مقاله تحقیقی

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات اکسید کادمیوم روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا*

بهار صالحی*، مهدی احمدی*

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران

***مسؤول مکاتبات:** بهار صالحی و مهدی احمدی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران، پست الکترونیکی: bahar.salehi007@gmail.com و m.ahmadi1981@gmail.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

تاریخ دریافت: ۹۳/۵/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۵

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۴

چکیده

عوامل ضد باکتریایی غیرآلی دارای مقاومت باکتریایی و ثبات دمایی بسیار بالایی هستند. نانومواد غیرآلی که دارای ساختار بسیار جدید، خواص بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی می‌باشند، با عملکردی که حاصل از اندازه نانویی آنهاست، ساخته شده‌اند و بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این تحقیق اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسید کادمیوم روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا مورد مطالعه قرار گرفت. غلظت‌های مختلف ۱۰µg/ml، ۱۵µg/ml و ۲۰µg/ml نانوذرات اکسید کادمیوم تهیه و اثر آنها در محیط های کشت جامد و مایع در برابر باکتری‌های مورد نظر بررسی شد. نتایج نشان داد که بین اثر مهارکنندگی و مقدار دوز مصرفی نانوذرات رابطه مستقیم وجود دارد ضمناً مشاهده شد که خواص آنتی باکتریایی نانوذرات اکسیدکادمیوم روی فعالیت و تکثیر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با باکتری سودوموناس آئروژینوزا موثرتر است. این تحقیق نشان داد، اثر ضدباکتریایی نانوذرات اکسیدکادمیوم بر باکتری گرم مثبت قویتر از باکتری گرم منفی است و تاثیرات آنتی باکتریایی نانوذرات cdo روی هر دو باکتری است. البته با کتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با سودوموناس آئروژینوزا به این نانوذرات حساس تر است.

واژه های کلیدی: اثر ضدباکتریایی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، عوامل محیطی، نانوذرات اکسیدکادمیوم

مقدمه

نانوذرات به دلیل خصوصیاتی مانند سایز بسیار کوچک آن و نسبت سطح به جرم زیادش علاوه بر

مزایایی که در صنایع دارد، انسان‌ها را در معرض خطرات جدید و رو به رشد قرار می‌دهد و افزایش مشکلات بهداشتی به خصوص برای کارگران دارد و باعث تولید کارآمد مواد و دستگاه‌ها و سیستم‌ها با کنترل ماده در مقیاس طولی نانومتر و بهره‌برداری از خواص و پدیده‌های نوظهور که در مقیاس نانو توسعه یافته‌اند، شده است (۳-۱). استافیلوکوکوس اورئوس آنزیم‌ها و توکسین‌های متعددی تولید می-کند که باعث بقای باکتری، تجزیه پروتئین ها، کربوهیدرات ها و چربی‌ها جهت تأمین مواد مورد نیاز، مقاومت در برابر داروها و قدرت بیماری زایی باکتری می‌گردند. آنتروتوکسین های این میکروب توسط سلول های باکتری به غذا یا محیط کشت انتشار پیدا می‌کنند (۴). نانوذرات به دلیل دارا بودن خاصیت ضدمیکروبی و همچنین داشتن سمیت پایین برای سلول های بدن انسان، بسیار مورد توجه قرار گرفته اند و نیز خاصیت ضدمیکروبی آنها برای محدوده وسیعی از میکروارگانیسم‌ها ثابت شده است. سودوموناس آئروژینوزا می تواند عفونت ادراری، عفونت دستگاه تنفسی، عفونت پوستی، عفونت بافت های نرم، باکتریمی، انواع عفونت های سیستمیک، خصوصا در بیماران دچار سوختگی های شدید، سرطان و ایدز که دارای نقص ایمنی هستند، ایجاد نماید. سودوموناس آئروژینوزا به طور ذاتی به بسیاری از آنتی‌بیوتیک ها مقاوم است و به همین دلیل باکتری مقاومی شناخته شده است . نفوذ آنتی بیوتیک ها به درون سودوموناس از طریق منافذ دیواره خارجی باکتری صورت می گیرد (۵). انتظار می‌رود که نانومواد‌ی که با روش‌های متفاوت سنتز می‌شوند اثرات آنتی باکتریال متفاوتی داشته باشند. لذا بررسی اثر ضد باکتریایی آن نیازی مبرم می‌باشد.

