Agricultural Sci. J. 44 : 3 (Suppl.) : 286-289 (2013) ว. วิทย. กษ. 44 : 3 (พิเศษ) : 286-289 (2556)

การพัฒนาฟิล์มป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมของอนุภาคโลหะขนาดเล็กระดับนาโน

Development of Antimicrobial Film Composted with Metal Nanoparticles

กัญญารัตน์ สุวรรณทีป[1] ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์[1] และ อภิรดี อุทัยรัตนกิจ[1]

Kanyarat Suwannateep[1], Pongphen Jitareerat[1] **and** Apiradee Uthairatanakij[1]

Abstract

Cold storage is the simplest and easiest technology to delay plant senescence and growth of spoilage microbes. Although the temperature in cold rooms is low, many micro-organisms are able to grow on the walls, which might be a cause of fresh produce contamination leading to decay. Thus, this research aimed to develop antimicrobial films containing silver nano particles (Ag-NP) and platinum nano particles (Pt-NP) to use as wall attached film in storage rooms. The research was conducted by spraying Ag-NP and Pt-NP colloids at 3 ppm on the wall of a cold room (13°C, 80±3% RH), and then dried for 2 hours. Fungi and bacteria on treated walls were detected on days 0 (before treated), 1, 30 and 60. Both fungi and bacteria were reduced by Ag-NP and Pt-NP treatments within 30 days only, but Ag-NP treatment had more effect in suppressing fungi and bacteria than the Pt-NP treatment. Three coating substances (chitosan, shellac and sucrose fatty acid ester) were used to construct the anti-microbial film by mixing Ag-NP colloids with the coating substances. The result showed that only chitosan (CS) was able to set up as the film. Efficiency of 1% CS mixed with 5 ppm Ag-NP on the inhibition of fungal storage (*Penicillium* sp.) was investigated by dropping the mixture of CS and Ag-NP on PVC film (which was fixed on the plate glass). After being air dried, the spore of *Penicillium* sp. was spread on the tested film. PVC films spread with fungal spore, CS or Ag-NP alone were used as the controls. All films were incubated at 25±2°C for 30 min and the fungal count was analyzed. Reduction of the fungal amount was observed in Ag-NP alone and the mixture of CS and Ag-NP on PVC film by 1.34 and 3.06 colonies/cm^2, respectively, while the control (*Penicillium* sp. alone) was 23.12 colonies/cm^2.

Keywords: Coating substances, metal nanoparticles, microorganism

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาผลิตผลสดในห้องเย็นเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกที่สุดในชะลอการเสื่อมสภาพและการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุของการเน่าเสีย อย่างไรก็ตามแม้ว่าอุณหภูมิภายในห้องเย็นจะต่ำแต่ยังพบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดเจริญตามผนังห้องเย็นได้ ซึ่งอาจเป็นเหตุให้เกิดการปนเปื้อนลงสู่ผลิตผลและทำให้เกิดการเน่าเสียตามมา ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้พัฒนาฟิล์มป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่มีส่วนผสมของซิลเวอร์นาโนพาทิเคิล (Ag-NP) และแพลททินัมนาโนพาทิเคิล (Pt-NP) ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปเคลือบติดกับผนังห้องเย็น โดยสเปรย์สารแขวนลอย Ag-NP และ Pt-NP ความเข้มข้น 3 ppm ลงบนผนังห้องเย็น (13°C, 80±5% RH) ปล่อยให้แห้ง 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเชื้อบนผนังห้องเย็นในวันที่ 0 (ก่อนการสเปรย์), 1, 30 และ 60 วัน พบว่า Ag-NP และ Pt-NP ลดปริมาณเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียได้ภายใน 30 วันแรกเท่านั้น และการใช้ Ag-NP มีประสิทธิภาพดีกว่า Pt-NP เมื่อนำ Ag-NP มาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม โดยผสม Ag-NP กับสารเคลือบ 3 ชนิด (Chitosan (CS), Shellac และ Sucrose fatty acid ester) พบว่าสารเคลือบ CS เท่านั้นที่สามารถนำมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ การทดสอบประสิทธิภาพของฟิล์ม CS 1% ที่มีส่วนผสมของ Ag-NP 5 ppm ต่อการยับยั้งเชื้อราในห้องเย็น (*Penicilium* sp.) โดยหยดสารละลายผสมของ CS และ Ag-NP ลงบนแผ่นฟิล์ม PVC ที่ยืดให้ตึงกับจานแก้ว เมื่อฟิล์มแห้งจึงเกลี่ยสปอร์เชื้อราลงบนแผ่นฟิล์มทดสอบ สำหรับชุดควบคุมคือ แผ่นฟิล์ม PVC ที่เกลี่ยด้วยสปอร์เชื้อรา, ด้วยสารละลาย CS หรือด้วยสารแขวนลอย Ag-NP เพียงอย่างเดียว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25±2°C นาน 30 นาที และวิเคราะห์ปริมาณเชื้อรา พบว่า Ag-NP และฟิล์ม CS ที่ผสม Ag-NP มีประสิทธิภาพลดเชื้อราลดลงเหลือ 1.34 และ 3.06 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนในชุดควบคุม (แผ่นฟิล์ม PVC ที่เกลี่ยด้วยสปอร์เชื้อรา) มี 23.12 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร

