

Phycosynthesis of Antimicrobial *Ulva prolifera*-Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles

Sakineh Mashjoor, Morteza Yousefzadi

Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/11/29

Accepted: 2018/07/22

Available online: 2018/10/11

Article Subject:

Nanotechnology In Medicine

IJMM 2018; 12(3): 208-217

Corresponding author:

Morteza Yousefzadi

Department of Marine Biology,
Faculty of Marine Science and
Technology, University of
Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Tel: 09121886139

Email:

morteza110110@gmail.com

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: The growing concern about bacterial strains resistant to antibiotics reveals the urgent need to discover and develop new types of bactericidal agents. Hence, the purpose of this study is to provide a new generation of microbial nano sized compounds for medical-industrial applications.

Materials and Methods: In the present study, in a pioneering step to phycosynthesis of magnetic iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄ MNPs) with antimicrobial potency, the process was initially exploited using an aqueous extract of green marine algae *Ulva prolifera*, and further evaluated the antimicrobial activity of biosynthetic magnetite nanoparticles against eight bacterial strains and three strains of fungi.

Results: In the present study, the *U. prolifera*/Fe₃O₄-MNPs showed a strong inhibitory effect on gram-positive bacteria and relatively modest antifungal activity than fungal pathogenic agents. The highest antibacterial activity compared to strain *Staphylococcus epidermidis* (19 ± 0.6 mm) and consequently in *Bacillus subtilis* (18 ± 0.03 mm) and *Bacillus pumilis* (18 ± 0.2 mm) were observed. However, the bactericidal effects of magnetite nanoparticles were more effective than gram-positive bacteria compared to gram-negative ones. In the present study, we also observed a relatively modest antifungal activity in the anesthetized nanoparticles compared to *Saccharomyces cerevisiae* (11 ± 0.4 mm), and this was the most sensitive fungal strain relative to the fungicidal activity of these nanoparticles.

Conclusions: The results of this study indicated that biosynthetic magnetite nanoparticles can be introduced as a new antibacterial to the pharmaceutical field and medicine.

Keywords: Antimicrobial, Green seaweed, Magnetite nanoparticles, Biosynthesis

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Mashjoor S, Yousefzadi M. Phycosynthesis of Antimicrobial *Ulva prolifera*-Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles . Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (3) :208-217



تولید زیستی نانوذرات ضد میکروبی Fe_3O_4 با استفاده از *Ulva prolifera* ماکرو جلبک سبز دریایی

سکینه مشجور، مرتضی یوسفزادی

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: رشد روزافزون نگرانی‌های مطرح در ارتباط با سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها نیاز مبرم به کشف و توسعه انواع جدیدی از عوامل باکتری‌کش را آشکار می‌سازد. از این رو هدف از این تحقیق، ارائه نسل جدیدی از ترکیبات نانو ضد میکروبی برای کاربرد های پزشکی-صنعتی است.

مواد و روش کار: در تحقیق حاضر طی اقدامی پیشگام در بحث تولید زیستی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (مگنتیت) با توان ضد میکروبی، ابتدا فرآیند بیوسنتز نانوذرات با بهره‌گیری از عصاره آبی جلبک سبز دریایی *Ulva prolifera* هدف‌گیری شد و در ادامه ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مگنتیت بیوسنتز شده نسبت به ۸ سویه باکتریایی و ۳ سویه قارچ بررسی و مقایسه شد.

یافته‌ها: در تحقیق حاضر نانوذرات بیوسنتزی *U. prolifera/Fe_3O_4-MNPs* فعالیت مهاری قوی را نسبت به باکتری‌های گرم مثبت و منفی و فعالیت ضدقارچی نسبتاً متوسطی را نسبت به عوامل بیماری‌زای قارچی نشان دادند. بالاترین فعالیت ضدباکتریایی نسبت به سویه *S. epidermidis* (۱۹±۰/۶ mm) و به تبع آن در *B. subtilis* (۱۸±۰/۳ mm) و *B. pumulis* (۱۸±۰/۲ mm) مشاهده شد. با این حال اثرات باکتری‌زدایی نانوذرات مگنتیت نسبت به باکتری‌های گرم مثبت در قیاس با گرم منفی‌ها مؤثرتر بود. در تحقیق حاضر، فعالیت ضدقارچی نسبتاً متوسطی در نانوذرات بیوسنتزی نسبت به *S. cervisiae* (۱۱±۰/۴ mm) مشاهده شد و این سویه حساس‌ترین سویه قارچی نسبت به عملکرد قارچ‌کشی این نانوذرات بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نانوذرات مگنتیت بیوسنتزی را می‌توان به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌باکتریال جدید به حوزه دارو و درمان معرفی کرد.

کلمات کلیدی: ضد میکروبی، جلبک دریایی سبز، نانوذرات مگنتیت، زیست تولید

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۰۸

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۳۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۷/۱۹

موضوع:

نانو بیوتکنولوژی در پزشکی

IJMM1397;12(3): 208-217

نویسنده مسئول:

مرتضی یوسفزادی

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم

و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان،

بندرعباس، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۱۸۸۶۱۳۹

پست الکترونیک:

morteza110110@gmail.com

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

و توسعه انواع جدیدی از باکتری‌کش‌ها در حوزه‌های درمانی احساس می‌شود.

