

مقایسه تاثیر نسبت‌های مختلف نانو سیلور با محلول‌های ضد عفونی کننده بر میزان باکتری‌های شایع دهانی

دکتر فرید عباسی^۱ دکتر محمد نیاکان^{۲*} رویا حامدی^۳ الهام علی اصغر^۲ دکتر فرهود نجفی^۴ دکتر مصطفی فاطمی^۵

۱- استادیار گروه بیماری‌های دهان دانشکده ی دندانپزشکی دانشگاه شاهد تهران

۲- استادیار میکروبیولوژی دانشکده ی پزشکی دانشگاه شاهد تهران

۳- دانشجوی دندانپزشکی دانشگاه شاهد تهران

۴- استادیار پژوهشگاه علوم و فناوری رنگ دانشگاه تهران

۵- دانشجوی دکترای تخصصی (PhD) مواد دندانانی دانشگاه علوم پزشکی تهران-مرکز تحقیقات و تکنولوژی دندانپزشکی

خلاصه:

سابقه و هدف: سطوح و تجهیزات پزشکی در مراکز بهداشتی درمانی و دندانپزشکی مکرراً در معرض ترشحات عفونی قرار می‌گیرند. در مواردی که امکان استریلیزاسیون آن‌ها وجود نداشته باشد از مواد ضد عفونی کننده سریع الاثر استفاده می‌شود. در این مطالعه اثر ضد میکروبی محلول ضد عفونی کننده‌ی طراحی شده، تحت عنوان Nanex، با محلول‌های خالص نانو سیلور و دکونکس ۵۳ پلاس علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و سودوموناس آئروژینوزا مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها: این تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. برای تعیین غلظت موثر ضد باکتریایی محلول‌های فوق از تکنیک رقت‌های سریال و روش‌های سنجش حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) استفاده شد و در نهایت رشد باکتری‌ها مورد تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: برای باکتری استرپتوکوکوس موتانس میزان MIC و MBC محلول شماره ی ۴ از ترکیب (Nanex حاوی ۱۰۰ ppm نانو سیلور و ۲ درصد دکونکس) نسبت به سایر محلول‌ها کمتر است. همچنین برای سودوموناس آئروژینوزا محلول شماره ۷ Nanex (حاوی ۱۳۳ ppm نانو سیلور و ۱ درصد دکونکس) کم‌ترین میزان MIC و MBC را نشان داد.

نتیجه گیری: محلول طراحی شده‌ی Nanex در مقایسه با محلول‌های خالص نانو سیلور و دکونکس ۵۳ پلاس اثر ضد میکروبی قوی‌تر را نشان داد.

کلید واژه‌ها: ضد عفونی کننده، نانو سیلور، دکونکس ۵۳ پلاس، MIC، MBC

وصول مقاله: ۹۰/۲/۲۱ اصلاح نهایی: ۹۰/۴/۱۸ پذیرش مقاله: ۹۰/۵/۱۳

مقدمه:

دندانپزشکان و سایر افراد وابسته به این حرفه، در معرض خطر انواع عفونت‌های متقاطع قرار دارند.^(۱) معمولاً در مواقعی که نیازمند استفاده از وسایل استریل درمانی باشیم و امکان استریلیزاسیون با حرارت یا تعویض آن‌ها وجود نداشته باشد از

طی دهه‌های اخیر توجه به شیوع بیماری‌های عفونی و مسری در سراسر دنیا بیشتر شده است. به منظور کنترل و پیشگیری از انتقال آن‌ها دستورالعمل‌هایی در زمینه مدیریت و کنترل عفونت‌ها در محیط‌های بهداشتی و درمانی ارائه شده است.^(۱-۳)