คำสำคัญ: สารเคลือบผิว อนุภาคโลหะขนาดเล็กระดับนาโน เชื้อจุลินทรีย์

[1] คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10150

[1] School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10150

คำนำ

การสูญเสียคุณภาพของผลิตผลสดระหว่างการเก็บรักษาในห้องเย็นมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนผลิตผลตั้งแต่ในแปลงปลูก ตลอดจนการสะสมของเชื้อจุลินทรีย์ในห้องเย็น ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียคุณภาพของผลิตผลสดอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไปการเก็บรักษาผลิตผลสดในห้องเย็นที่ควบคุมอุณหภูมิต่ำเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยรักษาคุณภาพของผลิตผลสด ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ การควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ให้อยู่ในช่วง 85-95% ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตผลสดในห้องเย็น ช่วยลดการสูญเสียน้ำหนักสดของผลิตผลสดได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าสภาพอุณหภูมิต่ำในห้องเย็นจะช่วยชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดยังคงสามารถเจริญเติมโตได้เนื่องจากความชื้นสัมพัทธ์ภายในห้องเย็นค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ตามพื้นผนังต่างๆ อาจส่งผลให้ผลิตผลสดปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์พวก air borne pathogens หรือ spoilage fungi ได้ง่าย การพัฒนาฟิล์มติดผนังห้องเย็นที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์เป็นอีกเป้าหมายหนึ่งที่น่าสนใจและน่าท้าทายไม่น้อย และจากรายงานการวิจัยหลายๆ แหล่ง พบว่า อนุภาคของโลหะขนาดเล็กระดับนาโนกำลังเป็นที่น่าสนใจของนักวิชาการและผู้ประกอบการอุตสาหกรรมต่างๆ) เนื่องจากมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส (Lok *et al*., 2006; Rai *et al*., 2009) เช่น โลหะเงินขนาดเล็กระดับนาโน (Silver-nano particles; Ag-NP) และโลหะทองคำขาวขนาดเล็กระดับนาโน (Platinum-nano particles; Pt-NP) เป็นต้น นอกจากนี้สารเคลือบผิวหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์และสามารถนำมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ (Ko *et al*., 2002) และบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่น Shellac, Sucrose fatty acid ester และ Chitosan (McGuire and Hagenmaier, 2001; ผ่องเพ็ญ และคณะ, 2555; Hernandez-Munoz *et al*., 2008) เป็นต้น สุพัฒน์ (2552) ได้พัฒนาฟิล์มสำหรับบรรจุผลิตผลสดที่มีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง โดยการห่อผลมะม่วงด้วยฟิล์มคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลสที่ได้จากฟางข้าวมาผสมสารกำจัดเชื้อรา แล้วเก็บไว้ที่ 13°C ช่วยลดการเกิดโรคแอนแทรกโนส และรักษาคุณภาพของมะม่วงไว้ได้ ดังนั้นการพัฒนาฟิล์มที่มีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญของเชื้อราสำหรับติดผนังห้องเย็น เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราในห้องเย็นจึงมีความเป็นไปได้ งานวิจัยนี้จึงได้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ Ag-NP หรือ Pt-NP ในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผนังห้องเย็น และเพื่อเพิ่มความสามารถในการยึดเกาะของ Ag-NP หรือ Pt-NP กับผนังห้องเย็น จึงได้มีการนำไปผสมกับสารเคลือบผิวเพื่อขึ้นรูปเป็นฟิล์ม ซึ่งสามารถช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนโลหะหนัก และลดการสัมผัส Ag-NP หรือ Pt-NP โดยตรงของผู้ปฏิบัติงาน ทั้งนี้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงความสะอาดของห้องเย็นเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้อายุการเก็บรักษาของผลิตผลสดนานขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของซิลเวอร์-นาโนพาทิเคิล (Ag-NP)และแพลทินัม-นาโนพาทิเคิล (Pt-NP) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บนผนังห้องเย็น โดยสเปรย์สารแขวนลอย Ag-NP และ Pt-NP ความเข้มข้น 3 ppm ลงบนผนังห้องเย็นขนาด 100 cm^2 ทั้ง 4 ด้าน ซึ่งภายในห้องเย็นควบคุมอุณหภูมิ 13°C จำนวน 4 ซ้ำ (1 ด้าน เท่ากับ 1 ซ้ำ) หลังจากนั้นทำการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนผนังห้องเย็นด้วยวิธี Swab test หลังจากสเปรย์นาน 0 (ก่อนการสเปรย์ เป็นชุดควบคุม), 1, 30 และ 60 วัน บันทึกจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เจริญบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 28°C นาน 24 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณให้อยู่ในหน่วย CFU/cm^2 และ colonies/cm^2 ตามลำดับ และนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารเคลือบผิวที่มีส่วนผสมของ Ag-NP ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยนำ Ag-NP มาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม โดยผสม Ag-NP กับสารเคลือบ 3 ชนิด ได้แก่ 1% Chitosan, 10% Shellac และ 1% Sucrose fatty acid ester (SFE) หลังจากนั้นเลือกสารเคลือบที่มีส่วนผสมของ Ag-NP ซึ่งสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ดีที่สุด ซึ่งก็คือ 1% Chitosan ไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอย 5 ppm Ag-NP, 1% Chitosan, หรือสารละลายผสมระหว่าง 5 ppm Ag-NP กับ 1% Chitosan แล้วหยดลงบนฟิล์ม PVC ที่ตรึงไว้บนจานแก้ว โดยแต่ละทรีทเมนท์มี 3 ซ้ำ ขณะที่ฟิล์ม PVC