در سال‌های اخیر، به دنبال موفقیت نانوذرات نقره به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی قوی و البته با درجه سمیت بالا برای بسیاری از انواع سلول‌ها و نیز موجودات، رشد و توسعه دیگر نانوذرات در حوزه شیمی‌درمانی ضد میکروبی در کانون توجه بسیاری از دانشمندان جهان قرار گرفته است. در این میان، با توجه به ایمن بودن نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی و تأیید آنها

علی‌رغم تعداد بی‌شمار آنتی‌بیوتیک‌های موجود، عفونت‌های باکتریایی هنوز علت اصلی بسیاری از امراض و مرگ‌ومیر در دنیا محسوب می‌شوند. در حال حاضر سوء مصرف و استفاده بی‌رویه و ناصحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان‌های کلینیکی منجر به شکل‌گیری و توسعه سریع انواع مختلفی از سویه‌های میکروبی بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها شده است که به یک تهدید جدی برای سلامت انسان بدل شده‌اند و شدت بیماری‌زایی آنها نسبت به گذشته افزایش یافته است. از این‌رو، نیاز شدیدی به رشد

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه جلبک و جداسازی عصاره جلبکی

به منظور فرآیند زیست تولید جلبکی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی از ماکرو جلبک سبزدریایی (*U. prolifera*; Chlorophyceae)، این جلبک دریایی به صورت دستی از آب‌های ساحلی شمالی خلیج فارس (سواحل بندرعباس) جمع‌آوری و بنا بر شاخصه‌های تاکسونومیک شناسایی و تأیید شد. پس از شست‌وشو و خشک‌کردن نمونه‌های جمع‌آوری شده در سایه، عصاره آبی از این جلبک سبز فراهم آمد. به منظور تهیه عصاره آبی، میزان ۱۰ گرم از جلبک در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس جوشانده شد. عصاره‌های آبی این جلبک‌ها پس از جوشانده شدن سرد شده و با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد. عصاره تهیه شده برای استفاده‌های بعدی در یخچال و تحت شرایط تاریک نگهداری گشت.

احیای زیستی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی احیای زیستی نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی بیوسنتزی با استفاده از ۳۰ mL از عصاره آبی جلبک سبز (*U. prolifera*)، ۱۰۰ mL از محلول ۰/۱ مولار کلرید آهن فرو/فروس و محلول سود یک مولار (قطره‌قطره تا زمانی که احیای نانوذرات سیاه رنگ مگنتیت در محلول نمایان شود)، به واسطه تغییر رنگ محلول از نارنجی به سمت سیاه‌رنگ انجام پذیرفت. لازم به توضیح است برای تهیه کلرید آهن فرو/فروس ۱/۰۶ گرم از $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ به همراه ۲/۲۲ گرم از $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ با نسبت مولی ۱:۲ در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده و تا دمای ۸۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه با قرارگیری روی یک هم زن مغناطیسی گرمادهی شد. رسوب سیاه‌رنگ نانوذرات مگنتیت پس از چندین بار شست‌وشو با آب مقطر استریل و اتانول و خشک‌شدن در دمای ۹۰ درجه سلسیوس تخلیص شد. در ادامه خصوصیات فیزیکوشیمیایی نظیر توزیع ذرات، اندازه و جنس نانوذرات و طبیعت کریستاله آنها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission electron microscopy; TEM، FEI، آمریکا) و آنالیز پراش اشعه X (X-ray powder diffraction; XRD، Panalytical، هلند) سنجش شد (شکل ۱).

عوامل میکروبی مورد بررسی

در این پژوهش به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مگنتیت بیوسنتزی جدا شده از جلبک سبز از ۸ سویه باکتریایی و ۳ سویه قارچی استفاده شد که عبارت‌اند از: سویه‌های

برای مصرف در حوزه سلامت و پزشکی (۱-۳)، این نانوذرات می‌توانند بهترین گزینه برای جایگزینی با نانوذرات نقره باشند. در یک دهه اخیر، مشخص شده است که علاوه بر نانوذرات نقره، دیگر نانوذرات از قبیل نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (Magnetic nanoparticles (MgNPs or MNPs) (مگنتیت: Fe_3O_4 -MgNPs یا Fe_3O_4 -MgNPs) نیز، واجد پتانسیل عملکرد ضد میکروبی مشابه نانونقره بوده و می‌توانند برای درمان بیماری‌ها و ساخت تجهیزات پزشکی معرفی شوند. با این حال، تعداد مطالعات گزارش شده در این حوزه بسیار اندک بوده است (۴،۵) و همین تعداد محدود نیز عمدتاً مبتنی بر نانوذرات اکسید آهن شیمیوسنتزی بوده‌اند. به علاوه، یکی از مهم‌ترین کاربردهای نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی به عنوان نانوذرات فلزی با درجه اهمیت مصرفی بالا، کاربری بسیار وسیع آنها در حوزه زیست پزشکی نظیر: هدف‌گیری دارو، انتقال دارو (۶)، تصویربرداری سلولی (۷)، برچسب‌زنی سلول‌ها، بافت‌ها (۸) و بیوسنسورها (۹) است. با این وجود، بین مطالعات روز دنیا، تعداد بسیار اندکی به ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات بیوسنتزی اکسید آهن مغناطیسی Bio- Fe_3O_4 -MgNPs پرداخته‌اند (۱۰،۱۱). از این رو، نیاز مبرم و شایان توجهی به رشد و توسعه نانوذرات زیست‌سازگار و سنتز شده به شیوه سبز، ایمن و پاک در حوزه نانوزیست فناوری پزشکی دارویی احساس می‌شود؛ زیرا سنتز سبز یا تولید زیستی نانوذرات علی‌رغم حفظ اثرات کینتیکی و خواص نانویی آنها می‌تواند کاهش تأثیرات سمیت، آلرژی‌زایی و تحریک‌پذیری را در سیستم‌های زیستی در پی داشته باشد (۱۲). تاکنون مطالعات بسیاری به خواص ضد میکروبی جلبک‌های دریایی به ویژه جلبک‌های سبز از جنس *Ulva* اذعان کرده‌اند، به نحوی که، عصاره‌های آبی (۱۳)، متانولی (۱۴)، اتیل استانی (۱۴) و نیز نانوذرات بیوسنتز شده نقره از طریق این گروه از جلبک‌ها (۱۳) خواص ضد میکروبی قوی‌ای را به نمایش گذاشته بودند. لذا، این فرض محتمل بود که بهره‌گیری از این گروه از جلبک‌های سبز در تولید زیستی نانوذرات اکسید آهن بتواند توان ضد میکروبی بالایی را به نمایش بگذارد. در این راستا، در تحقیق حاضر و طی اقدامی پیشگام در بحث تولید نانومگنتیت بیوسنتزی با توان ضد میکروبی، ابتدا فرآیند بیوسنتز نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی با بهره‌گیری از عصاره آبی جلبک سبز دریایی *Ulva prolifera* هدف‌گیری شد و در ادامه ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مگنتیت بیوسنتز شده نسبت به ۸ سویه باکتریایی و ۳ سویه قارچ بررسی و مقایسه شد.