الف-۱) تهیه محلول نانو ذرات نقره: در این مطالعه تجربی، جهت تهیه نانوذرات نقره کلوییدی در مرحله اول نیترات نقره ($AgNO_3$) تحت یک احیا کننده‌ی پلی آلدئیدی قرار گرفته و بدین ترتیب Ag^+ با دریافت الکترون به Ag فلزی تغییر پیدا کرد. ذرات نقره تمایل به رسوب و تجمع در کنار هم داشته که برای جلوگیری از خوشه‌ای شدن ذرات از یک پلیمر آکرلیک فعال کننده‌ی سطح در حضور آب استفاده گردید. اثر این فعال کننده‌ی سطحی موجب کاهش تمایل ذرات نقره در حال احیا برای به هم چسبیدن شد. در نهایت محلول بدست آمده دارای ذرات نقره در اندازه‌ی کمتر از ۱۰۰ نانومتر بود. جهت تایید اندازه ذرات (intensity) آزمایش بر روی محلول جدید در انستیتو مالورن آلمان انجام گرفت. (۲۳) این محلول حاوی ۲۰۰ ppm از نانو ذرات نقره با میانگین اندازه ی ۳۴/۶ نانومتر بود.

الف-۲) تهیه محلول دکونکس ۵۳ پلاس: در این مطالعه از محلول تجاری با نام دکونکس ۵۳ پلاس ساخت شرکت: Borer Chemie-Switzerland با سری ساخت N-22330 استفاده گردید.

الف-۳) طراحی و ساخت محلول Nanex: محلول جدید با نام Nanex از فرمولاسیون ترکیبی نانوسیلور و دکونکس ۵۳ در پنج رقت مختلف تهیه شد. بشرح جدول ۱ محتویات محلول‌های مورد آزمایش نمایش داده شده است.

جدول ۱- محتویات محلول‌های مورد آزمایش

محتویات	شماره محلول
نام تجاری : دکونکس ۲٪	۱
نانوسیلور 200 ppm	۲
محلول Nanex حاوی 200ppm نانوسیلور و دکونکس ۲٪ (نسبت ۱ به ۱۰۰)	۳
محلول Nanex حاوی 100ppm نانوسیلور و دکونکس ۲٪ (نسبت ۱ به ۲۰۰)	۴
محلول Nanex حاوی 200ppm نانوسیلور و دکونکس ۱٪ (نسبت ۱ به ۵۰)	۵
محلول Nanex حاوی 400ppm نانوسیلور و دکونکس ۱٪ (نسبت ۱ به ۲۵)	۶
محلول Nanex حاوی 133ppm نانوسیلور و دکونکس ۱٪ (نسبت ۱ به ۱۲.۵)	۷

مواد ضد عفونی کننده موثر و سریع الاثر استفاده می‌شود. (۸-۴) امروزه یکی از ضد عفونی کننده‌های شایع و مصرفی در جامعه پزشکی و دندانپزشکی، محلول دکونکس ۵۳ پلاس می‌باشد که حاوی مواد فعال Alkyl propylenediamine- 1.5- N,N- didecyl-n- و bisguasidinium acetate methylopolyl- (oxethyl)- ammonium per opianate است که نمونه‌ای از نسل جدید ترکیبات چهارتایی آمونیوم بوده و خاصیت ضد باکتریایی (باکتریوسیدال)، داشته و همچنین ادعا می‌شود تاثیر ضد قارچی (فونگیسیدال) نیز دارد. (۲) خواص ضد میکروبی ترکیبات نقره، سالهای مدیدی است که شناخته شده است. (۱۴-۹) ، اما اخیراً به دلیل ساخته شدن آن به صورت نانوذرات که خوشه‌هایی از اتم‌های نقره به قطر ۱۰۰-۱ نانومتر هستند ، سطح تماس نقره افزایش یافته و خاصیت ضد میکروبی آن تا بیش از ۹۹ درصد افزایش پیدا کرده است. (۱۵-۱۹) امروزه از ترکیبات مختلف نانوذرات نقره به عنوان نسل جدیدی از عوامل آنتی میکروبیال برای مصارف مختلف پزشکی استفاده میشود. (۲۲-۲۰) بنابراین به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی منحصر به فرد محلول حاوی نانوذرات نقره و هم چنین قدرت ضد عفونی کنندگی بالای ترکیبات دکونکس، محلول جدیدی تحت عنوان Nanex (تهیه شده از ۵ رقت مختلف نانو سیلور و دکونکس ۵۳ پلاس) فرموله شد ، سپس اثر ضد میکروبی آن با محلول‌های خالص نانوسیلور با غلظت ۲۰۰ ppm و دکونکس ۵۳ پلاس ۲ درصد، از طریق تعیین قدرت مهار رشد باکتری‌ها (MIC=Minimum inhibitory concentration) و قدرت کشتن باکتری‌ها (MBC=Minimum bactericidal concentration) علیه دو گونه از باکتری‌های مهم در ایجاد بیماری‌های دهان و دندان شامل: سودوموناس آئروجینوزا و استرپتوکوکوس موتانس مورد بررسی و سنجش قرار گرفت. بخش‌های آزمایشگاهی این تحقیق در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد و در سال ۱۳۸۹-۱۳۹۰ انجام گردید.