مواد وروش‌ها

باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد و با استفاده از روش‌های رایج میکروبیولوژی مورد تایید قرار گرفت. محیط‌های کشت نوترینت براث (NB)، مایع و نوترینت آگار (جامد) به صورت وارداتی و از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. در آزمایش حساسیت استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا به نانوذرات اکسید کادمیوم برای تخمین صحیح و تائید نتایج، دو روش برآورد متفاوت مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی و روش آنالیز نانو ذرات اکسیدکادمیوم

در این تحقیق برای تهیه نانوذرات اکسید کادمیوم، در یک آزمایش نمونه محلول اول با ۰/۰۶ مولار اسید استیک و ۰/۰۳ مولار سولفات کادمیوم با استفاده از ۴۰ میلی‌گرم استیل تری متیل آمونیوم بروماید به عنوان سورفکتانت در یک لیتر آب دو بار تقطیر تهیه شد. محلول دوم با ۰/۹ مولار دانه های سود و ۲۵ میلی لیتر اتانول ٪۷۰ در یک لیتر آب مقطر دوبار تقطیر تهیه شد. بعد از مخلوط کردن محلول اول و دوم رسوب به دست آمده با استفاده از کاغذ فیلتر واتمن فیلتر شد، سپس در ۸۰°C در کوره هوای داغ حدود یک ساعت خشک شد. سپس با انتقال به بوته سیلیسی در ۴۰۰ درجه سانتیگراد حدود ۲ ساعت سوزانده شد. پودر بدست آمده برای از بین بردن ناخالصی‌های موجود ۴ - ۳ بار با اتانول شستشو داده شد. مطالعات مورفولوژی و بررسی سطوح نانوذرات اکسید کادمیوم سنتز شده با استفاده از دستگاه طیف سنج مرئی-فرابنفش دوپرتویی مدل TU-1901، دستگاه پراش اشعه ایکس مدل D/Max-RA با تابش اشعه

CuKα و میکروسکوپ الکترونی گذاره مدل JEM-200CX انجام شد.

کشت باکتری و بررسی اثر نانوذرات اکسید کادمیوم در محیط کشت جامد

سواپ استریل را در محیط‌های مایع (NB) کشت باکتری فرو برده و به باکتری آغشته شد. سپس در پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد، کشت داده شد تا سطح پلیت کاملاً آغشته به باکتری شود. آنگاه محلول‌های نانو ذرات مذکور را که با غلظت میانگین و ثابت ۱۵µg/ml به منظور استاندارد سازی از بین سه غلظت ۱۰µg/ml، ۱۵µg/ml و ۲۰µg/ml تهیه شده، انتخاب کرده و در سه چاهک هریک از غلظت ها به طور جداگانه و مشخص ریخته شد. در چاهک وسط محلول شاهد که در اینجا آب مقطر است، ریخته شد. سپس پلیت‌ها در دستگاه انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. بعد از آن برای تعیین اثر نانوذرات، کلنی‌های باکتری‌ها شمارش شدند.

آماده سازی محیط TSB (Trypticase™ Soy Broth)، کشت باکتری و بررسی اثر نانوذرات اکسید کادمیوم در محیط کشت مایع

باکتری ها در چهار لوله جداگانه کشت داده شدند. از هر دسته چهارتایی یک لوله به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. آنگاه باکتری در سه لوله باقیمانده، هر سه غلظت مختلف از نانوذرات اکسیدکادمیوم را اضافه کردیم و درب ظروف حاوی محیط کشت‌های تیمار (باکتری + نانوذرات اکسیدکادمیوم) و محیط کشت کنترل با پنبه بسته شد و به صورت هوازی شیکر شد. در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از آن از چگالی نوری (OD) در طول موج ۶۰۰nm برای اندازه‌گیری غلظت باکتری ها استفاده شد.

آنالیز داده‌ها

نتایجی که در تمام تست ها بدست آمد با گروه کنترل مقایسه شد. نرم افزار spss و آزمونDunnett برای تعیین سطح معنی داری ($p<0.05$) نتایج آزمایشات و ارزیابی آنها استفاده شد.