نانوذرات زیست سنتز شده (*U. prolifera*/Fe₃O₄-MNPs)، به روشنی نشان می‌دهد که اکثریت نانوذرات بیوسنتزی واجد شکل کریستالی کروی - مکعبی (Cubo-spherical) هستند (شکل ۱ب). نتایج آنالیز و بررسی ساختار کریستالوگرافیک و تشخیص فازی نانوذرات مگنتیت بیوسنتزی از طریق دستگاه پراش اشعه ایکس در شکل ۱ج، نشان داده شده است. برپایه الگوی طیفی XRD مربوط به *U. prolifera*/Fe₃O₄-MNPs زاویای پراش ۲θ در ۳۰/۲۲°، ۳۱/۷۳°، ۳۵/۵۷°، ۴۳/۱۹°، ۴۵/۴۷°، ۵۳/۷۹°، ۵۶/۴۴°، ۵۷/۰۴°، ۶۲/۷۲°، ۷۴/۱۹°، ۷۵/۲۸° به ترتیب مربوط به پیک‌های صفحات کریستالی مگنتیت در ۲۲۰، ۲۲۰، ۳۱۱، ۵۲۰، ۴۰۰، ۱۷۳، ۲۰۰، ۴۴۰، ۵۱۱، ۵۱۲ و ۱۴۶ است. بر این اساس میانگین اندازه کریستالیت (d) نانوذره بیوسنتزی بر مبنای فرمول محاسباتی Debye-Scherrer ($D = K \lambda / \beta \cos \theta$) برابر با $1/5 \pm 10/2$ نانومتر است. بر مبنای نتایج ارائه شده، ساختار فازی کریستالی Bio-Fe₃O₄-MNPs نشان می‌دهد که حضور برخی پیک‌های غیرمعمول در الگوی XRD نشانی از احتمال کریستالیزه شدن فازهای بیوارگانیک موجود در عصاره آبی جلبک سبز است.

در تحقیق حاضر، نانوذرات *U. prolifera*/Fe₃O₄-MNPst فعالیت مهارکنندگی قوی را نسبت به برخی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی و نیز فعالیت مهارکنندگی نسبتاً متوسطی را نسبت به برخی از عوامل قارچی نشان دادند. مطالعات نشان داد که به استثنای سویه‌های باکتریایی مقاومی چون *P. aeruginosa*، *K. pneumoniae* و تاحدی *E. faecalis* و نیز سویه‌های قارچی مقاوم نظیر: *C. albicans* و *A. niger* که هیچ نوع هاله رشدنیافتگی را به نمایش نگذازدند (جدول ۱)، بقیه نمونه‌ها به نانوذرات تولید شده حساس هستند. نتایج ارائه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد که نانوذرات مگنتیت بیوسنتزی بالاترین فعالیت ضدباکتریایی را علیه سویه *S. epidermidis* ($19 \pm 0/6$ mm) و *B. subtilis* ($18 \pm 0/3$ mm) می‌دهد که اثرات ضدباکتریایی نانوذرات مگنتیت علیه باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی‌ها مؤثرتر بوده است (جدول ۱). همچنین فقط فعالیت مهارکنندگی نسبتاً متوسطی از طریق نانوذرات بیوسنتزی علیه *S. cerevisiae* مشاهده شد (جدول ۱).

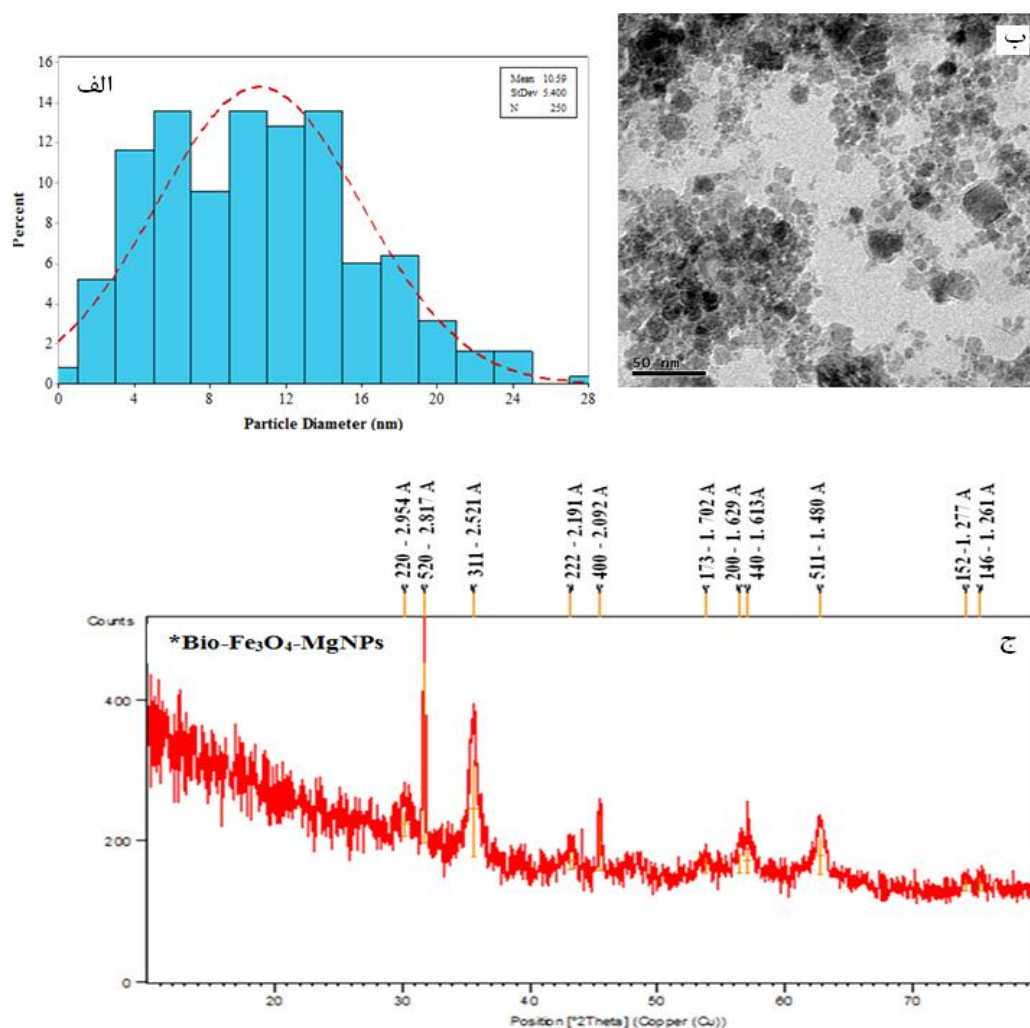
باکتریایی (*Bacillus subtilis* (ATCC 465), *B. pumulis* (PTCC 1274), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29737), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 85327) و ۳ سویه قارچی: *Aspergillus niger* (ATCC 16404), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763). تمام سویه‌ها از انستیتوپاستور ایران (تهران) تهیه و در محیط مولر هیلتون آگار تحت دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذره

