



Effect of particle size on the antimicrobial power of zinc oxide micro- and nano- particles in the powder form

Susan Sohrabi ¹, Mohammad Kargar ², Amin Ramezani ³, Elham Moazamian ⁴, Alireza Ebrahiminezhad ⁵

¹ PhD Candidate, Department of Microbiology, Shi.C., Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

² Professor, Department of Microbiology, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran.

³ Associate Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

⁴ Assistance Professor, Department of Microbiology, Shi.C., Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

⁵ Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Zinc oxide nanopowder has wide application as an antimicrobial compound in various industries. In previous studies, antimicrobial effect of these particles in colloidal state was investigated. Considering different behavior of particles in powder and colloidal state, this study was conducted with the aim of investigating the effect of zinc oxide particle size on their antimicrobial power in powder state.

Materials and methods: This study was conducted in laboratory conditions after the preparation of zinc oxide microparticles and nanoparticles by precipitation method. The appearance, surface and size characteristics of the particles were examined by electron imaging. Elemental analysis of the particles was performed by energy dispersive X-ray spectroscopy. The antimicrobial power of the particles powder was examined by agar diffusion method.

Results: The synthesized particles had an average size of $1.586 \pm 0.415 \mu\text{m}$ and $142 \pm 28 \text{ nm}$. The commercial nanoparticles used also had an average size of 50 nm. Elemental analysis confirmed the presence of zinc and oxygen, which are characteristic of zinc oxide. Zinc oxide microparticles and nanoparticles in powder form did not show a significant difference in antimicrobial potency.

Conclusion: The antimicrobial activity of zinc oxide particles in powder form does not follow the laws governing colloids. Therefore, the size of zinc oxide particles does not have a significant effect on the antimicrobial power of these particles in powder form. Therefore, zinc oxide microparticles can be substituted for nanoparticles in commercial formulations.

Key words: Nanopowder; Nanostructures; Zinc Oxide; Energy-dispersive X-ray spectroscopy.

Received: 27 November 2024

Revised: 4 January 2025

Accepted: 29 November 2025

Correspondence to: Mohammad Kargar, Alireza Ebrahiminezhad

Tel: +98 9173149203, +98 71-32305410

E-mail: microkargar@gmail.com, a_ebrahimi@sums.ac.ir

Journal of Microbial World 2025, 17 (4): 234 - 247



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



تاثیر اندازه ذرات بر قدرت ضد میکروبی میکرو و نانوذرات اکسید روی در حالت پودری

سوسن سهرابی^۱، محمد کارگر^{۲*}، امین رمضانی^۳، الهام معظمیان^۴، علیرضا ابراهیمی نژاد^{۵*}

^۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروب شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. ^۲ استاد، گروه میکروب شناسی، موسسه آموزش عالی زند، شیراز، ایران. ^۳ دانشیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده علوم و فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. ^۴ استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. ^۵ دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: نانوپودر اکسید روی به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی کاربرد گسترده ای در صنایع مختلف یافته است. در مطالعات گذشته اثرات ضد میکروبی این ذرات در حالت کلوئیدی بررسی شده است. با توجه به رفتار متفاوت ذرات در حالت پودر با حالت کلوئیدی، این پژوهش با هدف تاثیر اندازه ذرات اکسید روی بر قدرت ضد میکروبی آن ها در حالت پودری انجام شد. **مواد و روش ها:** این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی پس از ساخت میکروذرات و نانوذرات اکسید روی با روش رسوب دهی انجام شد. ویژگی های ظاهری، سطحی و اندازه ذرات با تصویربرداری الکترونی بررسی گردید. آنالیز عنصری ذرات به روش طیفسنجی پراش انرژی پرتو ایکس انجام شد. قدرت ضد میکروبی پودر ذرات با روش انتشار در آگار بررسی گردید. **یافته ها:** ذرات سنتز شده دارای متوسط اندازه ذره ای 150 ± 86.1 میکرومتر و 28 ± 142 نانومتر بودند. نانوذرات تجاری مورد استفاده نیز دارای متوسط اندازه ۵۰ نانومتر بودند. آنالیز عنصری حضور عناصر روی و اکسیژن که مشخصه اکسید روی می باشد را در تایید نمود. میکروذرات و نانوذرات اکسید روی در حالت پودر از نظر قدرت ضد میکروبی تفاوت معنی داری نشان ندادند. **نتیجه گیری:** فعالیت ضد میکروبی ذرات اکسید روی در حالت پودر از قوانین حاکم بر کلوئیدها تبعیت نمی کند. لذا اندازه ذرات اکسید روی تاثیر معنی داری بر قدرت ضد میکروبی این ذرات در حالت پودر ندارد. از این رو می توان در فرمولاسیون های تجاری میکروذرات اکسید روی را جایگزین نانوذرات نمود.

کلمات کلیدی: نانوذره پودری، نانوساختار، اکسید روی، طیفسنجی پراش انرژی پرتو ایکس.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۱۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۱۰/۱۵

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۹/۷

مقدمه

نانوذرات با دارا بودن نسبت سطح به حجم بالا، واکنش پذیری بالا، رفتار نیمه هادی، جذب نور فرابنفش و خاصیت ضد میکروبی در جمله نانومواد پر کاربرد قرار گرفته است. امروزه این نانوذرات در صنایع و محصولات تجاری متعددی از جمله صنایع الکترونیک، صنایع شیمیایی، محصولات آرایشی-بهداشتی، تولیدات کشاورزی، صنایع دارویی و محصولات پزشکی کاربرد یافته اند (۱-۳). کاربردهای تجاری،

در سال های اخیر نانوذرات اکسید روی (ZnO) به دلیل دارا بودن خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی منحصر به فرد کاربردهای گسترده ای در علوم و صنایع مختلف یافته اند. این

(* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروب شناسی، موسسه آموزش عالی زند، شیراز، ایران. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
تلفن: ۰۷۱۳۳۳۰۵۴۱۰، ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳
پست الکترونیک: microkargar@gmail.com, a_ebrahimi@sums.ac.ir