نتایج

طیف های جذبی UV-vis نانو ذرات اکسیدکادمیوم

این طیف سنجی مربوط به انتقالات بین ترازهای الکترونی است. چنین انتقالاتی عموماً بین اوربیتال پیوندی یا جفت الکترون های غیر پیوندی با اوربیتال ضد پیوندی انجام می شود. در نتیجه طول موج قله های جذب را می‌توان با انواع پیوندهایی که در گونه مورد مطالعه وجود دارند، ارتباط داد. طیف های جذبی مرئی- فرابنفش نانوذرات اکسید کادمیوم در تصویر ۱ نشان داده شده است. اگرچه طول موج طیف سنج با منبع نور محدود می‌شود، اما باند جذبی نانو ذرات یک تغییر مکان رنگ آبی را نشان می دهند که ناشی از مقدار محدودیت حاضر در نمونه در مقایسه با توده ذرات اکسید کادمیوم است. این پدیده نوری نمایان می سازد که این نانو ذرات میزان تاثیر کوانتوم را نشان می دهند. تشکیل نانو ذرات به سورفکتانت و حلال آلی بستگی دارد، چون سورفکتانت ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) به چسباندن سطح نانوذرات سنتز شده کمک می کند. بنابراین در اثر این عمل، تثبیت کننده ذرات و میزان تشکیل شدن یا رشد هسته ذرات برای دستیابی به درجه بالایی از یکنواختی صورت می گیرد. اسید استیک و حلال

اتانول به پراکندن ذرات به صورت یکنواخت و به رشد آهسته ذرات در سایز محدود و جلوگیری از اجتماع ذرات کمک می کند.

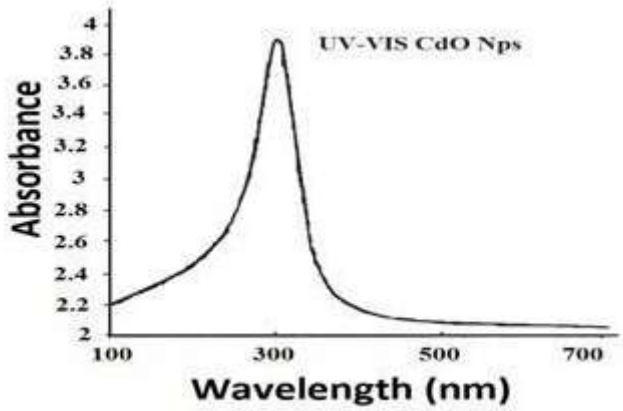
بررسی میکروسکوپ الکترونی

در تصویر ۲ نانوذرات اکسید کادمیوم سنتز شده قابل مشاهده است. این تصویر به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره و با بزرگنمایی ۱۳۰۰۰ برابر گرفته شده است و نشان دهنده این است که قطر نانوذرات سنتزی در حدود ۳۰nm می باشد.

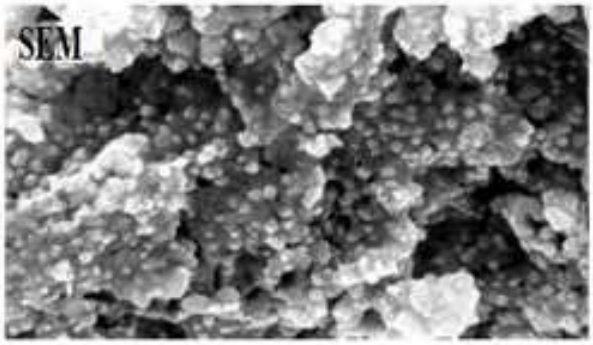
بررسی اثر مهار کنندگی نانوذرات اکسید کادمیوم روی باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت مایع

در بررسی اثر نانوذرات اکسید کادمیوم روی باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت مایع مشخص شد که غلظت ۲۰µg/ml نانوذرات اکسید کادمیوم بیشترین اثر مهار کنندگی را روی این باکتری داشته، همچنین اثر مهارکنندگی نانوذرات اکسیدکادمیوم روی باکتری استافیلوکوک اورئوس نسبت به باکتری سودوموناس آئروژینوزا بیشتر بوده است، زیرا جذب نوری در این باکتری در مقایسه با گروه کنترل بیشتر کاهش یافته است. برای تحلیل و بررسی دقیق تر، نمودار مقایسه ای ۱ و نیز جدول ۱ ارائه شده است.

در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات اکسید کادمیوم روی تعداد باکتری استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد. همان-طور که در نمودار ۲ مشخص است، بیشترین اثر مهارکنندگی در غلظت‌های بالاتر نانوذرات رخ داده و گروه کنترل (مقدار 0mg/kg) گروهی است که نانوذره دریافت نکرده و بالاترین رشد را داشته است.



