

بررسی خاصیت ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره در پلی استایرن‌های انبساطی دیرسوز و استاندارد

یونس کوبکی، حسین امانی*⁺

بابل، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی

حسن کریمی‌نژاد

بابل، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده علوم پایه، گروه فیزیک

چکیده: در این پژوهش، ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوکامپوزیت‌های نقره - پلی استایرن انبساطی دیرسوز و استاندارد بررسی شد. برای ساخت نانوکامپوزیت‌های نقره - پلی استایرن از روش حل کردن پلیمر در حلال و اختلاط پلیمر و نانوذره‌ها استفاده شد. در این روش برای هر دو نمونه نانوکامپوزیت پلیمری، محلول‌های ژله ای زرد رنگ شامل نانوذره‌های نقره در پلی استایرن با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۳۷/۵ میکروگرم بر سانتی متر مکعب ساخته شد. تصاویرهای میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) و الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) نشان دادند که اندازه نانوذره‌های نقره به کار رفته حدود ۲۰ nm می‌باشد. همچنین برای بررسی چگونگی توزیع نانوذره‌های نقره، مورفولوژی سطح مقطع نمونه‌های نانوکامپوزیت نقره - پلی استایرن به وسیله تصاویرهای SEM مورد مطالعه قرار گرفتند. در ادامه خاصیت ضد باکتریایی این ورق‌های نانوکامپوزیت پلیمری بر باکتری‌های *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 به روش انتشار دیسک اصلاح شده بررسی شد. مقایسه نتیجه‌ها نشان داد که نانوکامپوزیت تهیه شده از پلی استایرن انبساطی دیرسوز روی هر دو نوع سویه باکتری خاصیت ضد باکتریایی ندارد در حالی که در نمونه پلی استایرن انبساطی استاندارد فقط در سویه *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 خاصیت ضد باکتریایی وابسته به غلظت نانوذره‌های نقره دیده شد. نتیجه‌های این پژوهش برپایه نقش غلظت نانوذره‌های نقره، ناخالصی‌های نمونه‌های پلی استایرن و ویژگی‌های ساختاری میکروارگانیسم‌ها توجیه شد. این پژوهش می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای پژوهش‌های آینده پیرامون نانوکامپوزیت‌های پلی استایرن ضد باکتریایی با کاربردهای گسترده‌ی صنعتی و بهداشتی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پلی استایرن انبساطی؛ نانوذره‌های نقره؛ نانوکامپوزیت؛ خاصیت ضد باکتریایی؛ اشرفیاکولی؛ استافیلوکوکوس ارئوس.

KEYWORDS: Expandable Polystyrene; Silver nanoparticle; Nanocomposites; Antibacterial properties; *E. coli*; *S. aureus*.

مقدمه

نانوذره‌های نقره به اتم‌های نقره با اندازه‌های ۱ تا ۱۰۰ نانومتر گفته می‌شوند که به سبب ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی یگانه به طور گسترده در صنایع گوناگون مورد استفاده قرار می‌گیرند. ویژگی‌های ضد باکتریایی چشمگیر این نانوذره‌ها در زمینه‌های بسیاری همچون تولید مواد ضد عفونی کننده، پارچه‌ها و ساخت ابزار پزشکی مورد توجه و استفاده قرار گرفته است [۱]. در این راستا آمیختن نانو ذره‌های نقره با پلیمر و ساخت نانوکامپوزیت پلیمری یکی از پرکاربردترین روش‌های استفاده از آن‌ها به شمار می‌رود. نانوکامپوزیت پلیمری به عنوان پرکاربردترین نانوکامپوزیت، ساختاری است که در ماتریس بستر پلیمری آن یک یا چند نوع نانوذره پخش شده است. تاکنون نانوکامپوزیت‌های پلیمری گوناگونی در حضور نانوذره‌های نقره تهیه شده اند که از جمله مهم‌ترین بسترهای مورد استفاده می‌توان به پلیمرهای وینیلی مانند پلی متیل متاکریلات^(۱) [۳، ۲]، پلی وینیل الکل^(۲) [۵، ۴]، پلی استایرن [۶]، پلی الیفین‌هایی مانند پلی اتیلن [۸، ۷] و پلیمرهایی ویژه مانند پلی آنیلین [۹] اشاره کرد.

پلی استایرن یک نوع پلیمر سخت می‌باشد که از کنار هم قرار گرفتن پشت سرهم مونومرهای استایرن به وجود می‌آید. استایرن که از ترکیب‌های آروماتیک ساده است از قدیمی‌ترین ترکیب‌های شناخته شده وینیل محسوب می‌شود و برای نخستین بار در سال ۱۸۳۹ میلادی توسط /دوآرد سیمون^(۳) شیمیدان آلمانی از رزین‌های طبیعی تهیه شد [۱۰]. حلقه آروماتیک به سختی پلیمر کمک کرده و از جابه‌جایی زنجیر که از عامل‌های شکنندگی پلیمر به حساب می‌آید جلوگیری می‌نماید. پلی استایرن‌ها را براساس چگونگی تولید آن می‌توان در سه گروه پلی استایرن معمولی (GPPS)^(۴)، پلی استایرن انبساطی (EPS)^(۵) و پلی استایرن مقاوم (HIPS)^(۶) طبقه بندی کرد [۱۱]. همچنین پلی استایرن انبساطی دیرسوز در مقایسه با پلیمر انبساطی استاندارد دارای ترکیب برم دار افزوده شده^(۷) HBCD است که پرکاربردترین ماده افزودنی ضد آتش در صنعت پلیمر برای ایجاد خاصیت دیرسوزی است. برای بررسی ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوکامپوزیت‌های پلیمری از باکتری‌های گوناگونی

استفاده می‌شود که اشریشیا کُلی^(۸) و استافیلوکوکوس اورئوس^(۹) از پرکاربردترین آن‌ها می‌باشند. اشریشیا کُلی یا به اختصار *E. coli* نوعی باکتری گرم - منفی است که به طور عموم در روده جانوران خونگرم یافت می‌شود [۱۲]. استافیلوکوکوس اورئوس یا به اختصار *S. aureus* نیز نوعی باکتری گرم - مثبت و بی‌هوازی اختیاری است که به عنوان یکی از موفق ترین باکتری‌های بیماری‌زا به شمار می‌آید [۱۳]. با توجه به اینکه در بسیاری از مطالعه‌ها بررسی ضدباکتریایی نانوکامپوزیت‌ها از اشریشیا کُلی و استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان مدل‌های شناخته شده استفاده می‌شود در این پژوهش نیز از این میکرو ارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. باید توجه نمود که اشریشیا کُلی شایع‌ترین عامل عفونت دستگاه ادراری است و عامل حدود ۹۰ درصد عفونت‌های ادراری در زنان جوان است. استافیلوکوکوس اورئوس نیز گستره گسترده‌ای از عفونت‌ها از جمله عفونت‌های ساده پوستی (مانند جوشدانه، کورک، کفگیرک، گل مژه و آبسه) گرفته تا بیماری‌های تهدید کننده زندگی (مانند پنومونی، مننژیت، استئومیلیت، اندوکاردیت، سندروم شوک سمی و سپتی سمی) را ایجاد می‌نماید. همچنین استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از ۵ عامل شایع ایجادکننده عفونت‌های بیمارستان به ویژه عفونت‌های زخم پس از جراحی است. در یکی از مطالعه‌های اخیر، رفتار ضدباکتریایی نانوکامپوزیت‌های پلی استایرن معمولی دارای نانوذره‌های نقره توسط ایرجی‌زاد و همکاران [۶] در غلظت‌های گوناگونی از نانوذره‌های نقره در حضور *E. coli* مورد مطالعه قرار گرفته است. هرچند پلی استایرن‌های معمولی خاصیت ضد باکتریایی از خود نشان داده اند، با این وجود با توجه به مصرف بالای پلی استایرن انبساطی در مصرف‌های ساختمانی و بهداشتی به نظر می‌رسد که انجام یک پژوهش جامع در زمینه بررسی خاصیت ضد باکتریایی این نوع نانوکامپوزیت‌های پلیمری در حضور انواع گوناگون باکتری‌ها نیاز است. ولی براساس بررسی‌هایی که انجام گرفت تاکنون هیچ گزارشی پیرامون خاصیت ضد باکتریایی نانوکامپوزیت‌های پلی استایرن انبساطی دیرسوز و استاندارد و مقایسه آن‌ها ارائه نشده است. در نتیجه این پژوهش به بررسی