استفاده در درمان زخم‌ها گنجانده شده‌اند (۷-۹). مکانیسم‌های ضد میکروبی نانوذرات اکسید روی عمدتاً به دو دسته فرآیندهای اکسیداتیو و غیر اکسیداتیو تقسیم می‌شوند. مکانیسم اکسیداتیو عمدتاً به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و آزادسازی یون‌های روی یک ظرفیتی مرتبط می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن واکنش پذیری بسیار بالایی داشته و می‌توانند در مواجهه با مولکول‌های زیستی با آن‌ها واکنش داده و به اجزای حیاتی سلولی آسیب برسانند. این آسیب‌ها می‌توانند بر فسفولیپیدهای غشایی، پروتئین‌های ساختاری و آنزیمی و همچنین بر مولکول‌های اسید نوکلئیک واقع شود که در نتیجه به مرگ سلول‌های میکروبی منجر خواهد شد. علاوه بر این، آزاد شدن یون‌های روی از نانوذرات می‌تواند اثرات سمی بر روی باکتری‌ها داشته باشد که با عملکردهای متابولیک ضروری تداخل می‌کند و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود (۱۰). از سوی دیگر، مکانیسم‌های غیر اکسیداتیو نیز نقش مهمی ایفا می‌کنند. این مکانیسم‌ها به طور عمده آسیب‌های فیزیکی است که در نتیجه تماس مستقیم نانوذرات با سلول‌های میکروبی رخ می‌دهند. تماس مستقیم نانوذرات اکسید روی با سطح سلولی‌های میکروبی موجب می‌شود تا این نانوذرات در غشای پلاسمایی سلول‌ها نفوذ کرده و با ایجاد اختلالات ساختاری نفوذپذیری انتخابی غشاء را تغییر داده و تراوایی آنرا افزایش دهد (۱۱). این اختلال نه تنها تمامیت سلول باکتری را به خطر می‌اندازد بلکه اجازه ورود رادیکال‌های آزاد و یون‌های فلزی را نیز می‌دهد و بدین ترتیب اثر ضد میکروبی ناشی از مکانیسم‌های اکسیداتیو را نیز تقویت می‌کند. تمامی نانوذرات اکسید روی عرضه شده به صورت تجاری در حالت پودر در دسترس هستند. همچنین اغلب واحدهای تولیدی و کارخانه‌هایی که محصولات با خواص ضد میکروبی تولید می‌کنند، این نانوذرات را به صورت پودر در فرمولاسیون خود استفاده می‌کنند. به عنوان مثال، محصولات پلاستیکی ضد میکروبی مانند محصولات پلی اتیلن با مخلوط کردن پودر نانوذرات اکسید روی با مسترچ‌های پلیمری تولید می‌شوند. به این معنی است که در محصولات تجاری، نانوذرات

صنعتی و پزشکی این نانوذرات تا بدانجا توسعه یافته‌اند که امروزه این نانوذرات در مقیاس صنعتی تولید و تحت نام‌های تجاری تأیید شده به بازار مصرف ارائه می‌شوند. تولید و عرضه نانوذرات اکسید روی در مقیاس صنعتی در ایران نیز توسعه یافته و نام‌هایی تجاری تأیید شده از این نانوذرات در پایگاه اطلاع‌رسانی محصولات فناوری نانو ایران به آدرس (<https://nanoproduct.ir>) قابل مشاهده است.

در کنار تمامی ویژگی‌های ارزشمند این نانوذرات، اثرات ضد میکروبی آن‌ها موجب شده تا این نانوذرات توسط شرکت‌های تولید کننده محصولات با خواص ضد میکروبی به وفور مورد استفاده قرار گیرند. هرچند نانوذرات نقره به عنوان قویترین نانوذرات ضد میکروبی شناخته می‌شوند، اما نانوذرات اکسید روی با به دست آوردن برتری اقتصادی و همچنین سازگاری بیشتر با محیط زیست توانسته‌اند به عنوان یک جایگزین مناسب برای نانوذرات نقره مطرح شوند (۵ و ۴). این موضوع به ویژه در تولید محصولات تجاری حجیم و با وزن بالا اهمیت دارد. نانوذرات ضد میکروبی باید به یک نسبت مشخص در محصولات تجاری وارد شوند تا بتوانند اثرات ضد میکروبی خود را اعمال نمایند. پر واضح است که در محصولات تجاری حجیم و یا با وزن بالا لازم است تا مقادیر قابل توجهی از نانوذرات وارد فرمولاسیون محصول گردد. در تولید چنین محصولاتی استفاده از نانوذرات گران قیمت نقره اقتصادی نیست و نانوذرات اکسید روی با قیمت به مراتب کمتر گزینه درست را ارائه می‌دهند. نانوذرات اکسید روی همچنین با داشتن ویژگی جاذب نور فرابنفش می‌توانند کاربردهای افزوده را نیز ایجاد نمایند. به عنوان مثال در محصولاتی مانند کرم‌های ضد آفتاب این موضوع نمود دارد، جایی که نانوذرات اکسید روی نه تنها به عنوان فیلترهای فرابنفش عمل می‌کنند بلکه به عنوان عوامل ضد میکروبی نیز برای محافظت از پوست در برابر عفونت‌ها به کار می‌روند (۶). استفاده از نانوذرات اکسید روی در فرمولاسیون محصولات پزشکی و دارویی منحصر به کرم‌های ضد آفتاب نیست، این نانوذرات به دلیل اثربخشی در مهار رشد پاتوژن‌ها، در فرمولاسیون پمادها و داروهای مورد

نانوذرات تا به حال در مجلات و سمینارهای علمی به چاپ رسیده و یا ارائه شده است قابل تأمیم به محصولات تجاری ضد میکروبی نیست.

در سال ۲۰۲۵ میلادی روشی جدید ارائه شد که با استفاده از آن محققان توانستند اثرات ضد میکروبی نانو ذرات را در حالت پودر مورد آزمون قرار دهند (۲۱). این روش که با نام انتشار سلول (قالب) آگار معرفی شده قادر است قدرت ضد میکروبی نانو ذرات را در حالت پودر به روش انتشار آگار (مشابه روش انتشار چاهک آگار) بررسی نماید. معرفی روش انتشار قالب آگار این امکان را فراهم می‌آورد تا بتوان به یک ابهام کلیدی در مورد استفاده صنعتی از نانو ذرات اکسید روی پاسخ داد. شاید بتوان در جهت افزایش خواص ضد میکروبی محصولات، بجای استفاده از نانو ذرات تجاری موجود از نانو ذرات بزرگتر و یا حتی میکرو ذرات در فرمولاسیون محصولات با خواص ضد میکروبی بهره برد. لذا در پژوهش پیشرو ذرات اکسید روی با اندازه‌های مختلف سنتز شده و قدرت ضد میکروبی آن‌ها در حالت پودر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

(الف) مواد مورد استفاده: نیترات روی شش آبه ($Zn(NO_3) \cdot 6H_2O$) و باریم کلرید ($BaCl_2$) محصول شرکت مرک آلمان استفاده شد. هیدروکسید سدیم ($NaOH$) به صورت پلت از شرکت شیمیایی کیمیا اکسیر سازان کوثر (نطنز، ایران) تهیه شد. اسید سولفوریک غلیظ محصول مجتمع صنایع شیمیایی دکتر مجللی (تهران، ایران) خریداری شد. محیط کشت مولر-هینتون آگار محصول شرکت کیولب (QUELAB, Canada) مورد استفاده قرار گرفت. باکتری *Staphylococcus aureus* Rosenbach (ATCC No. 25923) و همچنین باکتری *Escherichia coli* Seattle 1946 (ATCC No. 25922) از مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی دکتر البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، تأمین گردید. در تمام بخش‌های این مطالعه از قبیل سنتز نانو ذرات، ساخت محلول‌ها و همچنین ساخت محیط‌های کشت از آب میلیپور به دست آمده از دستگاه شرکت

اکسید روی به صورت کلوتیدی (حالتی که معمولاً در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی کاربرد دارد) به کار نمی‌روند، بلکه این نانو ذرات در حالت پودر استفاده می‌شوند.