در تحقیق حاضر، برای بررسی فعالیت ضد میکروبی نانوذرات Bio-Fe₃O₄-MNPs از روش انتشار دیسک استفاده شد (۱۵). برای این منظور از هر میکروارگانیزم کشت مایع شبانه در محیط مولر هیلتون تهیه شد و در ادامه از این کشت رقتی معادل نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/10$ CFU/ml) تهیه شد (۱۶) و ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده باکتریایی و قارچی به ترتیب بر محیط کشت جامد مولر هیلتون و سابورود دکستروز آگار کشت داده شدند. سپس روی پلیت‌ها فیلترهای کاغذی واتمن به قطر ۶ میلی‌متر قرار گرفت و ۱۰ ماکرولیتر از محلول نانوذره با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به آنها تلقیح شد. برای کنترل منفی هم دیسک‌ها به آب مقطر آغشته شدند و برای کنترل مثبت نیز دیسک آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد شامل ۱۰ میلی‌گرم در دیسک از آمپی‌سیلین و ۳۰ میلی‌گرم در دیسک از نیستاتین استفاده شد. پلیت‌ها به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای باکتری و دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت برای قارچ‌های مخمری و ۴۸ تا ۷۲ ساعت برای قارچ رشته‌ای انکوبه شدند (۱۷). سپس میانگین قطر هاله رشدنیافتگی در هر پلیت بر حسب میلی‌متر اندازه گیری شد. آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

یافته‌ها

محاسبه میانگین اندازه ذرات نانویی تولید شده بر مبنای تصویر TEM و اندازه‌گیری بیش از ۱۰۰ عدد از ذرات به صورت تصادفی نشان می‌دهد که میانگین قطر نانوذرات Bio-Fe₃O₄-MNPs برابر ۹/۹۵ نانومتر است (شکل ۱ الف). تصویر TEM



شکل ۱. نمودار پراکنش و فراوانی اندازه نانوذرات (الف)، تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) (ب) و الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) (ج)، از نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی بیوسنتزی (*Ulva prolifera*-Fe₃O₄).

جدول ۱. فعالیت ضد میکروبی نانوذرات بیوسنتزی *U. prolifera*-Fe₃O₄-MgNPs در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های استاندارد در شرایط *in vitro*

میکروارگانیزم	گرم +/-	Bio-Fe ₃ O ₄ -MgNPs	Ampicillin	Nystatine
<i>B. subtilis</i>	+	۱۸ ± ۰/۲	۱۴ ± ۰/۴	Nt
<i>B. pumulis</i>	+	۱۸ ± ۰/۳	۱۳ ± ۰/۳	Nt
<i>E. faecalis</i>	+	۱۰ ± ۰/۵	۱۱ ± ۰/۳	Nt
<i>S. aureus</i>	+	۱۶ ± ۰/۲	۱۳ ± ۰/۳	Nt
<i>S. epidermidis</i>	+	۱۹ ± ۰/۶	۱۹ ± ۰/۵	Nt
<i>E. coli</i>	-	۱۴ ± ۰/۲	۱۲ ± ۰/۲	Nt
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	Nt
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	۱۰ ± ۰/۳	Nt
<i>A. niger</i>	Nt	-	Nt	۱۶ ± ۰/۴
<i>C. albicans</i>	Nt	-	Nt	۱۸ ± ۰/۵
<i>S. cerevisiae</i>	Nt	۱۱ ± ۰/۴	Nt	۱۸ ± ۰/۲

نتایج قطر هاله رشدنیافتگی به صورت میانگین ± انحراف معیار و در سه تکرار ارائه شده است. غیرفعال (-)، سنجش نشده (Nt)، فعالیت ضعیف (< 7 mm) فعالیت متوسط (7-14 mm)، فعالیت بالا (> 14 mm) (۲۰). قطر هاله رشدنیافتگی، مشتمل بر طول دیسک (۶ میلی‌متر) نیز است.