(۱) Poly(methyl methacrylate)

(۲) Polyvinyl Alcohol

(۳) Edward Simon

(۴) General Purpose Polystyrene

(۵) Expanded Polystyrene

(۶) High Impact Polystyrene

(۷) Hexabromocyclododecane

(۸) *Escherichia coli*(۹) *Staphylococcus aureus*

ورقه‌های نانوکامپوزیت الف، ب و ج به دست آید. همچنین نمونه‌های کنترل ورقه‌های نانوکامپوزیت (د) به صورت ورقه‌های ۵٪ وزنی پلی استایرن انبساطی در کربن تتراکلرید بدون نانوذره‌های نقره به این روش تهیه شد. جدول ۱، مقدار (غلظت) نانوذره‌های نقره نهایی در ورقه‌های نانوکامپوزیت - پلی استایرن انبساطی را نشان می‌دهد. از این جدول پیداست که غلظت نانوذرها در ورقه ج ۱/۵ برابر ورقه ب و در ورقه ب دو برابر ورقه الف است. حجم‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی لیتر از محلول مرجع نانوذره‌های نقره در استن که به ترتیب در آنها ۱۸۷/۵، ۳۷۵ و ۵۶۲/۵ میکروگرم نانوذره‌های نقره وجود دارد با محلول ۵٪ وزنی پلی استایرن در کربن تتراکلرید به مدت‌های ۶ و ۸ ساعت مخلوط شد. پس از این مدت‌ها با از دست دادن حلال، ۱۵ میلی لیتر از محلول نهایی به دست آمد که با تقسیم میکروگرم نانوذره‌های نقره بر ۱۵ میلی لیتر محلول به ترتیب غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۳۷/۵ به دست آمد.

آزمایش خاصیت ضد باکتری نانوکامپوزیت‌های نقره - پلی استایرن

برای ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره در حضور باکتری‌های *E. coli* ATCC 25922 و *S. aureus* ATCC 6538 از روش انتشار دیسک اصلاح شده^(۲) استفاده شد [۱۷-۱۴]. در این روش که در اینجا در محیط کشت جامد نوترینت آگار انجام می‌شود، پس از قرار دادن نمونه، حضور هاله بازدارنده حول ورقه‌های نانوکامپوزیت وجود خاصیت ضد باکتریایی را نشان می‌دهد که بررسی قطر هاله ایجاد شده میزان عملکرد ضد باکتریایی این نانوکامپوزیت را به دست می‌دهد [۱۹، ۱۸].

ابتدا در محیط کشت مایع، محلولی از باکتری‌های *E. coli* ATCC 25922 و *S. aureus* ATCC 6538 در غلظت نیم مک فارلند دارای $10^8 \times 1/5$ CFU/mL باکتری تهیه شد. این نمونه‌ها بر روی پتری دیش‌های حاوی محیط کشت جامد نوترینت آگار به روش کشت خطی کشت داده شده و برای نشان دادن ورقه‌های نانوکامپوزیت بر روی آن‌ها آماده شد. ورقه‌های نانوکامپوزیت الف، ب و ج شامل نانوذره‌های نقره در غلظت‌های گوناگون و ورقه کنترل بدون نانوذره‌های نقره بر روی پتری دیش‌های محیط کشت هر یک از دو باکتری مورد بررسی نشانده شد. در ادامه پتری دیش‌ها به درون انکوباتور منتقل شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C برای بررسی‌های خاصیت ضد باکتری نگهداری شدند.

ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوکامپوزیت‌های نقره - پلی استایرن انبساطی دیرسوز و استاندارد در حضور باکتری گرم - منفی *E. coli* و باکتری گرم - مثبت *S. aureus* می‌پردازد.

بخش تجربی

مواد و میکرو اورگانسیم‌ها

نمونه پلی استایرن انبساطی استاندارد (FC422) از مجتمع پتروشیمی تبریز و پلی استایرن انبساطی دیرسوز (گرید F-۴۰۰۰) از مجتمع پتروشیمی بانیا رگنبد کاووس تهیه شد. در این پژوهش از نانوذره‌های نقره (US Research Nanomaterials, Inc., USA) با درجه خلوص ۹۹.۹۹٪ استفاده شد. محیط کشت جامد نوترینت آگار^(۱) و باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش نیز *E. coli* ATCC 25922 و *S. aureus* ATCC 6538 می‌باشند که از بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. همچنین کلیه مواد شیمیایی مانند حلال‌های استن و کربن تتراکلرید از فراورده‌های شرکت مرک تهیه شد.

روش‌ها

ساخت نانوکامپوزیت نقره - پلی استایرن انبساطی

برای ساخت نانوکامپوزیت‌های نقره - پلی استایرن از روش حل کردن پلیمر در حلال و اختلاط پلیمر و نانوذره‌های استفاده شد. برای این منظور ابتدا محلول ۵٪ وزنی پلی استایرن از هر دو فراورده‌ی پتروشیمی‌های بانیا و تبریز در کربن تتراکلرید تهیه شد. محلول مرجع نانوذره‌های نقره در استن ($3/75 \mu\text{g/mL}$) با ترکیب ۱/۵ mg نانوذره‌های نقره در ۴۰۰ mL استن به دست آمد. سه محلول متفاوت به ترتیب با انحلال حجم‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی لیتر از محلول مرجع نانوذره‌های نقره در ۱۰۰ mL از محلول ۵٪ وزنی پلی استایرن در کربن تتراکلرید به صورت جداگانه تهیه شد. این فرایند در هر دو نمونه پلی استایرن انبساطی بانیا و تبریز انجام پذیرفت. فرایند همگن سازی این محلول‌ها با کمک دستگاه حمام اولتراسونیک مدل XB2 (Grant Instruments, Cambridge, UK) به مدت ۰/۵ ساعت انجام شد، سپس محلول‌های به دست آمده به وسیله همزن مغناطیسی همزده شد. محلول نهایی (۱۵ میلی لیتر) محلولی زرد رنگ با گرانی بال (ژله مانند) می‌باشد که در قالب‌های شیشه‌ای ریخته می‌شود تا همراه با از دست دادن حلال به صورت

(۱) Nutrient Agar

(۲) Modified disc diffusion method

جدول ۱- مقدار (غلظت) نانوذره‌های نقره نهایی در ورقه های نانوکامپوزیت - پلی استایرن انبساطی الف، ب، ج و د پس از مخلوط کردن و همگن سازی محلول مرجع نانوذره‌های نقره با ۱۰۰ میلی لیتر از محلول ۵٪ وزنی پلی استایرن در کربن تتراکلرید و تبخیر حلال‌ها.

عنوان نمونه	کنترل د	الف	ب	ج
حجم محلول نانوذره‌های نقره (میلی لیتر)	-	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
غلظت نانوذره‌های نقره در ورقه ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	-	۱۲/۵	۲۵	۳۷/۵

جدول ۲- ویژگی‌های پلی استایرن انبساطی استاندارد پتروشیمی تبریز.