در حالت کلوتیدی قدرت ضد میکروبی نانو ذرات نسبت عکس با توزیع اندازه ذره‌ای آن‌ها دارد، بدین معنی که هرچه نانو ذرات کوچکتر شوند قدرت ضد میکروبی آن‌ها بیشتر می‌شود. کوچک شدن اندازه ذرات موجب افزایش نسبت سطح به حجم آن‌ها می‌شود. همین امر موجب می‌شود تا میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و همچنین میزان آزاد سازی یون‌های فلزی به مقدار قابل توجهی افزایش یابد (۱۲). نانو ذرات کوچکتر همچنین اندرکشی‌های موثرتری با سطح سلول‌های میکروبی برقرار کرده و از قدرت نفوذ بالاتری در سلول‌ها برخوردار هستند. نکته جالب توجه آن است که این قاعده در حالت پودر به طور قطع صادق نیست. برخی مطالعات نشان داده‌اند که کوچک شدن نانو ذرات استعداد آن‌ها را برای اگریگاسیون در حالت پودر افزایش می‌دهد. اگریگاسیون نانو ذرات موجب می‌شود تا نانو ذرات کوچک به یکدیگر متصل شده و تشکیل فراساختارهای بزرگ دهند. اندازه این فراساختارها در برخی موارد می‌تواند حتی به مقیاس میکرومتر و یا بزرگتر هم برسد. این در حالی است که نانو ذرات بزرگ در حالت پودر کمتر دچار اگریگاسیون می‌شوند. همین واقعیت موجب می‌شود تا در برخی موارد ذرات بزرگتر در حالت پودر خواص ضد میکروبی قویتری را نسبت به ذرات کوچک بروز دهند (۱۳).

نتایج آزمون‌های ضد میکروبی تنها در صورتی قابل ارجاع هستند که بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد بین المللی (CLSI) Clinical & Laboratory Standards Institute و یا (ISO) International Organization for Standardization انجام شده باشند. این دستورالعمل‌های استاندارد (از قبیل انتشار دیسک آگار و روش‌های بر مبنای رقت) و حتی آزمون‌های ضد میکروبی دیگری که بر پایه این دستورالعمل‌های استاندارد توسعه یافته‌اند (مانند انتشار چاهک آگار) همگی جهت بررسی قدرت ضد میکروبی محلول‌ها و کلوتیدهای پایدار طراحی شده‌اند (۱۴-۲۰). لذا آنچه در مورد قدرت ضد میکروبی

شد. به منظور جلوگیری از افت دمای واکنش، تزریق محلول هیدروکسید سدیم از طریق دهانه جانبی بالن انجام گرفت. واکنش به مدت ۱۲ ساعت در دمای جوش و تحت همزنی شدید ادامه یافت. نانوذرات حاصل با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰ هزار جی به مدت ۱۰ دقیقه رسوب دهی شده و سه بار مورد شست و شو قرار گرفتند. رسوب حاصل در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در داخل فور به مدت یک شب خشک کردید. ماده خشک به دست آمده با استفاده از مورتار و پستل به طور کامل آسیاب شده و به پودر کاملاً نرم تبدیل شد.

د) تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی: پودر اکسید روی حاصل از مراحل قبل درون آب میلیپور سوسپانسیون شد. یک قطره از این سوسپانسیون بر روی یک لامل شیشه‌ای کاملاً تمیز (شست و شو داده شده با اسید) قرار گرفت تا به طور کامل بر روی لامل پخش شود. اجازه داده شد تا سوسپانسیون در دمای اتاق به طور کامل خشک شود. نمونه لامل حاصل با استفاده از دستگاه پوشش دهنده طلا (Sputtering coating) مدل R-ES150Q ساخت شرکت Quorum Technologies انگلستان تحت پوشش دهی طلا قرار گرفت. نمونه با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل Vega3 محصول شرکت TESCAN جمهوری چک مورد تصویربرداری الکترونی قرار گرفتند.

ه) آنالیز توزیع اندازه ذره‌ای: توزیع اندازه ذره‌ای نانوذرات با استفاده از نرم افزار آنالیز تصویر ImageJ ونسخه ۱/۵۴ g توسعه یافته توسط موسسه ملی سلامت ایالات متحده آمریکا (<https://imagej.org>) (National Institutes of Health, NIH) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور تعداد ۱۰۰ عدد از ذرات به صورت تصادفی بر روی میکروگراف‌های الکترونی انتخاب شده و قطر آن‌ها تعیین گردید. توزیع اندازه ذره‌ای به صورت هیستوگرام ترسیم گردید.

و) آنالیز عنصری پودر اکسید روی: آنالیز عنصری پودرهای اکسید روی با روش طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDAX) و بهره‌گیری از میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد استفاده در تصویربرداری الکترونی انجام گرفت.

میلیپور (ایالات متحده آمریکا) استفاده شد. نانوذرات اکسید روی تجاری از یکی از شرکت‌های تولیدی مورد تایید ستاد توسعه فناوری‌های میکرو و نانو خریداری شد. براساس ادعای شرکت تولیدی و تصاویر میکروسکوپ الکترونی ارائه شده توسط شرکت، این ذرات دارای متوسط اندازه حدود ۵۰ نانومتر بوده‌اند. به جهت جلوگیری از هرگونه تعارض منافع از قید نام شرکت تولیدی خوداری گردید.

ب) سنتز میکروذرات اکسید روی: سنتز میکروذرات اکسید روی در یک بالن یک دهانه ته گرد و در دمای اتاق انجام شد. ابتدا مقدار ۱۶ میلی‌تر آب میلیپور درون بالن ریخته شد. سپس تحت همزنی شدید مغناطیسی مقدار دو میلی‌لیتر محلول نیترات روی با غلظت یک مولار افزوده شد. در ادامه مقدار دو میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم با غلظت یک مولار به صورت آنی به محلول درون بالن تزریق شد. دهانه بالن با استفاده از درپوش شیشه‌ای مسدود شد و واکنش برای مدت ۱۲ ساعت ادامه یافت. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه مورد سانتریفیوژ با سرعت ۱۰ هزار جی (g) قرار گرفت تا محلول رویی کاملاً شفاف شود. رسوب حاصل که همان میکروذرات اکسید روی بود سه مرتبه مورد شست و شو با آب میلیپور قرار گرفت تا تمام اجزای واکنش نیافته شسته شوند. در نهایت رسوب حاصل به مدت یک شب در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفت تا به طور کامل خشک شود. جامد خشک حاصل با استفاده از مورتار و پستل آسیاب شده و به پودر کاملاً نرم تبدیل شد.