بحث

در دهه‌های اخیر، نانو فناوری یکی از سریع‌ترین بخش‌های اقتصاد در کشورهای پیشرفته بوده است و محصولات این صنعت در سال‌های اخیر رشد و توسعه بسیار شگرفی داشته‌اند؛ به نحوی که در حال حاضر بخش تفکیک‌ناپذیری از حوزه‌های پزشکی - دارویی، زیست‌فناوری، فرآیندهای مواد و انرژی و محیط‌زیست شده است.

بیوسنتز نانوذرات فلزی نظیر نانوذرات آهن Fe_3O_4 -MNPs تا حدودی بسیار متفاوت از دیگر نانوفلزات بی‌اثر و پایداری نظیر Ag-NPs و Au-NPs است که می‌توان آنها را به سهولت از طریق عصاره‌های گیاهی احیا کرد؛ زیرا آهن متالیک در سایز نانو واجد خصوصیات مهمی چون سایز ذره‌ای کوچک، مساحت سطحی ویژه بزرگ و واکنش‌پذیری سطحی بسیار بالا است و این نانوذرات می‌توانند ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از ذرات میکروسایزی و یا دانه‌ای واکنش‌پذیر باشند. از این رو، فرآیند بیوسنتز نانوذرات پایدار اکسید آهن با استفاده از عصاره‌های گیاهی تا حدودی بسیار پیچیده است. در میان مطالعات انجام‌شده، گزارش‌های بسیار اندکی از به‌کارگیری جلبک‌های دریایی به منظور زیست‌ساخت سبز نانوذرات مگنتیت (Fe_3O_4 -MNPs) موجود است (۱۸، ۱۹). علی‌رغم موارد اشاره‌شده، تاکنون گزارشی از بیوسنتز نانوذرات مگنتیت Fe_3O_4 -MNPs با استفاده از عصاره آبی ماکرو جلبک دریایی سبز در سطح جهان منتشر نشده است.

در ارزیابی پتانسیل فعالیت ضد میکروبی نانوذرات بیوسنتزی مگنتیت، به طبقه‌بندی توصیه‌شده از سوی Baron و Finegold استناد شد (۲۰). بنابر توصیه این پژوهشگران، چنانچه میانگین قطر هاله رشدنیافتگی عامل ضد میکروبی، کمتر از ۷ میلی‌متر باشد، فعالیت ضد میکروبی آن ضعیف تلقی شده و اگر قطر هاله بین ۷ تا ۱۴ میلی‌متر باشد، فعالیت مذکور متوسط بوده و در صورت بیشتر از ۱۴ میلی‌متر بودن قطر هاله رشدنیافتگی، عامل ضد میکروبی، واجد فعالیت ضد میکروبی قوی شناخته می‌شود. از این رو، با توجه به نتایج ارائه‌شده در جدول ۱، فعالیت ضد میکروبی قوی علیه برخی از باکتری‌ها و فعالیت ضدقارچی نسبتاً متوسطی علیه قارچ *S. cerevisiae* در نانوذرات بیوسنتزی مگنتیت مشاهده شد؛ زیرا به‌واسطه برهم‌کنش و جذب الکترواستاتیک عامل بیماری‌زای میکروبی (باکتری یا قارچ) به نانوذرات مگنتیت با بار سطحی مثبت و توان تخریبی نانوذرات Bio- Fe_3O_4 -MNPs در القای گسست دیواره میکروبی، توازن بار الکتریکی سطحی و تمامیت غشای میکروبی برهم خورده و این گسست دیواره سلولی

به مرگ عامل بیماری‌زایی می‌انجامد. این امر بیشتر متأثر از ویژگی‌های نانوذره‌ای و مغناطیس‌پذیری آنها در جذب بارهای الکتریکی بوده است و تا حدی نیز می‌تواند ناشی از فعالیت کاتالیکی و کاهش مساحت سطحی و نسبت سطح به حجم بسیار بالای ذرات در حالت نانویی باشد (۲۱). در این میان بالاترین فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات مگنتیت بیوسنتزی، علیه *S. epidermidis* مشاهده شد که یکی از معروف‌ترین سویه‌های بیماری‌زای گرم مثبت است و بر پایه مطالعات زیست‌پزشکی به‌عنوان اصلی‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده است (۲۲). با این وجود، اثرات باکتری‌کشی این بیونانوذرات نسبت به باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی‌ها مؤثرتر بوده است. از طرفی قطر هاله رشدنیافتگی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، محدوده‌ای از ۱۲ تا ۱۹ میلی‌متر و در مورد عامل ضدقارچی نیستاتین ۱۶ تا ۱۸ میلی‌متر بود. با این حال، نانوذره بیوسنتزی نانوذرات اکسید آهن توانسته است اثرات باکتری‌کشی بالاتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد در برخی سویه‌ها نشان دهد (جدول ۱). در میان مطالعات گزارش‌شده، تحقیقات بسیار اندکی اثرات ضدباکتریایی نانوذرات Fe_3O_4 -MNPs را ارزیابی کرده‌اند (۲۳، ۲۴، ۲۵، ۲۶). با این حال، تاکنون گزارشی از اثرات ضدباکتریایی نانوذرات مگنتیت بیوسنتز شده از جلبک‌های سبز منتشر نشده است و نتایج ضدباکتری ارائه‌شده در تحقیق حاضر، حتی نسبت به نانوذرات مگنتیت شیمیوسنتزی گزارش‌شده در مطالعات پیشین نیز، بسیار مؤثرتر و بالاتر بوده است.