واحد	مقدار	ویژگی
میلی متر	۰/۷ - ۰/۵	قطر گرانول
درصد وزنی	۵٪	میزان پنتان
ppm	۵۰۰	مونومر باقیمانده

جدول ۳- ویژگی‌های پلی استایرن انبساطی دیرسوز پتروشیمی بانبار.

واحد	مقدار	ویژگی
میلی متر	۰/۹ - ۰/۶	قطر گرانول
درصد وزنی	۶٪	میزان پنتان
ppm	۱۰۰۰	مونومر باقیمانده

کلیه آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شده و میانگین آماری نتیجه‌ها گزارش شد.

پراکاربدرترین ماده افزودنی ضد آتش در صنعت پلیمر برای ایجاد خاصیت دیرسوزی است. Hexabromocyclododecane (HBCD) است [۲۰] که

برای ایجاد خاصیت دیرسوزی است.

نتیجه‌ها و بحث

آنالیز پلی استایرن‌های انبساطی

جدول ۲ ویژگی‌های پلی استایرن انبساطی استاندارد پتروشیمی تبریز را به دست می‌دهد. مطابق این جدول این پلیمر دارای اندازه‌های گرانول ۰/۷ - ۰/۵ mm بوده و دارای ۵٪ گاز پنتان است و میزان مونومر باقی مانده در گرانول‌های پلیمری ۵۰۰ ppm می‌باشد. جدول ۳ ویژگی‌های پلی استایرن انبساطی دیرسوز پتروشیمی بانبار را به دست می‌دهد. مطابق این جدول این پلیمر دارای اندازه‌های گرانول ۰/۹ - ۰/۶ mm بوده و همچنین دارای ۶٪ گاز پنتان می‌باشد و همچنین مونومر باقی مانده در گرانول‌های پلیمری ۱۰۰۰ ppm می‌باشد. پلی استایرن انبساطی دیرسوز پتروشیمی بانبار در مقایسه با پلیمر انبساطی استاندارد پتروشیمی تبریز دارای ترکیب برم دار افزوده شده

ویژگی‌های نانوذره‌های نقره

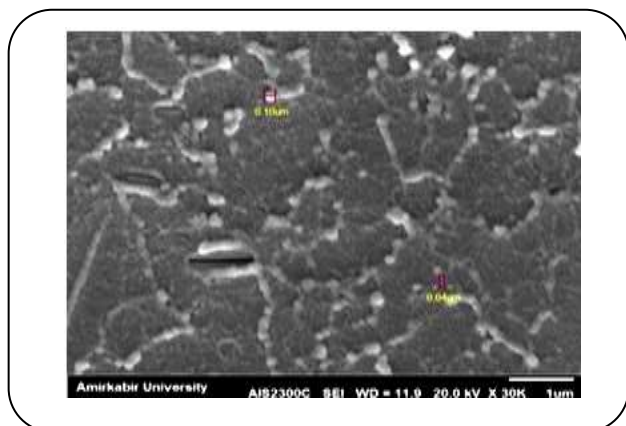
تصویر TEM نانوذره‌های نقره مورد بررسی در شکل ۱ نشان داده شده است. در این شکل با توجه به مقیاس تصویر می‌توان دریافت که این ساختار نقره دارای اندازه‌ها در مقیاس نانو می‌باشد. برای یافتن اندازه‌های دقیق نانوذره‌های، الگوی پراش اشعه X (XRD) استفاده شد. با استفاده از معادله شرر^(۱) به صورت زیر [۲۱، ۲۲]:

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos(\theta)}$$

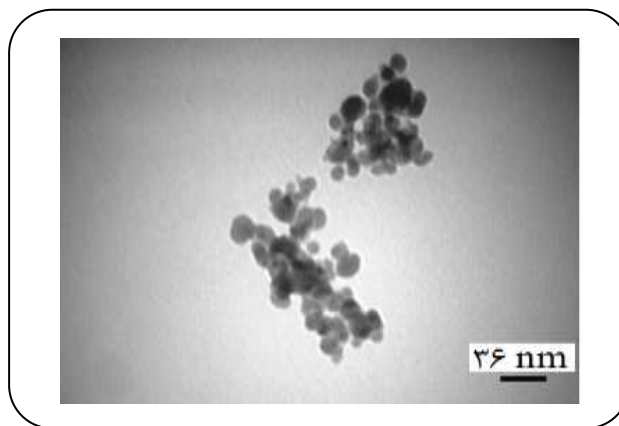
در این معادله λ طول موج اشعه X در، β پهنای کامل قله در نیمه ارتفاع بیشینه (FWHM)^(۲)، θ زاویه پراش براگ و D قطر نانوذره‌ها است. محاسبه‌های انجام شده با استفاده از مقدارهای

(۱) Scherrer equation

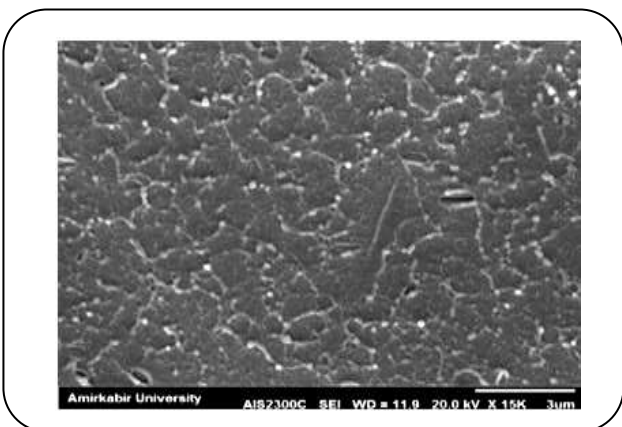
(۲) Full width at half maximum



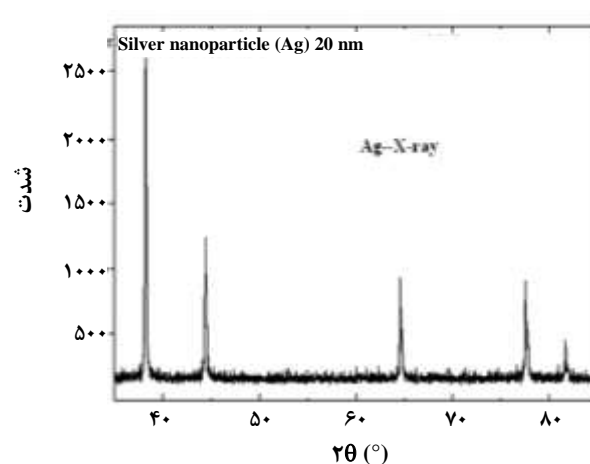
شکل ۳- تصویر SEM از سطح نانوکامپوزیت نقره-پلی استایرن انبساطی پتروشیمی بانبار.



شکل ۱- تصویر TEM نانوذره‌های نقره به کار رفته در نانوکامپوزیت‌های پلی استایرن انبساطی.



شکل ۴- تصویر SEM از سطح نانوکامپوزیت نقره-پلی استایرن انبساطی پتروشیمی تبریز.



شکل ۲- الگوی پراش XRD نانوذرات نقره به کار گرفته شده در نانوکامپوزیت‌های پلی استایرن انبساطی در بازه زاویه 35° - 85° .

آنالیز ساختار توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوکامپوزیت‌های پلی استایرن حاوی نانوذره‌های نقره را نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۳ دیده می‌شود که نانوذره‌های نقره به صورت خوشه ای و تجمعی در پلیمر پلی استایرن انبساطی دیرسوز پتروشیمی بانبار پخش شده اند درحالی که مطابق شکل ۴ نانوذره‌های نقره به صورت جدا از هم در پلیمر پلی استایرن انبساطی پتروشیمی تبریز توزیع شده اند.

به‌دست آمده از الگوی XRD در شکل ۲ با دستگاه اشعه X با طول موج ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$)، زاویه پراش ($2\theta = 38^{\circ}$) و پهنای حدود نیم درجه نشان داد که اندازه نانو ذره‌های نقره در حدود ۲۰ nm است.