ที่ตรึงไว้บนจานแก้วโดยไม่ได้หยดสารใดๆ เป็นชุดควบคุม (control) หลังจากนั้นใช้แท่งแก้วงอที่ผ่านการลนไฟแล้วทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ เกลี่ยสารละลายให้กระจายไปทั่วฟิล์ม PVC แล้วจึงปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิ 25± 2°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม จากนั้นหยดสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Penicillium* sp. ความเข้มข้น 4 log CFU/ml ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นฟิล์ม PVC แล้วเกลี่ยให้ทั่วจนแห้ง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25± 2 °C นาน 30 นาที แล้วทำการตรวจนับปริมาณเชื้อราด้วยวิธี swab test บันทึกจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่ขึ้นบนหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปคำนวณให้อยู่ในหน่วย colonies/cm^2 เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสเปรย์ Ag-NP และ Pt-NP ความเข้มข้น 3 ppm ลงบนผนังห้องเย็นนาน 1 วัน มีผลทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียลดลงอย่างมาก โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียเหลืออยู่เท่ากับ 58.3 และ 966.7 CFU/cm^2 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นก่อนการสเปรย์มีค่าเท่ากับ 1,891.7 CFU/cm^2 และพบว่า Ag-NP มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่า Pt-NP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การสเปรย์ Ag-NP และ Pt-NP ลงบนผนังห้องเย็นมีผลควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้นานถึง 60 วัน โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียบนผนังห้องเย็นหลังสเปรย์ Ag-NP และ Pt-NP นาน 30 วัน มีค่าเท่ากับ 66.7และ 16.7 CFU/cm^2 ตามลำดับ และเพิ่มขึ้นในวันที่ 60 เท่ากับ 916.7 และ 825.0 CFU/cm^2 ตามลำดับ (Figure 1a) สำหรับผลของ Ag-NP และ Pt-NP ต่อปริมาณเชื้อรา พบว่า Ag-NP มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ (0 colony/cm^2) นานถึง 30 วัน ในขณะที่ปริมาณเชื้อราเริ่มต้น 80 colonies/cm^2 และจะเริ่มตรวจพบการเจริญของเชื้อราบนผนังที่ผ่านการสเปรย์ Ag-NP ไปแล้ว 60 วัน แต่พบในปริมาณที่ต่ำคือ 20 colonies/cm^2 ขณะที่การสเปรย์ Pt-NP สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบริเวณผนังห้องเย็นได้นานเพียง 1 วันเท่านั้น โดยจะเริ่มพบการเจริญของเชื้อราในปริมาณต่ำภายหลังการสเปรย์ Pt-NP ไปแล้วนาน 30 และ 60 วัน (20 และ 60 colonies/cm^2 ตามลำดับ) (Figure 1b) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Ag-NP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราได้ดีกว่า Pt-NP และ Ag-NP มีผลในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย มีรายงานวิจัยพบว่า Ag-NP มีผลยับยั้งเชื้อ *E. coli* (Li *et al*., 2010) ยีสต์ (Kvitek *et al*., 2009) เชื้อรา *Candida* spp (Panacek *et al*., 2009) เป็นต้น โดยกลไกการยับยั้งเชื้อของ Ag-NP เกิดจากอนุภาคของ Ag-NP ไปจับยึดกับพื้นผิวของเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ เป็นสาเหตุทำให้โครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนแปลงและเสียหาย โดยไปมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์สูญเสียคุณสมบัติในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน เกิดช่องว่างของผนังเซลล์และรอยรั่ว ทำให้ของเหลวภายในเซลล์รั่วไหลออกมาภายนอกเซลล์ และนำไปสู่การตายในที่สุด (Rai *et al*., 2009) ขณะที่งานวิจัยของ Rosenberg *et al*. (1965) ศึกษาผลของ Platinum (Pt) พบว่า Pt สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli* ได้ จากการขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มของ Ag-NP ทั้งที่มีส่วนผสมของสารเคลือบผิว 3 ชนิด ได้แก่ Chitosan (CS), Shellac (SH) และ Sucrose fatty acid ester (SFE) พบว่า CS และ CS ที่มีส่วนผสมของ Ag-NP สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ ซึ่ง Rabea *et al*. (2003) รายงานว่า CS มีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์ของคาร์โบไฮเดรต สามารถนำมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ ส่วนการศึกษาผลของฟิล์ม CS ที่มีส่วนผสมของ Ag-NP ต่อการเจริญของเชื้อรา *Penicillium* sp. ที่แยกได้จากผนังของห้องเย็น โดยหยดสปอร์เชื้อราลงบนแผ่นฟิล์ม PVC ที่เคลือบด้วย CS (1%) ที่ผสมด้วย Ag-NP (5 ppm), บนแผ่นฟิล์ม PVC ที่เคลือบด้วย CS (ชุดควบคุม 1), บนแผ่นฟิล์ม PVC ที่เคลือบด้วย Ag-NP (ชุดควบคุม 2) และแผ่นฟิล์ม PVC ที่ไม่ได้เคลือบ (ชุดควบคุม 3) พบว่าแผ่นฟิล์ม PVC ที่เคลือบด้วย CS ผสมกับ Ag-NP และแผ่นฟิล์ม PVC ที่เคลือบด้วย Ag-NP มีปริมาณเชื้อรา (3.06 และ 1.34 colonies/cm^2 ตามลำดับ) น้อยกว่าแผ่นฟิล์ม PCV ที่เคลือบด้วย CS (9.17 colonies/cm^2) ในขณะที่แผ่นฟิล์ม PVC มีปริมาณเชื้อราเท่ากับ 23.12 colonies/cm^2 (Figure 2) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งเชื้อรานอกจากจะเป็นผลมาจาก Ag-NP แล้วยังเป็นผลมาจาก CS ซึ่งมีคุณสมบัติของประจุบวก จึงสามารถจับกับเยื้อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประจุลบได้ ทำให้เยื้อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เสียหาย และเกิดการรั่วไหลของ Cytoplasm และโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ (Lee *et al*., 1997)