در میان اندک مطالعات گزارش‌شده در این حوزه، می‌توان به پژوهش Senthil و Ramesh (۲۵) اشاره کرد که نانوذرات مگنتیت را با استفاده از عصاره آبی برگ گیاه گلدار *Tridax procumbens* بیوسنتز کرده و برخلاف تحقیق حاضر، این نانوذرات اثرات ضدباکتری مؤثری را علیه باکتری *P. aeruginosa* نشان داده‌اند. Santoshi و همکاران (۲۶) نیز، فعالیت ضدباکتریایی قوی‌ای را علیه باکتری‌های گرم مثبت *S. E. coli*، *B. subtilis*، *S. aureus* و *S. aureus* از طریق نانوذرات مگنتیت بیوسنتز شده از گیاه *Desmodium gangeticum* گزارش کردند. در تحقیق حاضر، فعالیت ضد میکروبی نانوذرات مگنتیت بیوسنتز شده از عصاره جلبک می‌تواند، تا حد زیادی ناشی از اندازه بسیار ریز ذرات (۹/۹۵ نانومتر) (۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰)، خصوصیات فیزیکوشیمیایی ارائه‌شده و نیز نرخ رهایش احتمالی یون‌های آهن از طریق این نانوذرات باشد. به علاوه، برخی دیگر از عوامل چون غلظت نانوذرات مگنتیت (۳۰، ۲۹، ۲۸) که در اینجا معادل ۰/۱ mg/disc بوده، نوع و طبیعت

می‌کنند که جریان الکترونی تولید شده را در زنجیره‌های تنفسی برهم زده و باعث تولید فعال ROS، طی فرآیندهای مختلف می‌شوند. افزایش نرخ تولید ROS، از جمله نشانگرهای زیستی در فرآیندهای متابولیک واکنش با NPs با باکتری‌ها و دیگر عوامل بیماری‌زا است؛ زیرا این رادیکال‌های فعال ROS، به‌واسطهٔ پراکسیداسیون لیپیدها و بروز تغییرات در غشا و افزایش قابلیت نفوذپذیری آن نسبت به ورود نانوذرات به درون سلول، ایجاد گسست در مسیر انتقال یون، القای تغییرات ساختاری در پروتئین‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ایجاد شکست در مولکول DNA، نهایتاً به آپوپتوزیس و مرگ سلولی عامل بیماری‌زا منتهی می‌شوند (۳۴). از این‌رو، افزایش نرخ مرگ‌ومیر باکتری‌ها و قارچ‌ها طی مجاورت با نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی می‌تواند، ناشی از تولید ROS و بروز اثرات استرس اکسیداتیو نیز باشد. حتی در ارتباط با اثرات ضد میکروبی قوی Ag-NPs، نیز پژوهشگران این تأثیرات را ناشی از اندازهٔ ذره و شکل آن دانسته و وجود یک طرح مشبک - مثلث کریستالی را در نانوذرات نقره بر فعالیت ضد میکروبی (Biocidal) آنها بر بیوفیلم‌های میکروبی، بسیار اثرگذار می‌دانند؛ زیرا می‌تواند پارگی غشای باکتریایی را در پی داشته باشد (۳۴) و به نظر می‌رسد این امر دربارهٔ نانوذرات کروی - مکعبی اکسید آهن مغناطیسی نیز قابل تعمیم باشد.

با این حال، در پژوهش حاضر سویه‌هایی چون *P. aeruginosa*، *K. pneumoniae* و *E. faecalis* جزو سویه‌های مقاوم به اثرات ضدباکتریایی نانومگنتیت شناسایی شدند. مقاومت در این باکتری‌ها، معمولاً به ویژگی‌های ذاتی و اکتسابی آنها باز می‌گردد، وجود ژن‌های مقاوم به چندین نوع دارو (Multidrug Resistance) که در طول تکامل نیز حفاظت شده‌اند، از جمله خصوصیات ذاتی این سویه‌ها بوده و وقوع جهش در برخی ژن‌ها و ایجاد سویهٔ مقاوم و قرارگیری این ژن‌ها در پلاسمیدها و انتقال آن به دیگر نسل‌ها از طریق همیوگی از جمله خصوصیات اکتسابی آنها در بحث مقاومت دارویی است (۳۵). اما در ارتباط با نانوذرات مکانیسم عمل مقاومت باکتریایی کاملاً متفاوت بوده و بر مبنای جدیدترین پژوهش‌های منتشر شده از سوی تیم تحقیقاتی Panacek (۳۶) مشخص شد که باکتری‌های گرم منفی و سویه‌های مقاومی چون *E. coli* و *P. aeruginosa* روش‌های پیشرفته‌ای برای مقاومت نسبت به نانوذرات ارائه می‌دهند که عمدتاً ناشی از تولید پروتئین فلاژلین (Flagellin) شلاق‌گونهٔ چسبنده‌ای است که رهایش آن از طرف باکتری به سمت نانوذرات به‌دام‌اندازی و تجمع و آگلومره شدن نانوذرات را در پی خواهد

عوامل پوششی بیوسنتزی (گروه‌های عاملی فیکوشیمیایی) (۱۰،۱۲) و نیز روش ساخت نانوذره Fe₃O₄-MNPs که در مطالعهٔ حاضر مورد استفاده قرار گرفته است نیز می‌تواند در این زمینه تأثیرگذار باشد.

در ارزیابی اثرات ضدقارچی نانوذرات بیوسنتزی مگنتیت، فعالیت مهاری متوسطی مشاهده شد و دوسویهٔ قارچی *C. albicans* و *A. niger*، نسبت به این نانوذرات مقاوم بودند. اساساً مقاومت قارچ‌ها نسبت به عوامل ضدقارچی، مبتنی بر سه مکانیسم ۱. کاهش نرخ تجمع درون سلولی دارو (ترکیب مورد سنجش) به‌واسطهٔ عملکرد پمپ‌های غشایی برای خروج دارو ۲. کاهش تشکیل اجتماعات مورد هدف توسط دارو ۳. عملکرد متقابل و پادگشتی نسبت به اثرات دارو است. گزینش این مکانیسم‌ها از طریق قارچ‌های مقاوم، بسته به سویهٔ قارچ و قدرت ضدقارچی ترکیب سنجشی متفاوت است (۳۰). احتمال بهره‌گیری قارچ‌ها از مکانیسم ۳ و ۲ برای مقابله با اثرات مهاری نانوذرات نسبت به مکانیسم اول محتمل‌تر است؛ زیرا تنظیم ورود و خروج نانوذرات به سلول، عمدتاً از مسیرهای اندوسیتوزی بوده (۳۱) و وابسته به عملکرد پمپ‌های غشایی نیست.