بررسی نتیجه‌های SEM نانو کامپوزیت‌های پلی استایرن انبساطی :

مورفولوژی سطح نمونه های پلیمری انبساطی استاندارد و دیرسوز و همچنین نانوکامپوزیت های ساخته شده دارای نانوذره‌های نقره از این نمونه ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)^(۱) مورد مطالعه قرار گرفت. شکل ۳ و ۴ نتیجه‌های

خاصیت ضد باکتریایی ورقه های نانو کامپوزیت های نقره - پلی

استایرن انبساطی استاندارد بر روی باکتری *E. coli* ATCC 25922

پس از ۴۸ ساعت نگهداری پتری دیش‌های دارای باکتری *E. coli* ATCC 25922 و ورقه‌های دارای نانو کامپوزیت

(۱) Scanning Electron Microscopy



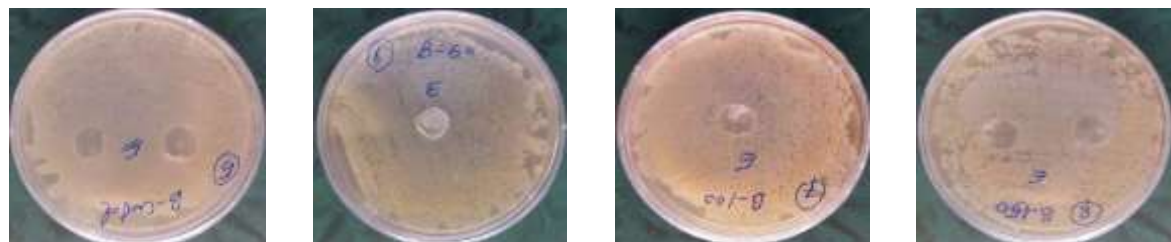
کنترل د

الف

ب

ج

شکل ۵- ورقه کنترل (د) و ورقه های نانوکامپوزیت نقره- پلی استایرن انبساطی استاندارد با غلظت های گوناگون نانو ذره های نقره (الف، ب، ج) در پتری دیش های دارای باکتری *E. coli* ATCC 25922.



کنترل د

الف

ب

ج

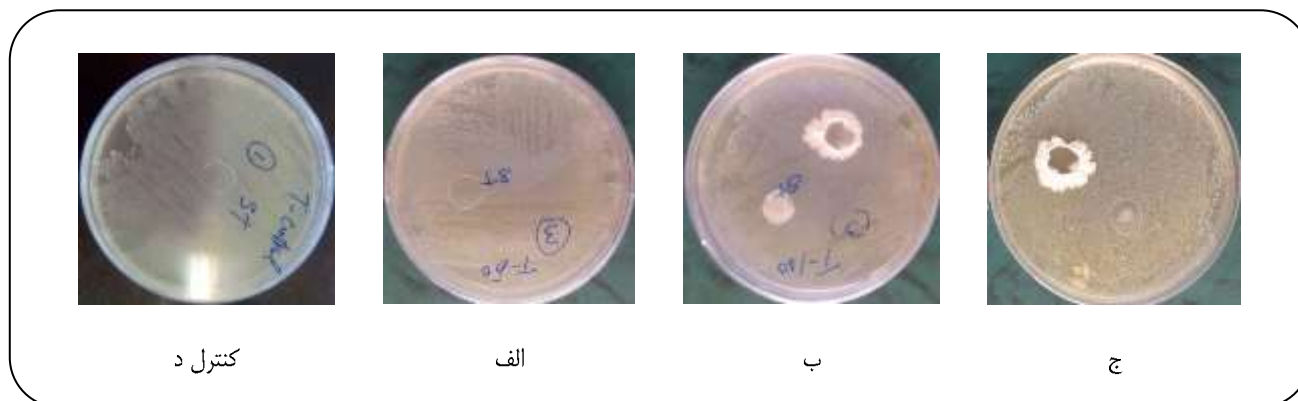
شکل ۶- ورقه کنترل (د) و ورقه های نانوکامپوزیت نقره - پلی استایرن انبساطی دیرسوز با غلظت های گوناگون نانو ذره های نقره (الف، ب، ج) در پتری دیش های دارای باکتری *E. coli* ATCC 25922.

نقره - پلی استایرن انبساطی دیرسوز در انکوباتور و در دمای 37°C تصویرهای تغییرهای صورت پذیرفته روی نمونه ها ثبت شد. نتیجه های به دست آمده در شکل ۶ نشان داده شده است. همان گونه که در شکل های ۶ دیده می شود، طبق روش انتشار دیسک اصلاح شده، ظاهر نشدن هاله بیانگر این است که ورقه های نمونه پلی استایرن انبساطی دیرسوز پتروشیمی بانبار هیچ اثر ضد باکتریایی بر باکتری *E. coli* ATCC 25922 ندارد. این نتیجه ها در تمامی نمونه های نانوکامپوزیت های نقره - پلی استایرن بررسی و تکرار شد.

خاصیت ضد باکتریایی ورقه های نانو کامپوزیت های نقره - پلی استایرن انبساطی استاندارد بر روی باکتری *S. aureus* ATCC 6538
پس از ۴۸ ساعت نگهداری پتری دیش های دارای باکتری *S. aureus* ATCC 6538 و ورقه های دارای نانو کامپوزیت

نقره - پلی استایرن انبساطی استاندارد در انکوباتور و در دمای 37°C تصویرهای تغییرهای صورت پذیرفته روی نمونه ها ثبت شد. نتیجه های به دست آمده در شکل ۵ نشان داده شده است. همان گونه که در شکل های ۵ دیده می شود، طبق روش انتشار دیسک اصلاح شده، ظاهر نشدن هاله بیانگر این است که ورقه های نمونه پلی استایرن انبساطی استاندارد پتروشیمی تبریز هیچ اثر ضد باکتریایی بر باکتری *E. coli* ATCC 25922 ندارد. این نتیجه ها در تمامی نمونه های نانوکامپوزیت های نقره- پلی استایرن مورد بررسی و تکرار شد.

خاصیت ضد باکتریایی ورقه های نانو کامپوزیت های نقره - پلی استایرن انبساطی دیرسوز بر روی باکتری *E. coli* ATCC 25922
پس از ۴۸ ساعت نگهداری پتری دیش های دارای باکتری *E. coli* ATCC 25922 و ورقه های دارای نانو کامپوزیت



شکل ۷- ورقه کنترل (د) و ورقه های نانوکامپوزیت نقره- پلی استایرن انبساطی استاندارد با غلظت‌های گوناگون نانو ذره‌های نقره (الف، ب، ج) در پتری دیش‌های دارای باکتری *S. aureus* ATCC 6538.

همان‌گونه که در این شکل دیده می‌شود با افزایش غلظت نانوذره‌های نقره، شعاع نابودی باکتری‌ها افزایش پیدا می‌کند. در واقع که با افزایش غلظت نانوذره‌های نقره، یون‌های نقره بیشتری آزاد می‌شود که وجود همین یون‌های نقره باعث نابودی باکتری‌ها می‌شود.