ج) سنتز نانوذرات اکسید روی: روش سنتز نانوذرات اکسید روی مشابه سنتز میکروذرات اکسید روی بود با این تفاوت که واکنش در دمای جوش و تحت ستون تقطیر انجام شد. همچنین به منظور سهولت در انجام واکنش از بالن دو دهانه ته گرد استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا ۱۶ میلی‌لیتر آب میلیپور درون بالن ریخته و به آن دو میلی‌لیتر محلول نیترات روی با غلظت یک مولار افزوده شد. اجازه داده شد تا محلول با همزنی به دمای جوش (تقریباً ۱۰۰ درجه سلسیوس) برسد. در مرحله بعد دو میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم با غلظت یک مولار و در دمای جوش به صورت آنی به محلول درون بالن تزریق

گروه‌های مختلف را نشان نداد. از این رو آزمون‌های پست هاک نیز جهت مقایسه دو به دو میانگین گروه‌های مختلف انجام نگرفت.

یافته‌ها

الف) سنتز میکروذرات و نانوذرات اکسید روی: محلول‌های مورد استفاده در سنتز نانوذرات (محلول نترات روی و محلول هیدروکسید سدیم) محلول‌های شفاف و فاقد هرگونه ذره حل نشده بود. پس از افزودن محلول هیدروکسید سدیم به بالن واکنش به سرعت مخلوط واکنش به صورت شیری رنگ تغییر رنگ داده که نشان دهنده تشکیل هسته‌های اولیه اکسید روی بود (شکل ۱). با گذشت زمان شدت رنگ رفته رفته افزایش یافت. سنتز نانوذرات فلزی با واسطه واکنش‌های رسوب‌دهی (مانند آنچه در این مطالعه انجام شد) طور معمول در دو مرحله انجام می‌شود. در ابتدای واکنش که با نام مرحله هسته‌زایی شناخته می‌شود، هسته‌های اولیه شکل می‌گیرند. در مرحله بعد که به مرحله رشد تعریف می‌شود رفته رفته اندازه هسته‌های اولیه افزایش یافته و ذرات با اندازه‌های بزرگتر شکل می‌گیرند. اندازه ذرات حاصل به پارامترهای واکنش از قبیل غلظت پیشساز فلزی، شدت همزنی و دمای واکنش بستگی دارد. در این مطالعه از پارامتر دمای واکنش جهت سنتز نانوذرات در اندازه‌های مختلف استفاده شد. نهایتاً پس از انجام واکنش، شست‌وشو و خشک‌سازی نانوذرات، جامدی کرمی رنگ حاصل آمد. با استفاده از مورتار و پستل این جامد کرمی رنگ به پودر کاملاً نرم آسیاب شد.

ب) تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی: تصاویر میکروسکوپ الکترونی حاصل از میکروذرات اکسید روی در شکل ۲ نمایش داده شده است. همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود ذرات به‌دست آمده از نظر اندازه در مقیاس میکرومتر بوده و لذا اطلاق عبارت میکروذرات برای آن‌ها عبارت صحیح می‌باشد. از نظر شکل، میکروذرات به‌دست آمده کروی شکل بوده‌اند. از نظر ریخت‌شناسی این ذرات به صورت میکروفلاور (Microflower) و دارای فلس بودند. این ویژگی‌ها در

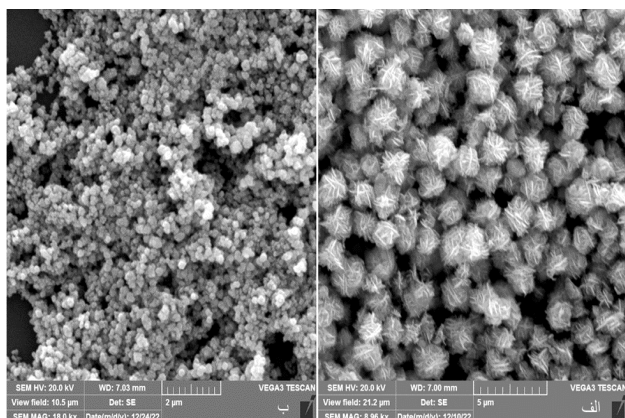
ز) کشت سلول‌های باکتریایی و آماده‌سازی مایه تلقیح: سلول‌های باکتریایی استافیلوکوکوس آرنوس و اشریشیا کلی بر روی پلیت‌های مولر-هیتون آگار کشت داده شدند. پس از یک شب گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، کلونی‌های حاصل با استفاده از سواب استریل به محلول نرمال سالین منتقل گردید. کدورت سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از صفحه کتراسیت با پشت زمینه سفید و خطوط مشکی معادل با استاندارد کدورت ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. استاندارد کدورت ۰/۵ مک فارلند با مخلوط کردن ۵۰ میکرولیتر کلرید باریوم یک درصد در حجم ۹/۹۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک یک درصد تهیه شد.

ح) آزمون انتشار در آگار: برای انجام این آزمون از مایه تلقیح باکتریایی آماده شده در مرحله قبل بر روی پلیت‌های مولر-هیتون آگار به روش چمنی کشت داده شد. با استفاده از ابزار پانچ آگار، چاهکی به قطر شش میلی‌متر در محیط آگار ایجاد شد. سپس چاهک ایجاد شده به‌طور کامل با آگار ذوب شده (۱/۵ درصد) که حاوی پودر اکسید روی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود پر شد. اجازه داده شد تا با سرد شدن آگار در داخل چاهک، قالب آگار شکل گیرد. سپس پلیت‌ها برعکس شده و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از ۱۸ ساعت، قطر ناحیه مهار رشد در برابر پس‌زمینه سیاه اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی تکرارپذیری آزمون‌ها هر آزمایش با سه تکرار و در سه روز جداگانه انجام شد.

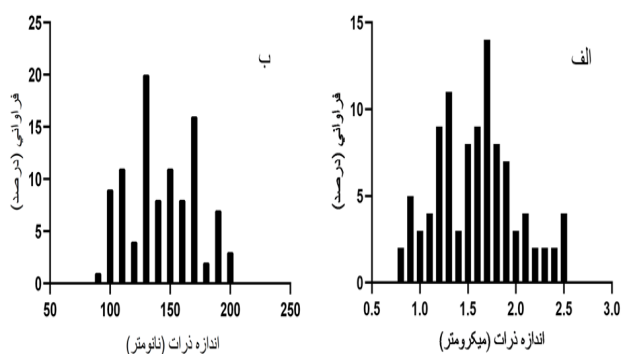
ط) آزمون‌های آماری: آزمون‌های آماری با استفاده از نرم افزار آنالیز آماری IBM SPSS Statistics, Version 20 انجام گرفت. بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk test) و بررسی برابری واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون (Levene's test) انجام شد. نتایج این دو آزمون صادق بودن آزمون‌های پارامتریک را در این مطالعه تایید نمود. لذا آزمون مقایسه میانگین چندگانه به روش آنووا (One-way analysis of variance or one-way ANOVA) انجام گرفت. آزمون آنووا اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌های



شکل ۱: واکنش سنتز نانوذرات اکسید روی در دمای اتاق، قبل از افزودن هیدروکسید سدیم (الف)، بعد از افزودن هیدروکسید سدیم (ب) و بعد از ۲۴ ساعت واکنش (ج)، ایجاد رنگ شیری نشانه اولیه در خصوص شکل گیری ذرات اکسید روی می باشد.