مکانیسم احتمالی فعالیت باکتری‌کشی و قارچ‌کشی نانوذرات مگنتیت بیوسنتزی می‌تواند، متأثر از ایجاد یک قابلیت جذب الکترواستاتیک بین نانوذرات مگنتیت (بار مثبت) و میکروب بیماری‌زا (بار منفی) باشد (۵). این برهم‌کنش در ادامه، منجر به اکسیداسیون غشای باکتری بر پایهٔ آزادسازی یون‌های آهن از طریق نانوذره که قادر به کنش با گروه‌های تیولی پروتئین‌های غشایی بوده، می‌شود. این امر پتانسیل نانوذرات را برای ایجاد واکنش‌های استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، افزایش می‌دهد. در نهایت کل این فرایند سبب برهم‌زدن عملکرد و کارایی نفوذپذیری و تنفس غشایی غشاء سلول شده و در نهایت منجر به تجزیهٔ سلول و مرگ میکروارگانیسم می‌شود (۲۷، ۳۳-۳۲). اساساً نقش اندازهٔ ذره در میزان نفوذ و انتشار آن به سیستم‌های زیستی بسیار تعیین‌کننده است؛ زیرا ورود نانوذرات به درون سلول، معمولاً از خلال غشای سلولی، توسط فرآیند انتشار ساده و یا به‌واسطهٔ پورین‌ها و یا پروتئین‌های دیوارهٔ سلولی صورت می‌پذیرد. همان‌طور که اشاره شد ناپایداری غشای خارجی نیز ممکن است، از طریق برخی از انواع برهم‌کنش‌ها به‌واسطهٔ پروتئین‌هایی که واجد گروه‌های تیول‌اند و یا طی یک برهم‌کنش الکترواستاتیک با شکل هندسی نانوذرات، ایجاد شود (۳۴) که هر دو پدیده یک تداخلی را در گرادیان الکتروشیمیایی غشا ایجاد

پاک و نیز چشم‌اندازی نویدبخش را پیش‌روی حوزه سلامت، پزشکی و دارودرمانی بازگشاید.

سیاسگزاری

نویسندگان از تمامی کسانی که آنها را در انجام این پژوهش یاری کرده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

داشت و مانع از اثرات اکسایشی سطحی آنها می‌شود. به گفته این پژوهشگران، این نوع از مقاومت ضدباکتریایی هیچ نوع ارتباطی با ژنتیک سویه نداشته و فقط وابسته به تغییرات فنوتیپی سطحی سلول، به‌منظور تثبیت کلونیدی نانوذرات و حذف آنها است (۳۶). در پایان و براساس نتایج به‌دست‌آمده می‌توان اذعان کرد که رویکرد قدرتمند سنتز سبز نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی با استفاده از جلبک سبز دریایی و تولید نانوذرات مگنتیت بیوسنتزی *U. prolifera* /Fe₃O₄-MNPs، توانسته منجر به تولید نانوذراتی با توان ضد میکروبی بالا شود و این امر می‌تواند، راهکاری ایمن و

References

1. Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano and micrometer size. *Toxicol Lett* 2009;188(2):112-8. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.03.014> PMID:19446243
2. Kunzmann A, Andersson B, Vogt C, Feliu N, Ye F, Gabriellsson S, Toprak MS, Buerki-Thurnherr T, Laurent S, Vahter M, Krug H, Muhammed M, Scheynius A, Fadeel B. Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;253(2):81-93. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.03.011> PMID:21435349
3. Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2006;41(12):2699-711. <https://doi.org/10.1080/10934520600966177> PMID:17114101
4. Behera SS, Patra JK, Pramanik K, Panda N, Thatoi H. Characterization and evaluation of antibacterial activities of chemically synthesized iron oxide nanoparticles. *World J Nano Sci. Engineer* 2012;2(4):196-200. <https://doi.org/10.4236/wjnse.2012.24026>
5. Prabhu YT, Rao KV, Kumari BS, Sai Kumar VS, Pavani T. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and its antibacterial application. *Int Nano Lett*. 2015;5(2):85-92. <https://doi.org/10.1007/s40089-015-0141-z>
6. Sunderland CJ, Steiert M, Talmadge JE, Derfus AM, Barry SE. Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer. *Drug Dev Res*. 2006;67(1):70-93. <https://doi.org/10.1002/ddr.20069>
7. Bulte JW, Douglas T, Witwer B, Zhang SC, Strable E, Lewis BK, Zywicke H, Miller B, van Gelderen P, Moskowitz BM, Duncan ID, Frank JA. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol*. 2001;19(12):1141-7. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1141> PMID:11731783
8. Zhang C, Liu T, Gao J, Su Y, Shi C. Recent development and application of magnetic nanoparticles for cell labeling and imaging. *Mini Rev Med Chem*. 2010;10(3):193-202. <https://doi.org/10.2174/138955710791185073> PMID:20408802
9. Laurent S, Dutz S, Hafeli UO, Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2011;166(1-2):8-23. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.04.003> PMID:21601820
10. Senthil M, Ramesh C. Biogenic synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles using *Tridax procumbens* leaf extract and its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa*. *Dig J Nanomater Biostruct*. 2012;7(3):1655-60. http://www.chalcogen.ro/1655_Senthil.pdf
11. Santoshi V, Banu AS, Kurian GA. Synthesis, characterization and biological evaluation of iron oxide nanoparticles prepared by *Desmodium gangeticum* root aqueous extract. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2015;7(1):75-80. <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/3997/6782>
12. Das RK, Brar SK, Verma M. Checking the biocompatibility of plant-derived metallic nanoparticles: molecular perspectives. *Trends Biotechnol*. 2016;34(6):440-9. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.005> PMID:26948438