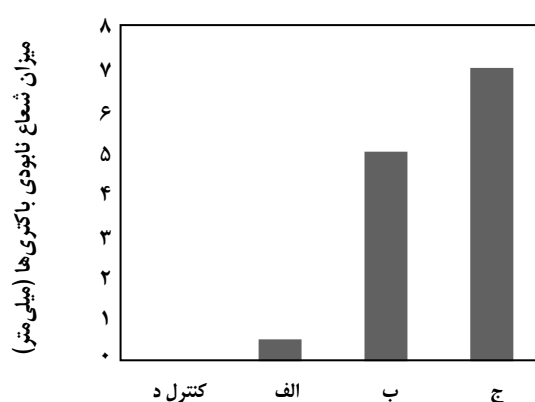
خاصیت ضد باکتریایی ورقه‌های نانو کامپوزیت‌های نقره -

پلی استایرن انبساطی دیرسوز بر روی باکتری *S. aureus* ATCC 6538

پس از ۴۸ ساعت نگهداری پتری دیش‌های دارای باکتری *S. aureus* ATCC 6538 و ورقه‌های حاوی نانو کامپوزیت نقره - پلی استایرن انبساطی دیرسوز در انکوباتور و در دمای 37°C تصویرهای تغییرهای صورت پذیرفته روی نمونه‌ها ثبت شد. نتیجه‌های به دست آمده در شکل ۹ نشان داده شده است.

همان‌گونه که در شکل‌های ۹ دیده می‌شود، طبق روش انتشار دیسک اصلاح شده، ظاهر نشدن هاله بیانگر این است که ورقه‌های نمونه پلی استایرن انبساطی دیرسوز پتروشیمی بانیار هیچ اثر ضد باکتریایی بر باکتری *S. aureus* ATCC 6538 ندارد.

بنابراین بر اساس نتیجه‌های آزمایش‌ها، خاصیت ضد باکتریایی نانوکامپوزیت نقره - پلی استایرن های انبساطی به نوع پلی استایرن انبساطی، نوع باکتری، اندازه ذره‌ها و غلظت نانوذره‌های نقره بستگی دارد. نانو کامپوزیت نقره - پلی استایرن انبساطی دیرسوز بانیار بدون هرگونه اثر ضد باکتریایی در هر دو نوع باکتری مورد بررسی می‌باشد. نمونه نانوکامپوزیت نقره - پلی استایرن انبساطی استاندارد پتروشیمی تبریز در مقابل باکتری گرم - منفی *E. coli* ATCC 25922 اثر ضدباکتریایی ندارد.



شکل ۸ - افزایش میانگین شعاع نابودی باکتری‌ها با افزایش غلظت نانوذره‌های نقره.

نقره - پلی استایرن انبساطی استاندارد در انکوباتور و در دمای 37°C تصویرهای تغییرهای صورت پذیرفته روی نمونه‌ها ثبت شد. نتیجه‌های به دست آمده در شکل ۷ نشان داده شده است.

در شکل‌های ۷ ورقه‌های نانوکامپوزیت نقره - پلی استایرن انبساطی استاندارد حاوی غلظت‌های گوناگون نانوذره‌های نقره پتری دیش‌های حاوی باکتری *S. aureus* ATCC 6538 نشان داده شده است. مطابق این شکل‌ها ورقه‌های نانوکامپوزیت نقره - پلی استایرن با اعمال اثر ضد باکتریایی هاله‌ای در اطراف خود ایجاد نموده است، که این هاله نشانگر نابودی باکتری *S. aureus* ATCC 6538 می‌باشد. این اثر ضد باکتریایی وابستگی مستقیم به غلظت نانوذره‌های نقره تزریقی در ساختار نانوکامپوزیت دارد. به طوری که مطابق شکل ۸ با افزایش غلظت نانوذره‌های میانگین شعاع نابودی باکتری‌ها نیز افزایش می‌یابد.



شکل ۹- ورقه کنترل (د) و ورقه های نانوکامپوزیت نقره - پلی استایرن انبساطی دیرسوز با غلظت های گوناگون نانو ذره های نقره (الف، ب و ج) در پتری دیش های دارای باکتری *S. aureus* ATCC 6538.

داخل سلول به سمت یون های نقره، غشای سیتوپلاسم در خود جمع می شود و یا از دیواره سلولی جدا می شود. در نتیجه ناحیه ای با ازدحام الکترون کمتر در میانه سلول ها ایجاد می شود که مولکول های متراکم DNA در وسط آن قرار دارند [۳۱]. در این مکانیسم یون های نقره به سامانه دفاعی عمومی باکتری های گرم - منفی و مثبت که از DNA محافظت می کند حمله می کند. از آنجایی که DNA دارای مهم ترین اطلاعات ژنتیکی در سلول هاست، هرگونه آسیب به دی ان ای به جهش ژنتیکی و یا مرگ ارگانیسم می انجامد. در نتیجه طبیعی است که برخی سلول ها برای محافظت از آن وارد عمل شوند [۳۲، ۳۳]. شوک وارد شده ناشی از ورود یون های نقره به درون سلول که خود از انواع هجوم خارجی به میکروارگانیسم به حساب می آید می تواند باعث تولید پروتئین هایی با وزن مولکولی پایین در میانه سلول شود که با به هم پیوستن در قسمت هسته ای موجب محافظت از DNA می شود. با توجه به مشاهده های آزمایشگاهی [۳۱] حضور یون های نقره در میانه توده هایی آکنده از الکترون و تقریباً نبود این توده ها در نواحی های با تراکم الکترون پایین می تواند کارکرد محافظتی نواحی با تراکم پایین الکترون از DNA (با دور نگه داشتن از یون های نقره) را توضیح دهد. ولی نکته چشمگیر در اینجاست که رونویسی مولکول های سلولی DNA در زمان تکثیر سلولی زمانی به طور مؤثر اتفاق می افتد که این مولکول ها در حالت استراحت باشند و در واقع در حالت متراکم توانایی خود برای رونویسی را از دست می دهند. بنابراین هرچند خود DNA از هجوم یون های مهاجم محافظت می شود اما تراکم آن باعث می شود که تکثیر و رشد سلولی متوقف شود که سرانجام منجر به مرگ میکروارگانیسم می انجامد.

درحالی که این نانوکامپوزیت بر باکتری گرم - مثبت *S. aureus* ATCC 6538 اثر ضد باکتریایی از خود نشان می دهد که این اثر نیز به غلظت نانوذره ها بستگی دارد و با افزایش غلظت روندی افزایشی نشان می دهد.

در توجیه این مشاهده ها بر اساس دیگر مطالعه های صورت گرفته، نانوذره های نقره به دو روش می توانند از خود خاصیت ضد باکتریایی در ماکرومولکول های زیستی نشان دهند. در مکانیسم اول، نانو مواد یون هایی را آزاد می کنند که با گروه تیول (گروه های عاملی به شکل SH-) موجود در پروتئین های سطح سلول باکتری ها واکنش می دهند. گروه های تیول موجود در آنزیم ها و پروتئین های سلول برای تنفس باکتری و انتقال مواد از غشای سلولی اهمیت دارد و هر گونه برهمکنش با عوامل خارجی عملکردی آن ها را مختل می کند [۲۵-۲۳]. این گونه پروتئین ها از غشای سلولی باکتری به سمت بیرون، برآمدگی داشته و موجب انتقال مواد غذایی از دیواره سلول می شوند. نانو مواد این پروتئین ها را غیر فعال کرده، نفوذ پذیری غشا را کاهش داده و سرانجام باعث مرگ سلولی می شوند [۲۶]. برای نمونه بریدیش استول و همکاران [۲۷] نشان دادند که نانوذره های نقره در برهمکنش با باکتری ها و قارچها سامانه تنفسی آن ها را از کار می اندازند و از طریق اختلال در متابولیسم سلولی آن ها مانع از رشد باکتری می شوند [۲۸]. اتصال به دیواره سلولی باکتری و سلول های بیرونی باکتری باعث تغییر کارکرد غشا سلولی باکتری می شود [۲۹] و حتی به این واسطه است که فلز نقره و ترکیبات آن منجر به جلوگیری مؤثر از عفونت زخمها می شود [۳۰]. در مکانیسم دوم، پس از حضور یون های مثبت نقره در اطراف سلول و با آغاز نفوذ از دیواره سلولی، با کشنده شدن الکترون های دیواره و