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از میکروذرات (الف) و نانوذرات اکسید روی (ب) که نشان دهنده شکل، اندازه و ویژگی های سطحی ذرات می باشد، بزرگ نمایی هر بخش در زیر تصاویر به صورت نوار مقیاس ارائه شده است.

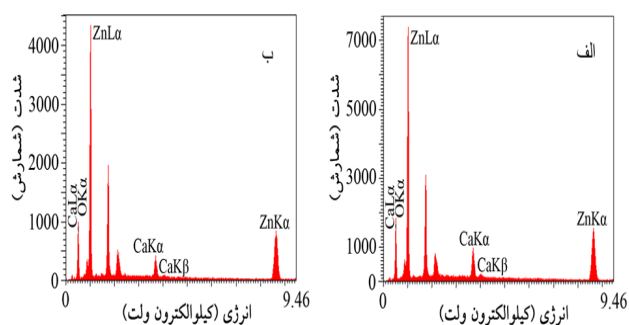


شکل ۳: توزیع اندازه ذره های میکروذرات (الف) و نانوذرات اکسید روی (ب) که نشان دهنده پراکنش ذرات در دامنه اندازه های میکرومتر و نانومتر می باشد.

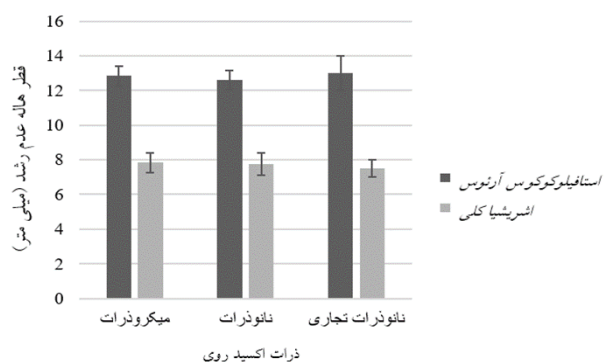
هم خوانی کامل با مطالعات گذشته است. مطالعات پیشین نیز نشان داده اند که سنتز ذرات اکسید روی در ابعاد میکرومتری موجب شکل گیری میکروفلاورهای داری فلس می شود (۲۲-۲۵). از سوی دیگر میکروذرات به دست آمده ساختارهای مجتمع (Aggregated) ایجاد ننموده بودند. عدم شکل گیری ساختارهای مجتمع موجب می شود تا ذرات در حالت پودر توزیع یک قله ای (تک وجهی یا Unimodal) داشته باشند. این رفتار ذرات بزرگ در حالت پودر قابل پیش بینی بود و در مطالعات قبل نیز به آن اشاره شده است (۱۳).

تصویر میکروسکوپ الکترونی حاصل از نانوذرات اکسید روی در شکل ۲ نمایش داده شده است. این نانوذرات از نظر اندازه ظاهری در مقایس نانومتری قرار گرفته و دارای شکل کروی بودند. تصویر میکروسکوپ الکترونی به خوبی نشان داد که این نانوذرات در حالت پودر تشکیل ساختارهای مجتمع و متشکل از چندین نانوذره می دهد. تشکیل ساختارهای مجتمع موجب می شود تا نانوذرات در حالت پودر از نظر اندازه دارای توزیع دو قله ای (Bimodal) و یا حتی چند قله ای (Multimodal) باشند. این پارامتر در سیستم های کلئیدی با استفاده از آنالیز پراکندگی دینامیک نور (Dynamic light scattering, DLS) به خوبی قابل بررسی و اندازه گیری است. اما در حالت پودر امکان انجام این آنالیز وجود ندارد. در مطالعه حاضر نیز ویژگی های ذرات در حالت پودر مورد توجه بوده است.

(ج) آنالیز اندازه ذره ای ذرات اکسید روی: توزیع اندازه ذره ای میکروذرات اکسید روی که بر مبنای تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی محاسبه شده است در شکل ۳ ارائه شده است. قطر این ذرات از ۸۴۱ نانومتر تا ۲/۵۱۳ میکرومتر اندازه گیری شد. متوسط قطر این ذرات نیز برابر با $1/5816 \pm 0/415$ میکرومتر محاسبه گردید. در مورد نانوذرات اکسید روی توزیع اندازه ذره ای از ۹۴ نانومتر تا ۲۰۰ نانومتر مشاهده گردید. میانگین اندازه ذره ای در این نانوذرات برابر با 142 ± 28 نانومتر به دست آمد.



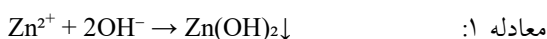
شکل ۴: نتایج آنالیز طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDAX) میکروذرات (الف) و نانوذرات اکسید روی (ب)، نتایج تایید کننده حضور عناصر مشخصه اکسید روی (اکسیژن و روی) می باشند.



شکل ۵: قطر هاله های عدم رشد دو باکتری استافیلوکوکوس آرنئوس و اشریشیا کلی در اثر مواجهه با میکروذرات، نانوذرات و نانوذرات تجاری اکسید روی با روش انتشار در آگار.

بحث

روش رسوب دهی شیمیایی یکی از متداول ترین روش ها در ساخت نانوذرات فلزی می باشد. این روش ها بر مبنای خروج یون های فلزی از حالت یونی محلول به حالت های غیر یونی (فلزی، اکسید فلزی و یا هیدروکسید فلزی) نا محلول انجام می شوند. بسته به شرایط واکنش و واکنش گرهای مورد استفاده در فرایند رسوب دهی انواع مختلفی از نانوذرات قابل دسترسی هستند. در این مطالعه از یون های روی حاصل از نیترات روی به عنوان پیش ساز روی استفاده شد. عاملی که فرایند رسوب دهی را تسریع نمود افزودن هیدروکسید سدیم به ظرف واکنش بود. به طور کلی می توان واکنش یون های روی را با هیدروکسید سدیم به صورت معادله ۱ در نظر گرفت.



د) آنالیز عنصری پودر اکسید روی: نتایج آنالیز عنصری پودر اکسید روی حاصل از میکروذرات و نانوذرات در شکل ۴ آورده شده است. در آنالیز هر دو ذره پیک های مربوط به عناصر روی و اکسیژن که مشخصه اکسید روی هستند به خوبی شناسایی شدند. پیک های نشان دهنده عنصر کلسیم احتمالاً مربوط به ناخالصی های موجود در نمک نیترات روی مورد استفاده در سنتز ذرات بوده است. پیک هایی که در تصویر تعیین هویت نشده اند مربوط به فرایند آماده سازی (پوشش دهی) نمونه ها قبل از آنالیز می باشند.