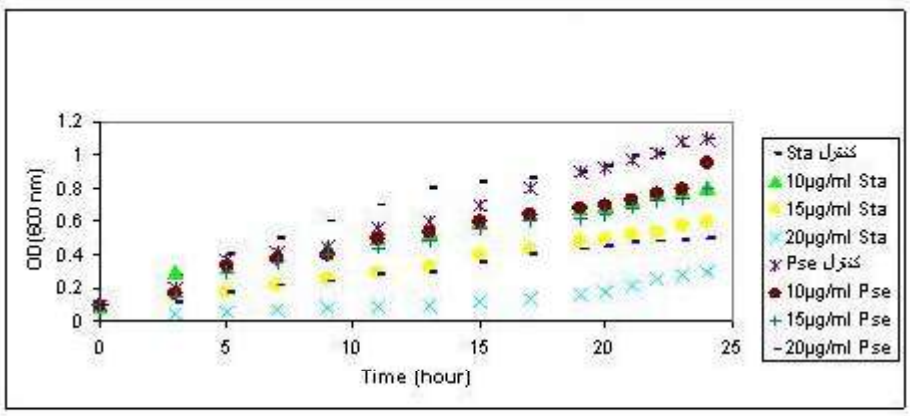
تصویر ۱: طیف جذبی UV برای نانو ذرات CdO .



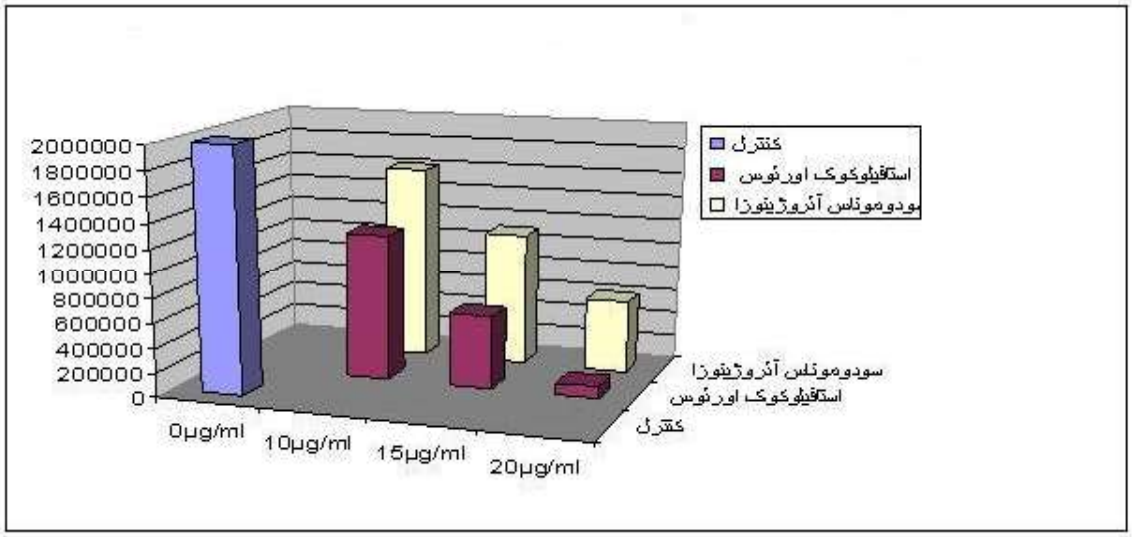
تصویر ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانوذرات اکسید کادمیوم سنتز شده با بزرگنمایی ۱۳۰۰۰ برابر.

جدول ۱: مقایسه مقادیر *OD* اثر غلظت های مختلف نانوذرات اکسید کادمیوم روی باکتری های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا.