همچنین بر طبق مشاهده‌های ما نمونه نانوکامپوزیت نقره - پلی استایرن انبساطی استاندارد پتروشیمی تبریز فقط بر باکتری گرم - مثبت *S. aureus* ATCC 6538 اثر ضد باکتریایی از خود نشان می‌دهد. این موضوع را می‌توان بر اساس دو ویژگی متمایز باکتری های گرم - مثبت در برهمکنش با نانوذره‌های نقره در مقایسه با باکتری‌های گرم - منفی جستجو کرد. دیواره سلولی باکتری‌های گرم - منفی از دو لایه شامل غشای خارجی باکتریایی^(۱) و غشای سلولی سیتوپلاسمی^(۲) تشکیل شده است که دیواره نازکی از پپتیدوگلیکان^(۳) را در میان می‌گیرد. در صورتی که دیواره سلولی باکتری های گرم-مثبت با وجود دیواره ضخیم‌تر پپتیدوگلیکان، تک لایه و فاقد غشای خارجی و به مراتب نازک تر بوده [۴۹] و همین ویژگی آنها را نسبت به آنتی بیوتیک‌ها حساس‌تر ساخته و باعث می‌شود اثر آنتی بیوتیک بر روی آنها مؤثرتر و مشهودتر باشد [۵۰، ۵۱]. در نتیجه، سادگی دیواره سلولی باکتری‌های گرم - مثبت آنها را نسبت به نفوذ مهاجمان خارجی مانند نانوذره‌های نقره آسیب پذیرتر می‌سازد.

نبود غشای خارجی در باکتری‌های گرم - مثبت منجر به مکانیسم دیگری می‌شود که تمایز آشکاری در از بین رفتن بسیار پر شمارتر باکتری‌های گرم - مثبت در برهمکنش با نانوذره‌های نقره در مقایسه با باکتری های گرم-منفی نشان می‌دهد. در این مکانیسم در نبود غشا خارجی نانوذره‌های نقره با دسترسی مستقیم به رشته های گلیکان و یا شاخه‌های پپتیدی موجود در پپتیدوگلیکان وارد برهمکنش می‌شوند [۵۲، ۵۳] و با تخریب آن لایه، ضمن از بین بردن غشا، با ایجاد حفره، مسیرهایی را برای نفوذ آسان به درون سلول می‌سازد که شرایط را برای مکانیسم مرگ هر چه بیش‌تر سلولی فراهم می‌کند. در باکتری های گرم-منفی این برهمکنش به علت قرار گرفتن لایه پپتیدوگلیکان زیر غشای بیرونی صورت نمی‌پذیرد. پپتیدوگلیکان از اجزای ویژه و اساسی به تقریب تمامی باکتری‌هاست اما در باکتری‌های گرم-مثبت این لایه بسیار ضخیم تر (۲۰ تا ۸۰ نانومتر) از لایه موجود در باکتری‌های گرم - منفی (۷ تا ۸ نانومتر) است به گونه ای که در باکتری‌های گرم - مثبت حدود ۹۰٪ و در باکتری های گرم-منفی ۵٪ وزن خشک آنها را تشکیل می‌دهد [۵۴]. ویژگی‌های اصلی ساختاری پپتیدوگلیکان در رشته های گلیکان نهفته است که با پپتیدهای کوتاه پیوند خورده‌اند. در *S. aureus* رشته‌های گلیکان

از سویی دیگر دو دلیل عمده برای دیده نشدن اثر ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره در پلی استایرن انبساطی دیرسوز بانبار وجود دارد که در مطالعه‌های دیگر نیز به خوبی پرداخته شده است. دلیل اول بستگی خاصیت ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره به ابعاد [۳۶-۳۴] و شکل نانوذره‌های نقره [۳۷] می‌باشد به گونه ای که با افزایش اندازه نانوذره‌ها و همچنین تجمع توده ای نانوذره‌ها، نسبت سطح به حجم می‌تواند به مراتب کاهش یابد [۳۸]. کاهش این شاخص باعث افت عملکرد اندرکنش با ساختارهای زیستی می‌شود و در نتیجه عملکرد منفی کم‌تری بر متابولیسم سلولی ایجاد می‌نماید [۳۹]. در محیط پلی استایرن انبساطی دیرسوز بانبار مطابق شکل ۳ به روشنی دیده می‌شود که نانوذره‌های نقره به صورت تجمعی دور همدیگر جمع شده‌اند به طوری که تشکیل زنجیره‌های چندتایی داده اند. این در حالی است که مطابق شکل ۴ نانوذره‌ها نقره بیش‌تر به طور مجزا در محیط پلی استایرن انبساطی پتروشیمی تبریز توزیع شده اند و عدم شکل‌گیری خوشه های چندتایی نانوذره‌ها موجب بالارفتن احتمال اندرکنش با غشا سلولی و تخریب آن خواهد شد. بنابراین حضور ناخالصی‌های بیش‌تر از نوع پنتان، مونومرهای باقیمانده و HBCD در ترکیب شیمیایی آغازین پلی استایرن می‌تواند با کاهش توزیع همگن نانوذره‌ها در بستر پلی استایرن انبساطی [۴۰، ۴۱] به عنوان عامل مهمی در کاهش عملکرد ضد باکتریایی نانوکامپوزیت های مورد بررسی با پلی استایرن انبساطی دیرسوز قلمداد شود. دلیل دوم برای مشاهده نشدن اثر ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره در پلی استایرن انبساطی دیرسوز بانبار در مقایسه با پلیمر انبساطی استاندارد پتروشیمی تبریز به ویژگی دیرسوز بودن پلی استایرن بانبار به علت وجود HBCD مرتبط می‌باشد. پژوهش‌های اخیر نشان داده است که HBCD در حضور فلزهای سنگین و حلال های ارگانیک با آنها واکنش داده و همراه با از دست دادن یکی از برم های خود دچار تغییر ساختاری می‌شود [۴۳، ۴۲]. در این فرایندها وجود فلزهای سنگین همچون نقره، مس و نیکل در نقش کاتالیزگر با تضعیف پیوند هالید-کربن^(۱) در هالیدهای آلی با تغییر پتانسیل کاهش، وضعیت را برای جدا شدن هالید فراهم می‌کند [۴۲-۴۸]. این مسئله باعث می‌شود که نانونقره‌های اضافه شده در پلی استایرن دارای HBCD جذب و درگیر این فرایند شده و فرصت کافی برای نفوذ به درون سلول‌های زنده باکتری‌ها که زمان‌بر نیز هست نداشته باشند.

(۱) Reduction Cleavage

(۲) Bacterial outer membrane

(۳) Cytoplasmic cell membrane

(۴) Peptidoglycan

دریچه‌ای نو در بهبود کارایی آن‌ها در مصرف‌های بهداشتی و صنعتی به‌شمار آید. در این پژوهش سعی شد تا از خاصیت ضدباکتریایی نانوذره‌های نقره برای بهبود ویژگی‌های پلی استایرن انبساطی دیرسوز و استاندارد استفاده شود. برای این منظور نانوذره‌های نقره به این پلی استایرن‌ها افزوده شد. پس از تهیه ورقه‌های نانوکامپوزیت پلیمری نقره - پلی استایرن ویژگی‌های ضد باکتریایی آنها بر دو گونه باکتری *S. aureus* ATCC 6538 و *E. coli* ATCC 25922 بررسی شد. نتیجه‌های این پژوهش نشان داد که تنها نانوکامپوزیت انبساطی استاندارد پتروشیمی تبریز می‌تواند بر باکتری گرم مثبت *S. aureus* ATCC 6538 اثر ضدباکتریایی داشته باشد. این اثر نیز وابستگی مستقیم با غلظت نانوذره‌های نقره به کار رفته در ساختار این نانوکامپوزیت دارد. تفاوت‌های ساختار دیواره سلولی و درون سلولی این دو باکتری و فراوانی و انواع ناخالصی‌های موجود در دو نوع نانوکامپوزیت از جمله مهم ترین عامل‌های تأثیرگذار در توجیه این ویژگی‌های متفاوت ضدباکتریایی به حساب می‌آید. نقش رهاسازی یون‌های Ag^+ توسط نانوذره‌های نقره و تأثیر مستقیم آنها بر DNA باکتری نیز به عنوان عامل اصلی در وابستگی ویژگی‌های ضد باکتریایی نانوکامپوزیت انبساطی استاندارد پتروشیمی تبریز به غلظت نانوذره‌های نقره می‌باشد. نتیجه‌های این پژوهش می‌تواند راهگشای پژوهشگران در تولید نانوکامپوزیت های پلی استایرن نقره با خاصیت ضد باکتریایی قوی باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۱