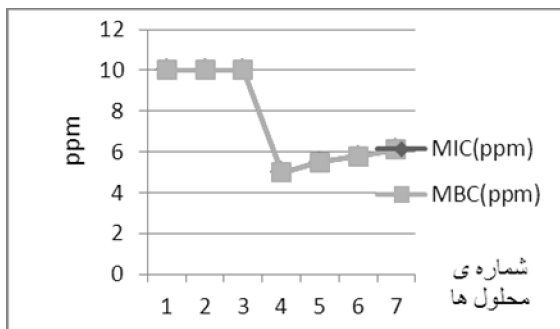
مواد و روش‌ها:

تحقیق به روش تجربی و بشرح زیر انجام گرفت.

د-۲) روش تعیین مقدار MBC
MBC، حداقل غلظتی از ترکیب مورد بررسی است که حداقل باعث کاهش تعداد باکتری‌ها بعد از بیست و چهار ساعت به حدود یک هزارم تعداد باکتری‌ها در زمان صفر شود. روش تعیین مقدار MBC تقریباً شبیه به روش تعیین MIC است. با این تفاوت که از غلظت لوله MIC به بالا، عمل شمارش باکتری‌ها به روش رقت‌های متوالی صورت گرفت.

یافته‌ها:

مقادیر MIC و MBC این ۷ محلول علیه باکتری‌های فوق در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. برای استرپتوکوکوس موتانس میزان MIC و MBC محلول شماره ۴ (حاوی ۱۰۰ ppm نانوسیلور و ۲ درصد دکونکس ۵۳ پلاس) در مقایسه با سایر محلول‌ها کمتر بوده و در ضمن میزان آن‌ها تقریباً با هم برابر شدند: ۵ ppm و این میزان معادل ۱/۲ مقادیر MIC و MBC محلول‌های خالص دکونکس ۲ درصد (محلول شماره ۱) و نانوسیلور ۲۰۰ ppm (محلول شماره ۲) بود.



نمودار ۱- میزان MIC و MBC هفت محلول مورد آزمایش علیه استرپتوکوکوس موتانس. مقادیر MIC هفت محلول فوق با MBC برابر می باشد و لذا نمودارهای آنها بر یکدیگر منطبق شده است.

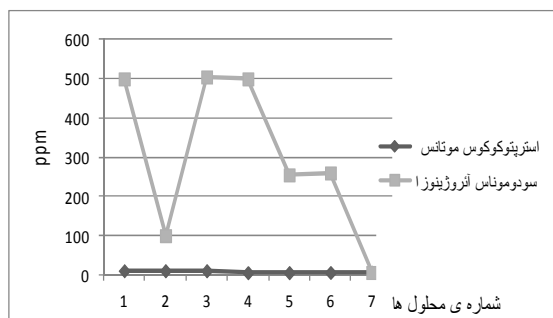
ب) مواد و وسایل: مواد شیمیایی و محیط‌های کشت میکروبی به کار رفته در این آزمایش، از شرکت مرک آلمان (Merck Co.) و وسایل پلاستیکی از جمله پلیت‌های کشت از شرکت فرازین طب ایران تهیه شد.