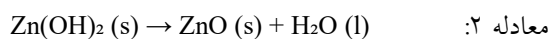
ه) آزمون انتشار قالب آگار: قدرت ضد میکروبی پودر میکروذرات، نانوذرات، و نانوذرات تجاری اکسید روی به روش انتشار قالب آگار مورد بررسی قرار گرفت. تمام آزمون ها به صورت سه بار تکرار و در سه روز مجزا انجام شد. هر سه ذره اکسید روی مورد آزمایش (میکروذرات، نانوذرات و نانوذرات تجاری) توانستند از رشد باکتری استافیلوکوکوس آرنئوس و همچنین باکتری اشریشیا کلی جلوگیری نموده و هاله عدم رشد قابل مشاهده ایجاد نمایند. قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری شد و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در شکل ۵ نمایش داده شده است.

بررسی داده ها با آزمون شاپیرو-ویلک توزیع نرمال داده ها را تایید نمود ($p < 0.05$). آزمون لون برای داده های به دست آمده علیه استافیلوکوکوس آرنئوس مقدار p برابر با ۰/۶۵۲ و برای داده های به دست آمده علیه اشریشیا کلی مقدار p برابر با ۰/۷۶۳ ارائه نمود. به جهت آنکه هردوی این مقادیر بزرگتر از ۰/۰۵ بود فرض برابری واریانس ها تایید شد. با توجه به نتایج آزمون شاپیرو-ویلک و آزمون لون، آزمون مقایسه میانگین چندگانه با استفاده از آزمون پارامتریک آنوا انجام گرفت. نتایج این آزمون اختلاف معنی دار در قدرت ضد میکروبی ذرات اکسید روی علیه باکتری استافیلوکوکوس آرنئوس ($p = 0.004$) و اشریشیا کلی ($p = 0.004$) نشان نداد. لذا آزمون های پست هاک نیز انجام نگرفت.

اکسید روی در اغلب کاربردها مانند نانو کامپوزیت‌ها و فرمولاسیون‌های دارویی به صورت پودر مورد استفاده قرار می‌گیرند. اهمیت مطالعه انجام شده پیشرو را شاید بتوان از چند منظر مورد کنکاش قرار داد. اول آنکه نانوذرات تجاری اکسید روی از پایداری کلئیدی مناسب برخوردار نیستند. این واقعیت به آن معنی است که انجام آزمون‌های ضد میکروبی معمول از قبیل رقیق‌سازی آبگوشت (Broth dilution) و انتشار چاهک آگار نمی‌تواند اطلاعات صحیح در مورد قدرت ضد میکروبی این ذرات ارائه نماید (۱۷). مشکل اصلی در چنین مواردی آن است که این نانوذرات در حالت کلئیدی به سرعت مجتمع شده و به صورت رسوب از سیستم خارج می‌شوند. این فرایند در طول چند دقیقه اتفاق می‌افتد. این در حالی است که برای انجام آزمون‌های ضد میکروبی به روش رقیق‌سازی آبگوشت نیاز است تا نانوذرات برای حد اقل ۱۸ ساعت به حالت کلئید پایدار باقی بمانند (۲۸). هرچند در آزمون‌های انتشار آگار این زمان به میزانی که نانوذرات در محیط آگار منتشر شوند (دو الی ۱۲ ساعت) کاهش می‌یابد (۲۱). اما نانوذرات اکسید روی تجاری در همین بازه زمانی نیز پایداری مناسب جهت دستیابی به نتایج صحیح را نخواهند داشت.

روش انتشار دیسک از دیگر روش‌هایی است که در انجام آزمون‌های ضد میکروبی مرسوم است. در این روش نیاز است تا ترکیب ضد میکروبی مورد آزمون به خوبی بر روی دیسک‌های خام بارگیری شده و سپس در هنگام انجام آزمون از داخل دیسک به محیط آگار منتشر شود (۲۰). شاید بتوان بارگیری نانوذرات را در داخل دیسک به روش غوطه وری در کلئید نانوذرات انجام داد. اما آنچه مسلم است آنکه نانوذرات متصل شده به الیاف دیسک دیگر به صورت مناسب از این فیبرها جدا نخواهند شد و انتشار آن‌ها در محیط آگار محدود می‌شود. این امر موجب می‌شود تا اثرات ضد میکروبی نانوذرات که وابسته به اندرکنش مستقیم نانوذرات با سلول‌های میکروبی است به میزان چشم‌گیری کاهش یابد. در چنین حالتی اثرات ضد میکروبی تا حد زیادی محدود به آزادسازی یون‌های فلزی و همچنین تولید رادیکال‌های آزاد خواهد شد (۲۹-۳۱). از

هیدروکسید روی ایجاد شده طی فرایند آبگیری به اکسید روی تبدیل می‌شود که این فرایند را می‌توان با معادله ۲ نمایش داد.



برخی مطالعات فرایند آبگیری را به صورت کلسیناسیون در دماهای بالا (بالای ۳۰۰ درجه سلسیوس) انجام داده‌اند (۲۶). اما برخی مطالعات دیگر فرایند خشک کردن ساده را برای آبگیری کافی دانسته و کلسیناسیون در دماهای بالا را انجام نداده‌اند (۲۵). فرایند کلسیناسیون در دماهای بالا می‌تواند اثر مخرب جدی بر ساختار هندسی و حتی کریستالی ذرات اکسید روی داشته باشد. لذا انتخاب دما و زمان مناسب برای این فرایند اهمیت جدی در دستیابی به ذرات با ساختارهای مطلوب دارد. در مطالعه انجام شده به جهت احتمال تخریب ساختارها در نتیجه کلسیناسیون این فرایند انجام نگرفت و تنها به خشک کردن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس اکتفا شد.

عامل دیگری که می‌تواند بر ساختار ذرات اکسید روی تأثیر عمیق داشته باشد، دمای واکنش است. نشان داده شده است که دمای واکنش می‌تواند بر شکل هندسی و اندازه ذرات حاصل از واکنش رسوب‌دهی یون روی تأثیر قابل توجه داشته باشد. یافته‌های مطالعه پیشرو نشان داد که انجام واکنش رسوب‌دهی در دمای اتاق موجب شکل‌گیری میکروذرات اکسید روی خواهد شد. اما افزایش دمای واکنش به دمای جوش موجب می‌شود تا اندازه ذرات به مقیاس نانو کاهش یافته و نانوذرات اکسید روی به‌دست آیند. این یافته‌ها با یافته‌های گزارش شده در مطالعات قبل در تطابق کامل می‌باشد. مطالعات قبل نیز نشان داده‌اند که افزایش دمای واکنش موجب می‌شود تا توزیع اندازه ذره‌ای به میزان قابل توجهی کاهش یابد (۲۷). به‌عنوان مثال نشان داده شده است که افزایش دمای واکنش از ۶۰ درجه سلسیوس به ۸۰ درجه سلسیوس موجب می‌شود تا اندازه ذرات اکسید روی به‌دست آمده از یک میکرومتر به ۵۰۰ نانومتر کاهش یابد (۲۵).