شامل اسیدهای N-acetylmuramic و N-acetylglucosamine است که به‌طور متناوب قرار گرفته اند. زنجیره پپتید نیز به شکل ترکیب آلانین^(۱)-گلوتامین^(۲)-لیزین^(۳)-آلانین می‌باشد [۵۵]. در برهمکنش نانوذره‌های نقره با رشته های گلیکان در پپتیدوگلیکان، مورامیک اسید^(۴) قند یگانه موجود در پپتیدوگلیکان - آزاد می‌شود. میزان اسید مورامیک که یکی از شاخص‌های زیستی اصلی برای مشخص کردن جرم زیستی باکتری‌هاست در دیواره سلولی باکتری‌های گرم - مثبت حدود ۹۵٪ در مقایسه با بیشینه ۵٪ در دیواره سلولی باکتری های گرم - منفی است [۵۴]. آزاد شدن مورامیک اسید در محیط کشت نشان دهنده موفقیت آمیز بودن برهمکنش نانوذره‌ها با رشته های گلیکان پپتیدوگلیکان و تخریب دیواره سلولی می‌باشد.

سرانجام یافته‌های ما بیانگر آن دارد که اثر ضد باکتریایی نانوذره‌های نقره بر باکتری گرم - مثبت *S. aureus* ATCC 6538 به غلظت نانوذره‌ها بستگی دارد. فراوانی یون‌های پخش شده از نانوذره‌های نقره وابسته به غلظت این نانوذره‌ها در نانوکامپوزیت می‌باشد، در نتیجه به‌طور مستقیم آثار ضد باکتریایی با غلظت این نانو ذره‌ها ارتباط دارند. به عبارتی دیگر با افزایش غلظت نانوذره‌های نقره، تعداد یون های ساطع شده نیز به مراتب افزایش یافته که به طور مستقیم باعث آثار مخرب بیشتری خواهد شد.

نتیجه‌گیری

پلی استایرن به‌عنوان یکی از پرمصرف ترین پلیمرها در مصرف‌های ساختمانی و بهداشتی شناخته می‌شوند. افزودن خاصیت ضد باکتریایی به این پلی استایرن ها می‌تواند به عنوان

مراجع

[۱] زمان خان، حسام؛ آیتی، بیتا؛ گنجی دوست، حسین، تجزیه فتوکاتالیستی فنل به وسیله نانوذرات روی اکسید

تثبیت شده بر بستر بتنی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۳) ۳۱: ۹-۱۹ (۱۳۹۱).

[2] Vodnik V.V., Božanić D.K., Džunuzović E., Vuković J., Nedeljković J.M., Thermal and Optical Properties of Silver-poly(methylmethacrylate) Nanocomposites Prepared by In-Situralical Polymerization, *Eur. Polym. J.*, **46**: 137-144 (2010).

(۱) Alanine

(۳) Lysine

(۲) Glutamine

(۴) Muramic acid

- [3] Singho N.D., Lah N.A.C., Johan M.R., Ahmad R., [Enhancement of the Refractive Index of Silver Nanoparticles in Poly \(Methyl Methacrylate\)](#), *Int. J. Res. Eng. Technol.*, **1**:2277–4378 (2012).
- [4] Liu S., He J., Xue J., Ding W., [Efficient Fabrication of Transparent Antimicrobial Poly\(vinyl Alcohol\) Thin Films](#), *J. Nanopart. Res.*, **11**:553–560 (2009).
- [5] Feng Q., Dang Z., Li N., Cao X., [Preparation and Dielectric Property of Ag–PVA Nano-Composite](#), *Mater. Sci. Eng. B*, **99**: 325–328 (2003).
- [6] Kazemi A., Raftari M., Tollabimazraehno S., Mahdavi M., Irajizad A., [Comparison Anti-Bacterial Effect of Silver/Polystyrene Nanocomposites on Gram Negative and Positive Bacteria](#), “American Physical Society, APS March Meeting”, February 27-March 2 (2012).
- [7] Zapata P.A., Tamayo L., Páez M., Cerda E., Azócar I., Rabagliati F.M., [Nanocomposites Based on Polyethylene and Nanosilver Particles Produced by Metallocenic “in situ” Polymerization: Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Behavior](#), *Eur. Polym. J.*, **47**:1541–1549 (2011).
- [8] Abbasi A.R., Kalantary H., Yousefi M., Ramazani A., Morsali A., [Synthesis and Characterization of Ag Nanoparticles@Polyethylene Fibers under Ultrasound irradiation](#), *Ultrason. Sonochem.*, **19**:853–857 (2012).
- [9] Singh R.P., Tiwari A., Pandey A.C., [Silver/Polyaniline Nanocomposite for the Electrocatalytic Hydrazine Oxidation](#), *J. Inorg. Organomet. Polym.*, **21**:788–792 (2011).
- [10] Lokensgard E., ["Industrial Plastics: Theory and Applications"](#), Delmar, Cengage Learning, New York, USA (2010).
- [11] Gray J.E., “Polystyrene: Properties, Performance, and Applications”, Nova Science Publishers (2011).
- [12] Singleton P., ["Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine"](#), John Wiley & Sons Ltd, New York (1999).
- [13] Kluytmans J., van Belkum A., H Verbrugh H., [Nasal Carriage of *Staphylococcus Aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks](#), *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**:505-520 (1997).
- [14] Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turck M., [Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method](#), *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**:493-496 (1966).
- [15] Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O., [A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*](#), *J. Biomed. Mater.*, **52**:662-668 (2000).
- [16] Son W.K., Youk J.H., Lee T.S., Park W.H., [Preparation of Antimicrobial Ultrafine Cellulose Acetate Fibers with Silver Nanoparticles](#), *Macromol. Rapid Commun.*, **25**:1632-1637 (2004).
- [17] Melaiye A., Sun Z., Hindi K., Milsted A., Ely D., Reneker D., [Silver\(I\)–Imidazole Cyclophane gem-Diol Complexes Encapsulated by Electrospun Tecophilic Nanofibers: Formation of Nanosilver Particles and Antimicrobial Activity](#), *J. Am. Chem. Soc.*, **127**:2285-2291 (2005).