time	Control sta	10µg/ml sta	15µg/ml sta	20µg/ml sta	Control pse	10µg/ml pse	15µg/ml pse	20µg/ml pse
0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
3	0.27	0.3	0.15	0.05	0.2	0.17	0.15	0.11
5	0.4	0.33	0.18	0.06	0.37	0.34	0.3	0.18
7	0.5	0.4	0.22	0.07	0.42	0.38	0.35	0.22
9	0.6	0.44	0.26	0.08	0.45	0.4	0.4	0.24
11	0.7	0.5	0.3	0.09	0.56	0.5	0.44	0.28
13	0.8	0.54	0.33	0.1	0.6	0.54	0.48	0.3
15	0.83	0.6	0.4	0.12	0.7	0.6	0.55	0.35
17	0.86	0.64	0.43	0.14	0.8	0.64	0.6	0.4
19	0.9	0.68	0.48	0.16	0.9	0.68	0.62	0.43
20	0.94	0.7	0.5	0.18	0.92	0.7	0.64	0.45
21	0.99	0.73	0.52	0.22	0.97	0.73	0.68	0.47
22	1.01	0.77	0.54	0.26	1.01	0.77	0.72	0.48
23	1.05	0.79	0.58	0.28	1.08	0.79	0.74	0.49
24	1.1	0.8	0.6	0.3	1.1	0.95	0.8	0.5



نمودار ۱ – مقایسه اثر غلظت های مختلف نانوذرات اکسید کادمیوم روی باکتری های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا.

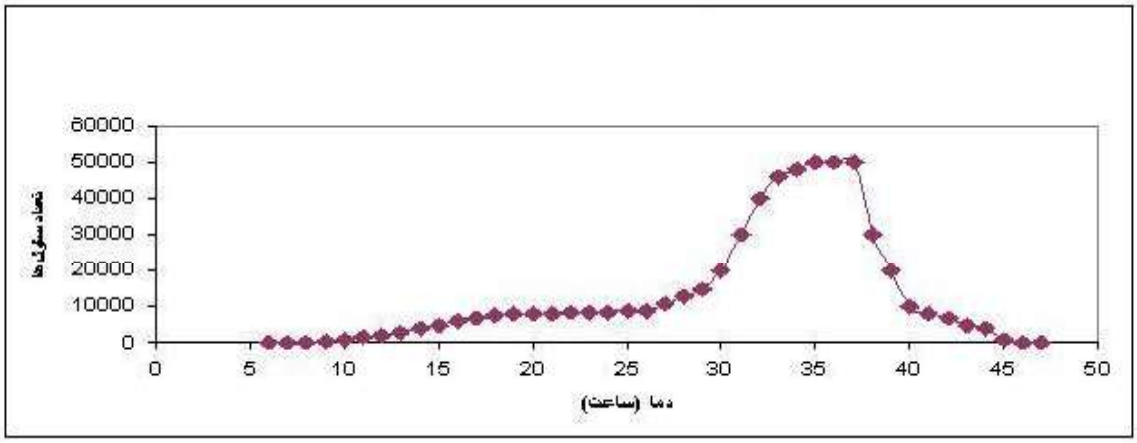


نمودار ۲ - مقایسه اثر غلظت های مختلف نانوذرات اکسید کادمیوم روی تعداد سلول های باکتریایی استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا.

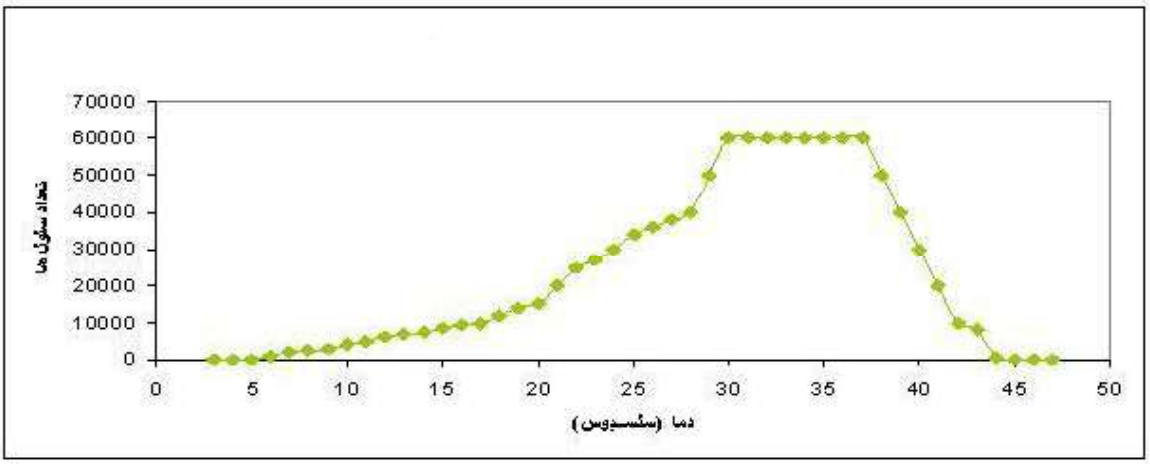
در باکتری استافیلوکوک اورئوس تعداد سلول با غلظت مصرفی نانوذره رابطه مستقیم دارد و از خروجی ضریب رگرسیون به این نتیجه می رسیم که این رابطه منفی است، یعنی هر قدر غلظت بالا رود تعداد سلول کم می شود و مقدار p کمتر از ۰/۰۵ است و نشان دهنده معنی داری این رابطه است. در باکتری سودوموناس آئروژینوزا تعداد سلول با غلظت مصرفی نانوذره رابطه مستقیم دارد و از خروجی ضریب رگرسیون به این نتیجه می رسیم که این رابطه منفی است یعنی هر قدر غلظت بالا رود تعداد سلول کم می شود ولی مقدار p کمتر از ۰/۰۵ است و نشان دهنده معنی داری این رابطه است.

