن هایی شوند که سازوکار های رونویسی و همانندسازی را کنترل می کنند. همچنین فعالیت و توالی های بازی پروموترها نیز تحت تاثیر نانوذرات قرار گرفته و خصوصا می تواند بر روی توانایی RNA پلیمراز برای باز کردن مارپیچ و انجام نسخه برداری تاثیر بگذارد. در واقع هر عاملی که به DNA آسیب زند اساسا می تواند سبب مرگ آن موجود زنده شود. در تعدادی از مطالعات صورت گرفته مشخص شده است که نانوذرات نقره به غشای سلولی باکتری ها متصل شده و همچنین به داخل سلول باکتری نفوذ می‌کنند. غشای باکتری دارای پروتئین‌های حاوی گروه سولفور می‌باشد و نانوذرات نقره نه تنها با این پروتئین‌ها، بلکه با ترکیبات حاوی فسفر از جمله DNA ،واکنش می‌دهند(۱۴).

همچنین باتوجه به نتایج حاصل از نرم‌افزار NTSYS-PC، اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های کنترل و تیمار مشاهده شد که در واقع باکتری ها به دو سوش مجزا تفکیک شدند. همانطور که از دندروگرام مشخص است، نمونه‌های کنترل و تیمار با قرار گرفتن در دسته‌های جداگانه، فاصله ژنتیکی زیادی نشان می دهند که این موضوع با مقایسه نتایج ماتریکس تشابه نیز مطابقت دارد. براساس داده‌های RAPD، فاصله ژنتیکی بین نمونه‌ها از ۱.۰۰۰ تا ۰.۴۵۳ متغیر بوده که هر چه اعداد به ۱ نزدیک تر، شباهت ژنتیکی بین نمونه ها بیشتر شده است.

نتیجه‌گیری

از نتایج این مطالعه اینطور استنباط می شود که رابطه مستقیمی بین غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره و گذشت زمان، روی ژنوم باکتری وجود دارد. از طرفی تنوع ژنتیکی حاصل بین باکتری های کنترل و باکتری های تیمار، اثر نانوذرات نقره روی باکتری اشریشیاکلی به اثبات می رسد. بدین ترتیب با مشاهده نتایج حاصل از آزمایشات این مطالعه و مطالعاتی که Chaloupka و همکارانش(۱۵) در سال ۲۰۱۰ ثابت کردند نانوذرات نقره به دلیل عملکرد چند گانه ضدمیکروبی، یکی از موثرترین نانوذرات فلزی واجد خاصیت ضدمیکروبی می‌باشند (۱۴)، خاصیت آنتی بیوتیکی نانوذرات نقره به اثبات می‌رسد و می‌توان نانونقره را جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌ها به حساب آورد. در مطالعه ای دیگر نیز نانوذرات نقره توانایی رونویسی باکتری را از بین می برد(۱۶)، که نتایج مطالعه ما نیز نشان دهنده همین مطلب است.

References

1- Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH.(2001). In Vitro Susceptibility Testing Methods for Caspofungin Against Aspergillus and Fusarium Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 45(1):327-330. doi: 10.1128/AAC.45.1.327-330.2001

2- Arikan S, Rex JH.(2000). New Agents for Treatment of Systemic Fungal Infections. Expert Opinion Emerging Drugs; 5(2):135-160. doi:10.1517/14728214.5.2.135

3- Tolaymat TM, Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG.(2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in and applications, Sci Total Environ; 408, 99. doi: 10.1016/j.scitotenv

4- Rafie M, Mohamed A, Shaheen TI, Hebeish A.(2010). Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics. Carbohydrate Polymers; 80: 779–782.2010. doi:10.1016/j.carbpol.2009.12.028

5- Luis M, Liz-Marzán and V Prashant. Nanoscale Materials, Kluwer, New York, 2004.

6- Khaydarov RR, Khaydarov RA, Gapurova O, Estrin Y, Evgrafova S, Scheper T, Cho SY.(2009). Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles Synthesized By an Electrochemical Method. Nanostructured Materials for Advanced Technological Applications, 215, Springer. doi: 10.1109/ICONN.2008.4639241

7- Ayala-Núñez NildaVanesa ,Humberto H. Lara Villegas , Liliana del Carmen Ixtepan Turrent, Cristina Rodríguez Padilla. (2009). Silver Nanoparticles Toxicity and Bactericidal Effect Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aurous. Nanoscale Does Matter, Nanobiotechno. Doi: 10.1007/s12030-009-9029-1.

8- Petica S, Gavriliu M, Lungu N, Buruntea C.(2008). Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. Materials Science and Engineering B 152, 22–27. doi: 10.1016/j.mseb.2008.06.021

9- Yamanaka M.(2005). Bactericidal Actions of a Silver Ion Solutionon Escherichia coli. Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis Appl Environ Microbiol, 71:7589–7593. doi: 10.1128/AEM.71.11.7589-7593.

10- [10] Karla C, Yogeshkumar M, Alexander M. S.(2010). Nano silver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. Trands in Biotecnology; 28: 580-588. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.07.006

11- Shrivastava S. (2007). Characterization of Enhanced Antibacterial Effects of Novel Silver Nanoparticles. Nanotechnology, 18: 225103–225112. doi:10.1088/0957-4484/18/22/225103

12- Yang WJ.(2009). Food Storage Material Silver Nanoparticles Interfere with DNA Replication Fidelity and Bind with DNA. Nanotechnology, 20: 085-102. doi: 10.1088/0957-4484/20/8/085102

13- Sondi, I. & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model from Gram-negative bacteria. J. Colloid Interface Sci., 275, 177-182. doi: 10.1016/j.jcis.2004.02.012

14- Panacek A, Kvítek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizúrova N, Sharma VK, Nevecna T, Zboril R.(2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. J Phys Chem B. 110:16248–16253.doi: 10.1021/jp063826h

15- Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM.(2010). Nanosilver as a new generation of nanoproduct in biomedical applications. Trend Biotechnol, 28:580-8. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.07.006.

16- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Jeong DH, Cho MH.(2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomed Nanotechnol Biol Med 3, 95–101. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.