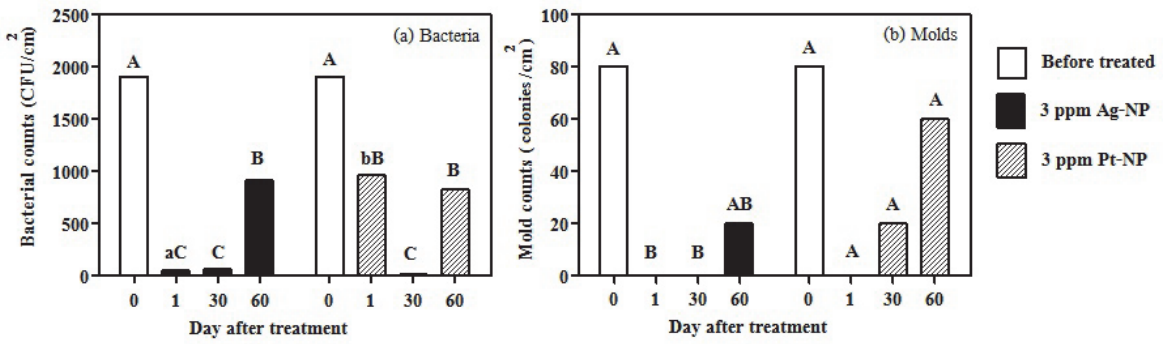

Figure 1 Amount of bacteria (a) and molds (b) on the cold room walls at 13°C after spraying with 3 ppm silver-nanoparticles (Ag-NP) and platinum-nanoparticles (Pt-NP) for 1, 30 for 60 day. Day 0 is a control (before treated).