- [18] Yildirim L.T., Kurtaran R., Namli H., Azaz A.D., Atakol O., [Synthesis, Crystal Structure and Biological Activity of Two New Heterotrinnuclear Thiocyanato Bridged Cu\(II\)-Hg\(II\)-Cu\(II\) Complexes](#), *Polyhedron.*, 26:4187-4194 (2007).
- [19] Kurtana R., Yildirim L.T., Azaz A.D., Namli H., Atkol O., [Synthesis, Characterization, Crystal Structure and Biological Activity of a Novel Heterotetranuclear Complex:\[NiLPb\(SCN\)2\(DMF\)\(H2O\)\]2,bis-{\[m-N,N'-bis\(salicylidene\)-1,3-propanediaminato-Aqua-nickel \(II\)\] \(thiocyanato\)\(m-thiocyanato\)\(m-N,N'-dimethylformamide\)lead\(II\)}](#), *J. Inorg. Biochem.*, 99:1937-1944 (2005).
- [20] Eljarrat E., Barceló D., ["Brominated Flame Retardants"](#), Springer Berlin Heidelberg (2010).
- [21] Scherrer P., [Bestimmung der Grösse und der Inneren Struktur von Kolloidteilchen Mittels Röntgenstrahlen \[Determination of the size and Internal Structure of Colloidal Particles Using, Nachr. Göttinger Nachrichten Math. Phys., 2:98-100 \(1918\). \[German\]](#)
- [22] Cullity B. D., ["Elements of X-ray Diffraction"](#), Addison Wesley (1978).
- [23] Cho K.H., Park J.E., Osaka T., Park S.G., [The Study of Antimicrobial Activity and Preservative Effects of Nanosilver Ingredient](#), *Electrochim.Acta*, 51:956-960 (2005).
- [24] Liao S., Read D., Pugh W., Furr J., Russell A., [Interaction of Silver Nitrate with Readily Identifiable Groups: Relationship to the Antibacterial Action of Silver Ions](#), *Lett. Appl. Microbiol.*, 25:279-283 (1997).
- [25] Spacciapoli P., Buxton D., Rothstein D., Friden P., [Antimicrobial Activity of Silver Nitrate Against Periodontal Pathogens](#), *Periodontal J. Res.*, 36:108-113 (2001).
- [26] Schrand A.M., Rahman M.F., Hussain S.M., Schlager J.J., Smith D.A., Syed A.F., [Metal-Based Nanoparticles and Their Toxicity Assessment](#), *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2:544-568 (2010).
- [27] Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J., Hofmann M.C., [In Vitro Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian Germline Stem Cells](#), *Toxicol. Sci.*, 88:412-419 (2005).
- [28] Hussain S.M., Javorina A.K., Schrand A.M., Duhart H.M., Syed A.F., Schlager J.J., [The Interaction of Manganese Nanoparticles with PC-12 Cells Induces Dopamine Depletion](#), *Toxicol. Sci.*, 92:456-463 (2006).
- [29] Percival S.L., Bowler P.G., Russell D., [Bacterial Resistance to Silver in Wound Care](#), *J. Hosp. Infect.*, 60:1-7 (2005)
- [30] Wright J.B., Lam K., Hansen D., Burrell R.E., [Efficacy of Topical Silver Against Fungal Burn Wound Pathogens](#), *Am. J. Infect. Control*, 27:344-350 (1999).
- [31] Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O., [A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions on Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus](#), *J. Biomed. Mater. Res.*, 52:662-8 (2000).
- [32] Brett D.W. , [A discussion of Silver as an Antimicrobial Agent: Alleviating the Confusion](#), *Ostomy Wound Manag.*, 52:34-41 (2006).

- [33] Hidalgo E., Dominguez C., [Study of Cytotoxicity Mechanisms of Silver Nitrate in Human Dermal Fibroblasts](#), *Toxicol. Lett.*, **98**:169-179 (1998).
- [34] Lok C.N., Ho C.M., Chen R., He Q.Y., Yu W.Y., Sun H., Tam P.K., Chiu J.F., Che C.M., [Silver Nanoparticles: Partial Oxidation and Antibacterial Activities](#), *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12**:527-534 (2007).
- [35] Martínez-Castañón G. A., Niño-Martínez N., Martínez-Gutierrez F., [Martínez-Mendoza J. R., Ruiz F., Synthesis and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles with Different Sizes](#), *J. Nanopart. Res.*, **10**:1343-1348 (2008).
- [36] Baker C., Pradhan A., Pakstis L., Pochan D.J., Shah S. I., [Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles](#), *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **5**:244-249 (2005).
- [37] Pal S., Tak Y.K., Song J.M., [Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*](#), *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**:1712-1720 (2007).
- [38] Powers K.W., Brown S.C., Krishna V.B., Wasdo S.C., Moudgil B.M., Roberts S.M., [Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation](#), *Toxicol. Sci.*, **90**:296-303 (2006).
- [39] Jiang J., Oberdörster G., Biswas P., [Characterization of Size, Surface Charge, and Agglomeration State of Nanoparticle Dispersions for Toxicological Studies](#), *J. Nanopart. Res.*, **11**:77-89 (2009).
- [40] Keller A.A., Wang H., Zhou D., Lenihan H.S., Cherr G., Cardinale B.J., Miller R., Ji Z., [Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices](#), *Environ. Sci. Technol.*, **44**:1962-1967 (2010).
- [41] Pranami G., ["Understanding Nanoparticle Aggregation"](#), PhD Dissertation, Iowa State University, USA (2009).
- [42] Zhong Y., Peng P., Yu Z., Deng H., [Effects of Metals on the Transformation of Hexabromocyclododecane \(HBCD\) in Solvents: Implications for Solvent-Based Recycling of Brominated Flame Retardants](#), *Chemosphere*, **81**:72-78 (2010).
- [43] Wagoner E.R., Baumberg C.P., Peverly A.A., Peters D.G., [Electrochemical Reduction of 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane at Carbon and Silver Cathodes in Dimethylformamide](#), *J. Electroanal. Chem.*, **713**:136-142 (2014).
- [44] Fedurco M., Sartoretti C.J., Augustynski J., [Reductive Cleavage of the Carbon-Halogen Bond in Simple Methyl and Methylene Halides. Reactions of the Methyl Radical and Carbene at the Polarized Electrode/Aqueous Solution Interface](#), *Langmuir*, **17**:2380-2387 (2001).
- [45] Isse A.A., Falcioni L., Mussini P.R., Gennaro A., [Relevance of Electron Transfer Mechanism in Electrocatalysis: the Reduction of Organic Halides at Silver Electrodes](#), *Chem. Commun.*, **3**:344-346 (2006)

- [46] Strawsine L.M., Sengupta A., Raghavachari K., Peters D.G., [Direct Reduction of Alkyl Monohalides at Silver in Dimethylformamide: Effects of Position and Identity of the Halogen](#), *Chem. Electrochem.*, **2**:726–736 (2015).
- [47] Pretty S.D., Musa A.Y., Wren J.C., [Reactions of Bromide and Iodide Ions with Silver Oxide Films on Ag Substrates](#), *J. Electrochem. Soc.*, **160**:H13-H21 (2013).
- [48] Vojinovic V., Mentus S., Komnenic V., [Bromide Oxidation and Bromine Reduction in Propylene Carbonate](#), *J. Electroanal. Chem.*, **547**:109-113 (2003).
- [49] Brown L., Wolf J.M., Prados-Rosales R., Casadevall A., [Through the wall: Extracellular Vesicles in Gram-Positive Bacteria, Mycobacteria and Fungi](#), *Nature Rev. Microbiol.*, **13**:620–630 (2015).
- [50] Vaara M., [Antibiotic-Supersusceptible Mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*](#), *Antimicrob Agents Chemother.*, **37**:2255–2260 (1993)
- [51] Nikaido H., [Antibiotic Resistance Caused by Gram-Negative Multidrug Efflux Pumps](#), *Clin. Infect. Dis.*, **27**:S32-41 (1998)
- [52] Li W-R., Xie X-B., Shi Q-S., Zeng H-Y., OU-Yang Y-S., Chen Y-B., [Antibacterial Activity and Mechanism of Silver Nanoparticles on *Escherichia Coli*](#), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**:1115-1122 (2010)
- [53] Mirzajania F., Ghassempour A., Aliahmadi A., Esmaili M.A., [Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles on *Staphylococcus Aureus*](#), *Res. Microbiol.*, **162**:542–549 (2011)
- [54] Seltmann G., Holst O., [“The Bacterial Cell Wall”](#), Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2002)
- [55] Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A., [Peptidoglycan Structure and Architecture](#), *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**:149-167 (2008)