ج) باکتری‌های مورد بررسی: در این مطالعه از دو گونه باکتری استاندارد شامل: استرپتوکوکوس موتانس ATCC تهیه شده (35668)، سودوموناس آئروجینوزا ATCC (27853) و از کلکسیون باکتری‌ها در بخش میکروب‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه شاهد استفاده گردید.

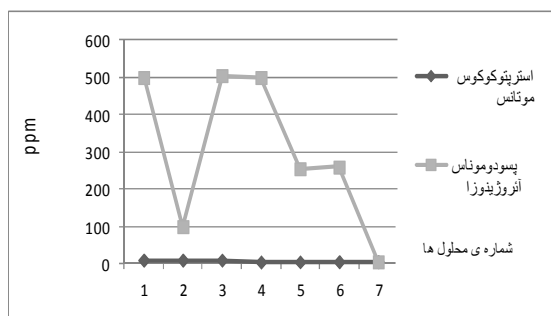
د) سنجش میزان MIC و MBC: این تحقیق به روش رقت‌سازی سریال در لوله های آزمایش بر اساس پروتکل CLSI در دمای ۲۵ درجه آزمایشگاه انجام گرفت و حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانو ذرات نقره کلوبیدی در غلظت ۲۰۰ ppm، دکونکس ۵۳ پلاس ۲ درصد و محلول‌های ساختگی Nanex در ۵ رقت مختلف از محلول‌های فوق، برای باکتری‌های مذکور انجام و نتایج بررسی شد.

د-۱) روش تعیین مقدار MIC

MIC، حداقل غلظتی از ماده ضد میکروبی است که مانع از ایجاد کدورت حاصل از رشد باکتری در محیط کشت میکروبی مایع (Broth) می‌شود. بعد از بررسی اثر ضدباکتریایی، نمونه‌های دارای اثر بازدارندگی به روش ماکرودایلوشن اصلاح شده مورد بررسی قرار گرفتند تا مقادیر MIC آن‌ها بدست آمد. برای این منظور رقت‌های سریال (خالص و ۱۰۰-۱۳۳-۲۰۰-۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۲ میلی لیتر محیط کشت مایع مولر هینتون برات (Muller Hinton Broth) تهیه گردید. متعاقباً از سوسپانسیون تازه باکتری با کدورت برابر ۰/۵ استاندارد مک فارلند (برابر $10^8 \times 1/5$ باکتری در میلی لیتر) مقدار ۲۰ میکرولیتر به هر لوله محیط کشت اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکو باتور قرار گرفت و شمارش تعداد باکتری‌ها در زمان ۲۴ ساعت بعد از انکوباسیون نیز انجام شد.



نمودار ۳- مقایسه مقادیر MBC بر حسب باکتریهای مورد بررسی با تفکیک نوع محلول

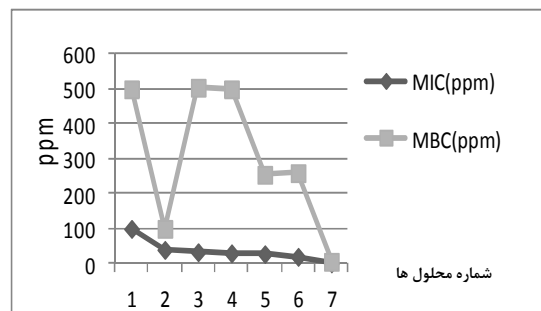


نمودار ۴- مقایسه ی مقادیر MIC بر حسب باکتری های مورد بررسی به تفکیک نوع محلول

بحث:

در این تحقیق نشان داده شد که ترکیب نانوسیلور و دکونکس اثر قدرت افزایشی روی هم داشته لذا خواص ضد میکروبی یکدیگر را تشدید می کنند، مخصوصاً در مورد سودوموناس آئروژینوزا اثر ضد باکتریایی به شدت افزایش پیدا کرده بود. از طرفی در این باکتری میزان MIC و MBC محلول نانوسیلور خالص ۲۰۰ ppm از دکونکس ۲ درصد نیز کم تر بود اما در مورد استرپتوکوکوس موتانس مقادیر MIC و MBC محلول نانوسیلور خالص ۲۰۰ ppm و دکونکس ۲ درصد تقریباً با یکدیگر برابر بود. بنابراین محلول نانوسیلور خالص اثر آنتی میکروبیال مساوی و حتی در مواردی بیشتر از دکونکس ۵۳ پلاس دارد همچنین نتایج این مطالعه

همچنین برای باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا، همان طور که در نمودار ۲ نمایش داده شده است، محلول شماره ۷ (حاوی ۱۳۳ ppm نانوسیلور و ۱ درصد دکونکس) در مقایسه با سایر محلول ها کمترین میزان MIC و MBC را دارا است.



نمودار ۲- میزان MIC و MBC سودوموناس آئروژینوزا بر حسب نوع محلول

($MBC = 5/8$, $MIC = 1ppm$) و میزان MIC

محلول‌های خالص دکونکس ۲ درصد و نانوسیلور ۲۰۰ ppm به ترتیب حدود ۱۰۰ که ۲۶ برابر بیشتر از محلول شماره ۷ می‌باشد

میزان MBC محلول‌های خالص دکونکس ۲ درصد و نانوسیلور ۲۰۰ ppm به ترتیب حدود ۸۶ که ۱۷ برابر بیشتر از MBC محلول شماره ۷ بود (بالا بودن حد این شاخص‌ها نشانگر کم تاثیر بودن ماده میباشد).

در ضمن نتایج حاصل از مقایسه MIC و MBC بین دو محلول دکونکس خالص ۲ درصد (شماره ۱) و نانوسیلور خالص ۲۰۰ ppm (شماره ۲) نشان داد که در مورد استرپتوکوکوس موتانس میزان MIC و MBC محلول شماره ۱ و ۲ برابر با یکدیگر و معادل ۱۰ ppm می‌باشد،

اما برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا، MIC و MBC محلول خالص دکونکس به ترتیب ۴ و ۵ برابر بیشتر از محلول خالص نانوسیلور ۲۰۰ ppm است. در نمودارهای ۳ و ۴ مقایسه‌ی مقادیر MIC و MBC بر حسب باکتری‌های مورد بررسی به تفکیک هفت محلول مورد آزمایش نشان داده شده است.

اورئوس و سالمونلاتیفی موریوم مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که اثر آنتی‌باکتریال ذرات نانوسیلور وابسته به دوز می‌باشد و این ذرات علیه باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مؤثرترند.^(۲۶)

همچنین در مطالعه Ruparefica و همکاران در سال ۲۰۰۸، اثر آنتی‌باکتریال پارسیکل‌های نانوسیلور بر علیه ۴ گونه اشرشیاکلی، ۳ گونه از باسیلوس سوبتیلیس و ۳ گونه از استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد^(۲۷) و ضمن تأیید مطالعه‌ی آقای Shrivastava نشان دادند که ذرات نانوسیلور علیه باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مؤثرتر است که نتایج حاصل از این دو مطالعه در تایید نتایج مطالعه‌ی اخیر ما می‌باشد.

نتیجه‌گیری:

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که محلول طراحی شده و پیشنهادی با نام "Nanex" از محلول‌های خالص نانوسیلور و دکونکس ۵۳ پلاس تجاری اثر آنتی‌باکتریال بیشتری داشته و اثر ضد میکروبی آن علیه باکتری شاخص گرم منفی در مقایسه با باکتری گرم مثبت بیشتر می‌باشد.

بنابراین محلول‌های نانوسیلور به همراه دکونکس ۵۳ پلاس اثر آنتی‌باکتریال یکدیگر را تشدید کرده و محلول جدید پیشنهادی می‌تواند به عنوان یک ماده ضد عفونی کننده قوی در جایگزینی محلول‌های ضد عفونی کننده رایج در مصارف پزشکی و دندانپزشکی و بهداشت عمومی، خصوصاً به منظور پیش‌گیری از عفونت‌های بیمارستانی مطرح باشد.