13. Yousefzadi M, Rahimi Z, Ghafori V. The green synthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga *Enteromorpha flexuosa* (wulfen) J. Agardh. *Mater Lett* 2014, 3137: 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.08.110>
14. Mashjor S, Yousefzadi M, Esmaili MA, Rafiee R. Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine macroalgae (Dictyotaceae and Ulvaceae) from the Persian Gulf. *Cytotechnology* 2016. 68(5):1717-26. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9921-6> PMID: [PMC5023545](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25023545/)
15. Van der Berghe DA Vlietinck AJ. Screening methods for antibacterial agents from higher plants In: Dey PM, Harborne JB, Hostettman, K. (Eds), *Methods in plant biochemistry: Assay for bioactivity*. Vol 6. London: Academic Press; 1991. p. 47-69.
16. Lennette HE, Balows A, Hausler JW, Shadomy HJ. *Manual de microbiologia clinica*. 4nd ed. Argentina: Medica Panamericana; 1987. p. 336-1245.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Wayne, PA: Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.
18. El-Kassas HY, Aly-Eldeen MA, Gharib SM. Green synthesis of iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles using two selected brown seaweeds: Characterization and application for lead bioremediation. *Acta Oceanol Sin*. 2016;35(8):89-98. <https://doi.org/10.1007/s13131-016-0880-3>
19. Yew YP, Shameli K, Miyake M, Kuwano N, Khairudin NBBA, Mohamad SEB, et al. Green synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles using seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) extract. *Nanoscale Res Lett*. 2016;11(1):276. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1498-2> PMID: [27251326](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27251326/) PMID: [PMC4889538](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4889538/)
20. Baron JE, Finegold SM. Method for testing antimicrobial effectiveness. In: Mosby CV (ed), *Bailey Scotts Diagnostic Microbiology*. Missouri; 1990:171-194.
21. Ates M, Daniels J, Arslan Z, Farah OI. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. *Environ Monit Assess*. 2013;185(4):3339-48. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2794-7> PMID: [22810381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22810381/) PMID: [PMC3491177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3491177/)
22. Widerstrom M. Significance of *Staphylococcus epidermidis* in health care-associated infections, from contaminant to clinically relevant pathogen: this is a wake-up Call! *J Clin Microbiol*. 2016;54(7):1679-81. <https://doi.org/10.1128/JCM.00743-16> PMID: [27170016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27170016/) PMID: [PMC4922076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4922076/)
23. Nehra P, Chauhan RP, Garg N, Verma K. Antibacterial and antifungal activity of chitosan coated iron oxide nanoparticles. *Br J Biomed Sci*. 2018;75(1):13-8. <https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1347362> PMID: [28945174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28945174/)
24. Manyasree D, Kiranmayi P, Ravi Kumar VSSN. Synthesis, characterization and anti bacterial activity of iron oxide nanoparticles. *Indo American J Pharm Res*. 2016;6(7):5992-7.
25. Senthil M, Ramesh C. Biogenic synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles using *Tridax procumbens* leaf extract and its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa*. *Dig J Nanomater Biostruct*. 2012;7(3):1655-60.
26. Santoshi V, Banu AS, Kurian GA. Synthesis, characterization and biological evaluation of iron oxide nanoparticles prepared by *Desmodium gangeticum* root aqueous extract. *Int J Pharm Pharmaceut Sci*. 2015;7(1):75-80. <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/3997>
27. Lee C, Kim JY, Lee WI, Nelson KL, Yoon J, Sedlak DL. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli*. *Environ Sci Technol*. 2008;42(13):4927-33. <https://doi.org/10.1021/es800408u> PMID: [18678028](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18678028/) PMID: [PMC2536719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2536719/)
28. Tran N, Mir A, Mallik D, Sinha A, Nayar S, Webster TJ. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:277-83. <https://doi.org/10.2147/IJN.S9220> PMID: [20463943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20463943/) PMID: [PMC2865022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2865022/)
29. Taylor EN, Webster TJ. The use of superparamagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm. *Int J Nanomedicine*. 2009;4(1):145-52. <https://doi.org/10.2147/IJN.S5976> PMID: [19774113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19774113/) PMID: [PMC2747349](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2747349/)
30. Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed Res Int*. 2013;2013:204237. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/204237> PMID: [23878798](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23878798/) PMID: [PMC3708393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3708393/)
31. Ivanov A. Pharmacological Inhibition of Endocytic Pathways: Is It Specific Enough to Be Useful? *Methods Mol Biol*. 2008;440:15-33. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-178-9_2 PMID: [18369934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18369934/)
32. Mahdy SA, Raheed QJ, Kalaihelvan PT. Antimicrobial activity of zero-valent iron nanoparticles. *Int J Mod Eng Res*. 2012;2(1):578-81. <https://pdfs.semanticscholar.org/0f98/a289177a29b0f9c2b94e3f91d960c8973815.pdf>

33. Zhang H, Chen G. Potent antibacterial activities of Ag/TiO₂ nanocomposite powders synthesized by a one-pot sol-gel method. *Environ Sci Technol*. 2009;43(8):2905-10. <https://doi.org/10.1021/es803450f> PMID:19475969
34. Lapresta-Fernández A, Fernández A, Blasco J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends Anal Chem*. 2012;32:40-59. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.09.007>
35. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*. 2004;10(S12):S122-9. <https://doi.org/10.1038/nm1145> PMID:15577930
36. Panacek A, Kvitek, L, Smekalova M, Vecerova R, Kolar M, Roderova M, Dycka F, Sebel M, Pucek R, Tomanec O, Zboril R. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat Nanotechnol*. 2017;13(1):65-71. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y> PMID:29203912