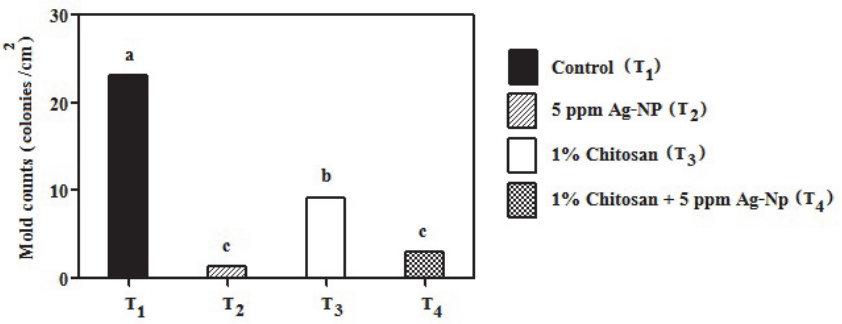

Figure 2 Amount of molds on PVC film or PVC film coated with 5 ppm Ag-NP, 1% chitosan and 1% chitosan composted with 5 ppm Ag-NP after PVC films were inoculated with spore suspension of *Penicillium* sp..

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Tsuyumu Shinji จาก Shizuoka University ประเทศญี่ปุ่น ที่อนุเคราะห์ แพลทินัม-นาโนพาทิเคิล และขอขอบคุณ ผศ.ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์ให้ ซิลเวอร์-นาโนพาทิเคิล เพื่อเป็นวัตถุดิบในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์, อภิรดี อุทัยรัตนกิจ และ ปิยะศักดิ ชอุ่มพฤกษ์. 2555. ผลของนาโนซิลเวอร์ร่วมกับสารเคลือบผิวเพื่อควบคุมเชื้อราที่ก้านขั้วผลสับปะรด. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 43 (3 พิเศษ): 653-656.

สุพัฒน์ คำไทย. 2552. พัฒนาเยื่อฟางข้าวเคลือบผลไม้ยับยั้งแอนแทคโนสในมะม่วง [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.thairath.co.th/content /edu/23764. [10 มิ.ย. 2556].

Hernandez-Munoz, P., E. Almenar, V. Del Valle, D. Velez and R. Gavara. 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ×ananassa*) quality during refrigerated storage. Food Chemistry 110: 428-435.

Ko, J.A., H.J. Park, S.J. Hwang, J.B. Park and J.S. Lee. 2002. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. International Journal of Pharmaceutics 249: 165-174.

Kvitek, L., M. Vanickova, A. Panacek, J. Soukupova, M. Dittrich, E. Valentova, R. Prucek, M. Bancirova, D. Milde and R. Zboril. 2009. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. Journal of Physical Chemistry 113: 4296-4300.

Lee, O.S., B.J. Ha, S.N. Park and Y.S. Lee. 1997. Studies on the pH-dependent swelling properties and morphologies of chitosan/calcium-alginate complied beads. Macromolecular Chemistry and Physics 198: 2971-2976.

Li, W.R., X.B. Xie, Q.S. Shi, H.Y. Zeng, Y.S. Ou-Yang and Y.B. Chen. 2010. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 85 : 1115-1122.

Lok, C.N., C.M. Ho, R. Chen, Q.Y. He, W.Y. Yu, H. Sun, P.K. Tam, J.F. Chiu and C.M. Chen. 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. Journal of Proteome Research 5: 916-924.

Mc Guire, R.G. and R.D. Hagenmaier. 2001. Shellac formulations to reduce epiphytic survival of coliform bacteria on citrus fruit postharvest. Journal of Food Protection 64: 1756-1760.

Panacek, A., M. Kolar, R. Vecerova, R. Prucek, J. Soukupova, V. Krystof, P. Hamal, R. Zboril and L. Kvitek. 2009. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. Journal of Biomaterials 30: 6333-6340.

Rabea, E. I., M. E. T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe and W. Steurbaut. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. Biomacromolecules (Review) 4(6): 1457-1465.

Rai, M., A. Yadav and A. Gade. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Journal of Biotechnology Advances 27: 76-83.

Rosenberg, B., R. van Camo and T. Krigas. 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from platinum electrode. Journal of Nature 205: 698-699.