در مطالعه حاضر تلاش شد تا قدرت ضد میکروبی ذرات اکسید روی (میکروذرات و نانوذرات) در حالت پودر مورد بررسی قرار گیرد. اهمیت این موضوع از آن جهت است که ذرات

اکسید روی تأثیر معنی‌داری بر قدرت ضد میکروبی این ذرات در حالت پودر ندارد. این یافته‌ها در تناقض با گزارش‌های موجود در خصوص قدرت ضد میکروبی نانوذرات در حالت کلوئیدی می‌باشد. نانوذرات در حالت کلوئیدی پایدار معمولاً به صورت منفرد و یا تجمعی از چند عدد نانوذره وجود دارند. لذا کوچک شدن اندازه نانوذرات موجب افزایش نسبت سطح به حجم نانوذرات می‌گردد. این افزایش در نسبت سطح به حجم موجب افزایش فعالیت‌های شیمیایی ضد میکروبی نانوذرات مانند آزادی‌سازی یون‌های فلزی و همچنین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود (۱۲). از سوی دیگر کوچک شدن نانوذرات اندرکنش آن‌ها را با سلول‌های باکتریایی افزایش می‌دهد که در نهایت منجر به تأثیر بیشتر بر این سلول‌ها می‌شود.

ذرات در حالت پودر به صورت منفرد توزیع نمی‌یابند بلکه احتمال به هم چسبیدن (اگریگاسیون) آن‌ها و ایجاد ساختارهای بزرگ وجود دارد. میزان اگریگاسیون نانوذرات در حالت پودر نسبت عکس با اندازه ذرات دارد و لذا نانوذرات کوچک در حالت پودر دیگر به صورت نانوذره دیده نمی‌شوند بلکه ساختارهای بزرگ و در مقیاس‌های میکرومتری ایجاد می‌نمایند. به همین جهت اثرات شیمیایی و زیستی (از قبیل اثرات ضد میکروب) آن‌ها نیز بیشتر از میکروذرات نخواهد بود (۱۳).

نتیجه‌گیری

ذرات مورد آزمایش شامل میکروذرات اکسید روی، نانوذرات اکسید روی و نانوذرات تجاری اکسید روی بودند. برای بررسی قدرت ضد میکروبی ذرات اکسید روی در حالت پودر از روش نوین انتشار قالب آگار استفاده شد که در سال ۲۰۲۵ میلادی معرفی شده است. نتایج به‌دست آمده نشان داد که اندازه ذره‌ای هیچ تأثیر معنی‌داری از نظر آماری بر قدرت ضد میکروبی ذرات اکسید روی در حالت پودر ندارد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که رفتار و خواص نانوذرات در حالت‌های مختلف می‌تواند تا چه اندازه متفاوت باشد. به خصوص نباید یافته‌های موجود در مورد خواص ذرات در حالت کلوئید را به حالت پودر تأمیم

سوی دیگر ظرفیت دیسک‌های خام جهت بارگیری نانوذرات محدود است و نمی‌توان بازه کارآمدی از نانوذرات را در داخل آن‌ها بارگیری نمود.

روش انتشار قالب آگار روشی جدید است که در سال ۲۰۲۵ میلادی معرفی شد. در این روش برخلاف روش‌های دیگر در آزمون‌های ضد میکروبی نیاز نیست تا نانوذرات مورد آزمایش به صورت کلوئید پایدار باشند. در این روش نانوذرات مورد آزمایش به حالت پودر به محلول آگار مایع افزوده می‌شوند و این مخلوط حاصل جهت بارگیری در چاهک آگار مورد استفاده قرار می‌گیرد. چگالی بالای این مخلوط به دلیل وجود آگار مایع موجب می‌شود تا پایداری نانوذرات افزایش یابد. از سوی دیگر مخلوط آگار و نانوذرات در داخل چاهک آگار به دلیل حجم اندکی که دارد (حدود ۱۰۰ میکرولیتر) به سرعت جامد می‌شود. جامد شدن آگار موجب می‌شود تا نانوذرات در قالب آگار ایجاد شده پایدار گردند و از تجمع و رسوب‌دهی آن‌ها جلوگیری شود. این وضعیت موجب می‌شود تا بتوان نانوذرات ناپایدار از نظر کلوئیدی را به خوبی مورد آزمایش قرار داد. نشان داده شده است که برخی نانوذرات مانند نانوذرات هیدروکسید مس به خوبی قادر هستند از قالب آگار خارج شوند. اما این روش برای همه نانوذرات امکان انتشار مناسب در داخل محیط آگار را فراهم نمی‌آورد (۲۱). نتایج حاصل از مطالعه پیشرو و مطالعات قبلی نشان داده‌اند که متأسفانه نانوذرات اکسید روی به‌طور کامل از داخل قالب آگار به محیط آگار منتشر نمی‌شوند (۲۱). لذا اثرات ضد میکروبی مشاهده شده در این مطالعه تا حد زیادی مربوط به مکانیسم‌های اکسیداتیو ذرات اکسید روی می‌باشد.

در این مطالعه قدرت ضد میکروبی ذرات اکسید روی با اندازه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. این ذرات شامل میکروذرات اکسید روی (با متوسط اندازه تقریبی ۱۶۰۰ نانومتر، نانوذرات اکسید روی (با متوسط اندازه تقریبی ۱۴۰ نانومتر) و نانوذرات تجاری اکسید روی (با متوسط اندازه تقریبی ۵۰ نانومتر). نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های ضد میکروبی و آنالیزهای آماری نشان داد که توزیع اندازه ذره‌ای در ذرات