بررسی اثر دما روی باکتری های استافیلوکوک اورئوس در محیط کشت مایع

دمای اپتیمم برای رشد باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس بین 35^oC و 37^oC و برای باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا بین 30^oC و37^oC می باشد. نتایج بدست آمده با فیزیولوژی این باکتری همخوانی دارد. نمودار ۳ و ۴ نتایج اثر دما برای باکتری مذکور را در حضور نانوذره اکسید کادمیوم نشان می دهد. این نتایج نیز همگرا با فیزیولوژی ذاتی این باکتری در مقابل دما است. اما همانطور که مشخص است به علت اثر دوتایی (Double effect) نانوذره و تغییرات دما، کاهش چشمگیری در تعداد سلول های این باکتری به وجود آمده است.



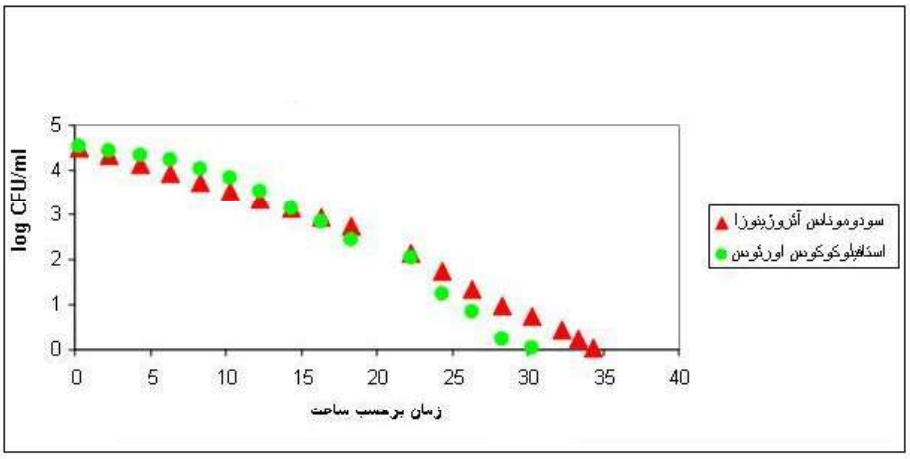
نمودار ۳ - اثر دما روی باکتری های استافیلوکوک اورئوس در حضور نانوذرات اکسید کادمیوم.



نمودار ۴ - اثر دما روی باکتری های سودوموناس آئروژینوزا در حضور نانوذرات اکسید کادمیوم.

بهینه سازی اثر ضد باکتریایی نانوذرات اکسید کادمیوم در زمان های مختلف

در مطالعه نهایی، سلول‌های زنده باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا در مقابل ماکزیمم غلظت (۲۰µg/ml) از نانوذرات اکسید کادمیوم در آب ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. نتایج نشان می دهد که در گروه کنترل، کاهش غلظت‌های سوسپانسیون استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا از 6.3 log CFU/ml به غلظت های غیر قابل بررسی بعد از ۱۴ روز می رسد. اما با اضافه کردن نانوذرات به محیط های کشت این باکتری‌ها میزان زیست‌پذیری باکتری ها از ۱۴ روز به کمتر از ۲ روز کاهش می-یابد. همانطور که در نمودار ۵ مشخص است باکتری استافیلوکوک اورئوس نسبت به نانوذرات اکسید کادمیوم حساس‌تر بوده و فعالیت آن نسبت به باکتری سودوموناس آئروژینوزا بیشتر کاهش یافته است.