داد. سنتز نانوذرات اکسید روی با اندازه‌های نانومتری از نظر اقتصادی با صرف انرژی و در نتیجه ایجاد هزینه‌های بالاتری نسبت به سنتز میکروذرات انجام می‌شود. سنتز نانوذرات اکسید روی معمولا در دماهای بالا (بالای ۸۰ درجه سلسیوس) انجام می‌شود. اما سنتز میکروذرات اکسید روی در دمای محیط قابل انجام است. این اختلاف در فرایند سنتز در زمانی اهمیت قابل توجه می‌یابد که سنتز نانوذرات در مقیاس صنعتی انجام شود. سنتزهای صنعتی معمولا در حجم‌های چند صد تا چند هزار لیتر انجام می‌شود. پر واضح است که تامین حرارت لازم برای رسیدن به دماهای بالای واکنش می‌تواند هزینه‌های قابل توجهی از نظر تامین انرژی ایجاد نماید که منجر به افزایش قابل توجه در قیمت تمام شده محصول خواهد شد. یافته‌های این پژوهش می‌تواند دانشمندان و فناوران را به سمت سنتز و استفاده از میکروذرات اکسید روی به عنوان جایگزین مناسب نانوذرات اکسید روی در فرمولاسیون و ساخت محصولات تجاری با خاصیت ضد میکروبی سوق دهد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز تامین مالی گردیده است. همچنین نویسندگان از حمایت‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز قدردانی می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی کلیه نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Islam F, Shohag S, Uddin MJ, Islam MR, Nafady MH, Akter A, et al. Exploring the journey of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) toward biomedical applications. *Materials*. 2022;15(6):2160.
2. Goswami S, Bishnoi A, Tank D, Patel P, Chahar M, Khaturia S, et al. Recent trends in the synthesis, characterization and commercial applications of zinc oxide nanoparticles-a review. *Inorg Chim Acta*. 2024:122350.
3. Espitia PJP, Soares NdFF, Coimbra JSdR, de Andrade NJ, Cruz RS, Medeiros EAA. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food and bioprocess technology*. 2012;5:1447-64.
4. Sibiya A, Jeyavani J, Santhanam P, Preetham E, Freitas R, Vaseeharan B. Comparative evaluation on the toxic effect of silver (Ag) and zinc oxide (ZnO) nanoparticles on different trophic levels in aquatic ecosystems: A review. *Journal of Applied Toxicology*. 2022;42(12):1890-900.
5. Sadi BS, Chehreii S, Esmaeili M. Biosynthesis of ZnO nanoparticles using green tea extract and determination of its antibiofilm effect on *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from wound infection. *J Microbial World*. 2019;12(38):27-38.
6. Irede EL, Awoyemi RF, Owolabi B, Aworinde OR, Kajola RO, Hazeer A, et al. Cutting-edge developments in zinc oxide nanoparticles: synthesis and applications for enhanced antimicrobial and UV protection in healthcare solutions. *RSC Adv*. 2024;14(29):20992-1034.
7. Mondal MIH, Islam MM, Ahmed F. Enhanced wound healing with biogenic zinc oxide nanoparticle-incorporated carboxymethyl cellulose/polyvinylpyrrolidone nanocomposite hydrogels. *Biomaterials Science*. 2025;13(1):193-209.
8. Shreiki H, Bashour G, Kinjo H. Successful healing of chronic venous ulcer using zinc oxide nanoparticles and compression therapy in a 75-year-old Syrian female: a case report. *Annals of Medicine and Surgery*. 2025;87(1):417-20.
9. Gupta V, Verma P, Gupta A, Kant V, Kumar P, Sharma M. Comparative evaluation for wound healing potentials of bulk and nano forms of zinc oxide ointment. *Наносистемы: физика, химия, математика*. 2020;11(4):443-51.
10. Soltani-Nezhad S, Khorasgani MR, Emtiazi G. Analysis of zinc resistance gene in zinc and zinc oxide nanoparticles resistant *Pseudomonas stutzeri* SEE-1 isolated from soil. *J Microbial World*. 2015;8(23):139-47.
11. Mendes CR, Dilarri G, Forsan CF, Sapata VdMR, Lopes PRM, de Moraes PB, et al. Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. *Sci Rep*. 2022;12(1):2658.
12. Xiu Z-m, Zhang Q-b, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJ. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Lett*. 2012;12(8):4271-5.

13. Ginjupalli K, Shaw T, Tellapragada C, Alla R, Gupta L, Perampalli NU. Does the size matter? Evaluation of effect of incorporation of silver nanoparticles of varying particle size on the antimicrobial activity and properties of irreversible hydrocolloid impression material. *Dent Mater*. 2018;34(7):e158-e65.
14. Hossain TJ. Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *Eur J Microbiol Immunol*. 2024;14(2):97-115.
15. (CLSI) CaLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard—Eleventh Edition. PA 19087 USA: CLSI; 2012. p. 58.
16. (NCCLS) C. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. Pennsylvania 19087 USA: CLSI; 1999.
17. Institute CaLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. CLSI document M07-A8 (ISBN 1-56238-689-1). 8 ed. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
18. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71-9.
19. Salam MA, Al-Amin MY, Pawar JS, Akhter N, Lucy IB. Conventional methods and future trends in antimicrobial susceptibility testing. *Saudi J Biol Sci*. 2023;30(3):103582.
20. Gonzalez-Pastor R, Carrera-Pacheco SE, Zúñiga-Miranda J, Rodríguez-Pólit C, Mayorga-Ramos A, Guamán LP, et al. Current landscape of methods to evaluate antimicrobial activity of natural extracts. *Molecules*. 2023;28(3):1068.
21. Ebrahiminezhad A, Sohrabi S, Berenjian A. Agar cell diffusion, a novel technique to evaluate antimicrobial potency of nanoparticles in the powder state. *BioNanoScience*. 2025;15(1):203.
22. Lei C, Pi M, Jiang C, Cheng B, Yu J. Synthesis of hierarchical porous zinc oxide (ZnO) microspheres with highly efficient adsorption of Congo red. *J Colloid Interface Sci*. 2017;490:242-51.
23. Qian S, Bao E, Chen H. Facile preparation of porous ZnO microflowers with large surface area. *Mater Lett*. 2023;330:133347.
24. Xu C, Wang Y, Chen H. Rapid and simple synthesis of 3D ZnO microflowers at room temperature. *Mater Lett*. 2015;158:347-50.
25. Sepulveda-Guzman S, Reesha-Jayan B, de La Rosa E, Torres-Castro A, Gonzalez-Gonzalez V, Jose-Yacaman M. Synthesis of assembled ZnO structures by precipitation method in aqueous media. *Mater Chem Phys*. 2009;115(1):172-8.
26. Jiang J, Pi J, Cai J. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. *Bioinorg Chem Appl*. 2018;2018.
27. Hajos M, Starowicz M, Brzychczyk B, Basista G, Francik S. Size distribution of zinc oxide nanoparticles depending on the temperature of electrochemical synthesis. *Materials*. 2025;18(2):458.

28. Piravar Z, Fesharaki MJ, Assar H. Comparable antibacterial effects of zinc and graphene oxide nanoparticles on urinary calculi obtained after percutaneous nephrolithotomy. J Microbial World. 2024;17(58):62-72.
29. Nisar P, Ali N, Rahman L, Ali M, Shinwari ZK. Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. 2019;24:929-41.
30. Gold K, Slay B, Knackstedt M, Gaharwar AK. Antimicrobial activity of metal and metal-oxide based nanoparticles. Advanced Therapeutics. 2018;1(3):1700033.
31. Gabrielyan L, Trchounian A. Antibacterial activities of transient metals nanoparticles and membranous mechanisms of action. World J Microbiol Biotechnol. 2019;35(10):162.