نمودار ۵ - مقایسه اثر غلظت ماکزیمم (۲۰µg/ml) نانوذرات اکسید کادمیوم روی سلول های زیست پذیر استافیلوکوک اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا.

در استافیلوکوک با بالارفتن غلظت و زمان، *OD* کاهش می‌یابد و در آزمون *Dunnett* رابطه معنی داری بین *OD* با زمان و با غلظت مصرفی نانو ذرات وجود دارد. ضمنا در آنالیز واریانس دو طرفه، فرض یکسان بودن مقدار *OD* در زمان های مختلف و غلظت های مختلف رد می شود چون $P<0.05$ است. در سودوموناس آئروژینوزا نیز با بالارفتن غلظت و زمان، *OD* کاهش می یابد ولی رابطه معنی داری بین *OD* با زمان و با غلظت مصرفی نانو ذرات وجود ندارد. همچنین در آنالیز واریانس دو طرفه فرض یکسان بودن مقدار *OD* در زمان های مختلف و غلظت‌های مختلف رد نمی-شود، چون $P>0.05$ است.

بحث

نانومواد در پزشکی کاربرد زیادی دارند. آنتی بیوتیک‌ها تنها تعداد بسیار کمی از عوامل بیماری زا را از بین می برند، در حالیکه نانوذرات حدود ۶۵۰ نوع از عوامل بیماری زا را از بین می برند (۳،۴،۵). در این تحقیق از دو باکتری که مقاوم به آنتی-بیوتیک هستند، استفاده شد. نانوذرات اکسیدکادمیوم در غلظت ۲۰µg/ml اثر ضدباکتریایی نشان داد، بنابراین می توان از آن برای از بین بردن باکتری های مقاوم استفاده کرد. در پژوهشی که به وسیله Buzby و همکاران انجام شد، خواص آنتی- باکتریال نانوذرات نقره بررسی شد. نانوذرات با اندازه ۱۵-۱۰ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت و نشان داده شد که افزایش اثر نانوذرات وابسته به مقادیر مصرفی می باشد (۹). در این مطالعه نیز مشاهده شد با افزایش تعداد نانوذرات اکسیدکادمیوم، خاصیت ضدمیکروبی افزایش و سرعت رشد باکتری کاهش می یابد. در تحقیق دیگری که توسط Sundrarajan انجام شد به بررسی خواص آنتی باکتریایی نانوذرات اکسید منیزیم بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوک اورئوس و باکتری گرم منفی اشرشیاکلی پرداخته شد و نشان دادند که قطر هاله عدم رشد برای باکتری گرم مثبت بزرگتر از باکتری گرم منفی بوده است (۱۰). همچنین در تحقیق حاضر اثر ضدمیکروبی نانوذرات اکسیدکادمیوم بر باکتری گرم مثبت قویتر است. در تحقیقی دیگر به بررسی خواص آنتی باکتریال نانوذرات اکسید سریم (CeO_2) روی باکتری استافیلوکوک اورئوس پرداختند. اندازه نانوذرات مورد استفاده ۳۷/۶ نانومتر بود و نتایج نشان داد که خواص آنتی باکتریال نانوذرات اکسید سریم وابسته به مقادیر مصرفی بوده و توانایی

مهارکنندگی این نانوذرات، خواص آنتی باکتریال نانوذرات را اثبات نمود (۱۱). در سال ۲۰۰۹ Ayala و همکاران توانستند باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را با استفاده از نانو ذرات نقره مهار نمایند. آنها با استفاده از روش انتشار چاهکی در آگار اثر ضد باکتریایی نانوذره نقره را ثابت کردند، سپس با روش ماکرودیلوشن توانستند حداقل غلظت ممانعت کننده رشد یا همان را برای آن تعیین نمایند (۱۲). در پژوهشی Rafie و همکاران در مصر توانستند باکتری‌های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس را با استفاده از نانو نقره در محصول پنبه کنترل نمایند (۱۳).barzegari و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثر نانوذرات اکسیدتیتانیوم را روی استافیلوکوکوس بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این نانوذره اثر آنتی باکتریال خوبی روی این باکتری گرم مثبت دارد (۱۴)، که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. آزمایش هایی مبنی بر بررسی سمیت نانوذرات CrO روی باکتری های گرم مثبت سلول های ایمنی انسانی و باکتری های گرم منفی مثل شیگلا انجام شده است. نتایج حاکی از طبیعت سمی نانوذره CrO برای سیستم های میکروبی مختلف و لنفوسیت های T انسانی است (۱۵). در سال ۲۰۱۱ محققان اثر نانوذرات $CoFe_2O_4$ و CrO را روی باکتری استافیلوکوکوس بررسی کردند. نتایج نشان داد که CrO در مقایسه با $CoFe_2O_4$ از قدرت باکتری‌کشی بالاتری برای مقابله با استافیلوکوکوس اورئوس برخوردار است. در کل هر دو نانوذره دارای خاصیت آنتی باکتریال است ولی اکسید کروم عملکرد بهتری دارد (۱۶) که با مطالعه حاضر همخوانی دارد.

در نتیجه، در تحقیق حاضر با افزایش غلظت نانوذرات اکسیدکادمیوم، خاصیت ضد میکروبی افزایش و سرعت رشد باکتری کاهش می‌یابد که با سایر تحقیقات پیرامون بررسی اثرنانوذرات بر میکروارگانیسم‌ها نیز همسویی دارد. می‌توان اینطور تفسیر کرد که در حضور نانوذرات، تخریب سلولی با سرعت بیشتری انجام می‌گیرد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از سرکار خانم دکتر صدیقه مهرابیان و سایر عزیزانی که ما را در انجام این تحقیق یاری فرمودند.

منابع مورد استفاده

1. Hussain, N., Jani., P.U., Florence, A.T., 1997. Enhanced oral uptake of tomato lectin-conjugated nanoparticles in the rat. Pharm Res 14(5): 613-618.
2. Kajander, E. O., Çiftçioglu. N., 1998. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. Proc Natl Acad Sci 95(14): 8274-8279.
3. Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environmental Health Perspectives 113(7): 823-839.
4. Hernandez-Sierra, J., Ruiz, F., Pena, D., Martinez-Gutierrez, F., Martinez, A. E., Guillen, A. J., Tapia-Perez, H., Castanon, G. M., 2008. The antimicrobial sensitivity of Streptococcus mutants to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 4(3): 237-240.
5. Rai, M., Yadav, A., Gade, A., 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnol Adv 27(1): 76-83.
6. Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffeis, T. G., 2009. NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials 30(23): 3891-3914.
7. Jeng, H. A., Swanson, J., 2006. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. Journal of Environmental Science and Health Part A 41(12): 2699-2711.
8. Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H.,

Ziesenis, A., Heinzmann, U., 2001. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. Environ Health Perspect 109(4): 547-551.

9. Buzby, J. C., and Roberts, T., 1997. Economic and trade impacts of microbial foodborne illness. World Health Statistical Quarterly 50(1-2): 57-66.
10. Sundrarajan, M., Suresh, J., Rajiv Gandhi, R., 2012. A comparative study on antibacterial properties of MgO nanoparticles prepared under different calcination temperature. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures 7(3): 983 – 989.
11. Negahdary, M., Mohseni, G., Fazilati, M., Parsania, S., Rahimi, G., Rad, S., Rezaei Zarchi, S., 2012. The Antibacterial effect of cerium oxide nanoparticles on Staphylococcus aureus bacteria. Annals of Biological Research 3(7): 3671-3678.
12. Ayala-Núñez, N.V., Lara Villegas, H. H., del Carmen Ixtepan Turrent. L., Rodríguez Padilla, C., 2009. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant staphylococcus aureus: Nanoscale does matter. Nanobiotechnology 5(1):2-9.
13. Rafie, M., Mohamed. A. A., Shaheen, A., Hebeish, A., 2010. Antimicrobial effects of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics. Carbohydrate Polymeris 80(3): 779-782.
14. Barzegar, F., Javed, A., Rezaei, S., 2010. Antimicrobial activities of Ti2O nanoparticles against Escherichia coli and staphyloccus aureus. Journal of shaheed Sadoghi University of Medical Sciences & Health Services 18(1): 39-46.
15. Ghosh, S. K., Pal, T., 2007. Interparticle coupling effect on the surface plasmon resonance of cobalt nanoparticles: From theory to applications. Chem Rev 107(11):4797-4862.
16. Imani, S., Zagari, Z., Rezaei-Zarchi, S., Zand, A. M., Dorodiyan, M., Bariabarghoyi, H., Lotfi, F., 2011. Antibacterial effect of CrO and CoFe2O4 nanoparticles upon Staphylococcus aureus. Journal of Fasa University of Medical Sciences 1(3): 175-181.