نشان داد که تاثیر نانوسیلور علیه باکتری‌های گرم منفی از گرم مثبت بیشتر می‌باشد. در مطالعات خارج و داخل کشور تحقیق مشابهی در مورد مقایسه اثر آنتی‌باکتریال محلول نانوسیلور و دکونکس از طریق تعیین MIC و MBC به صورت توام صورت نگرفته است و مطالعات انجام شده عمدتاً به بررسی اثر ضد میکروبی محلول نانوسیلور پرداخته‌اند.^(۱۲،۲۳)

در مطالعه‌ی kyoung-Hwcn ch و همکاران در سال ۲۰۰۹، اثر آنتی‌میکروبیال نانوسیلور علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و اشرشیا کلی را از طریق تعیین میزان MIC مورد سنجش قرار دادند و نشان دادند که حد MIC ذرات نانو نقره برای استرپتوکوکوس موتانس و اشرشیاکلی به ترتیب ۵۰ و ۶۰ ppm می‌باشد.^(۲۳) همچنین در مطالعه‌ی انجام شده توسط petica و همکاران در سال ۲۰۰۸ که در آن اثر نانوذرات نقره کلوییدی را با غلظت ۳۰۰ ppm را بر سه سویه سودوموناس آئروجینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی سنجیدند، طبق نتایج ارائه شده از این تحقیق مقادیر MIC حاصل از نانوذرات علیه باکتری‌های فوق به ترتیب برابر با ۳۲،۷ و ۳۱ ppm بود.^(۲۴) بنابراین میزان مقادیر MIC به دست آمده از این دو تحقیق با نتایج کار ما متفاوت است که این مغایرت می‌تواند به دلیل تفاوت در غلظت و همچنین اندازه و شکل نانوذرات به کار رفته و نیز نوع ترکیب سورفاکتانت و پایدارکننده باشد لذا این ویژگی‌های نانوذرات می‌تواند بر خاصیت ضد میکروبی آن موثر باشد. همچنین در مطالعه‌ی Morones و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز که به بررسی خاصیت آنتی‌باکتریال نانوسیلور با غلظت ۱۵۰ ppm در سه اندازه‌ی مختلف بر روی استافیلوکوکوس اورئوس پرداختند، نشان دادند که اثر باکتریوسیدال ذرات نانوسیلور وابسته به سایز می‌باشند و هرچه ذرات کوچکتر باشند به دلیل افزایش سطح تماس اثر آنتی‌باکتریایی آن‌ها افزایش می‌یابد ضمناً در این مطالعه نشان داده شد که علاوه بر اندازه، مورفولوژی ذرات نیز مؤثر است.^(۲۵)

Shrivastava و همکاران در سال ۲۰۱۰ در طی تحقیقی اثر آنتی‌باکتریال نانوسیلور را بر روی اشرشیاکلی، استافیلوکوک

References:

- 1-Taiwo JO, Aderinokun GA. Assessing Cross Infection Prevention Measures at the Dental Clinic University College Hospital. *J Med Sci.* 2002 Sep;31(3):213-7.
- 2-Saburi A, Fallah F, Dastgiri M. Evaluation of Antimicrobial Effect of Micro 10 and Deconex 53plus on Dental Instruments. *J Islamic Dental Association.* 2008 Sep; 18(4):49-55.
- 3-Association Report. Council on Dental Therapeutics: Quaternary Ammonium Compounds not Acceptable for Disinfection of Instruments and Environmental Surfaces in Dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1978 Nov; 97(5):855-6.
- 4-Lochner N, Malam Y, Seifalian A. Silver Nanoparticle Enhanced Immunoassays: One Step Real Time Kinetic Assay for Insulin in Serum. *J Pharm Biopharm.* 2003 Nov; 56(3):469-477.
- 5-Liesje S, Bart D, Paul V, Benny F, G Pycke, Verstraete W, Boon N. The Antibacterial Activity of Biogenic Silver and its Mode of Action. *J Microbial Biotechnology.* 2011 Jul; 91(1):153-62.
- 6-Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. 2010 Nov; 23;4(11):6903-13. Epub 2010 Oct 22.
- 7-Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a New Generation of Nanoproduct in Biomedical Applications. *J Trends Biotechnol.* 2010 Nov;28(11):580-8. Epub 2010 Aug 18.
- 8-Sotiriou GA, Pratsinis SE. Antibacterial Activity of Nanosilver Ions and Particles. *J Environ Sci Technol.* 2010 Sep; 15(44):65-94.
- 9- Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW. Nanoparticles: Pharmacological and Toxicological Significance. *J Pharmacol.* 2007 Mar; 150(5):552-8.
- 10-Hsu SH, Tseng HJ, Lin YC. The Biocompatibility and Antibacterial Properties of Waterborne Polyurethane-Silver Nanocomposites. *J Biomaterials.* 2010 Sep; 31(26):6796-808.
- 11- De Gusseme B, Sintubin L, Baert L, Thibo E, Hennebel T. Biogenic Silver for Disinfection of Water Contaminated with Viruses. *J Environ Microbiol.* 2010 Feb; 76(4):1082-7.
- 12-Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT. The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. *J Nanotechnology.* 2005 Oct; 16(10):2346-53.
- 13-Lee HY, Park HK, Lee YM, Kim K, Park SB. A Practical Procedure for Producing Silver Nano Coated Fabric and its Antibacterial Evaluation for Biomedical Applications. *J Chem Commun.* 2007 Jul; 28(28):2959-61.
- 14-Vignesh N, Kathe AA, Varadarajan PV, Nachane RP, Balasubramanya RH. Functional Finishing of Cotton Fabrics using Silver Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007 Jun; 7(6):1893-7.
- 15-Cao XL, Cheng C, Ma YL, Zhao CS. Preparation of Silver Nanoparticles with Antimicrobial Activities and the Researches of their Biocompatibilities. *J Mater Sci Mater Med.* 2010 Oct; 21(10):2861-8.
- 16-Woo Kyung J, Hye Cheong K, Ki Woo K, So Hyun K, Yong Ho P. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Sep; 74(21):78-107.
- 17-Carlson C, Nachane RP, Buruntea N, Panzarub K. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *J PhysChem.* 2008 Oct; 112(43):13608-19.
- 18- Wang Q, Yang W, Yang X, Wang K, Huo X. Biosynthesis of silver nanoparticles using sun-dried mulberry leaf. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011 Apr; 11(4):3330-5.
- 19- Status report. CDA Council on Dental Materials and Devices. Alternative alloys for use in crown and bridge procedures. *J Can Dent Assoc.* 1980 Oct; 46(10):593-8.
- 20- Kaviya S, Santhanalakshmi J, Viswanathan B, Muthumary J, Srinivasan K. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Citrus Sinensis Peel Extract and its Antibacterial Activity. *J Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2011 Aug; 79(3):594-8.
- 21-Rai M, Yadav, A, Gade A. Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials, *Biotechnology Advances.* 2009 Jan-Feb;27(1):76-83.

- 22-Virender K. Sharma, Ria A. Yngard, Yekaterina Lin. *Silver Nanoparticles: Green Synthesis and their Antimicrobial Activities. Materials Science and Engineering. 2008, 152 (3): 22-27*
- 23-kyung-Hwcn cho, Hye Cheong Koo, Ki Woo Kim Ho Park. *Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli, Appl environ Microbiol. J ADA. 2009; 74(7):2171-8.*
- 24-Petica A, Gavariliu A, M.lungue K, Buruntea N, Panzarub K. *Colloidal Silver Solutions with Antimicrobial Properties. J Material Science. 2008 Feb; 15(14):22-87*
- 25-Morones, J., Asharani V. *The Bactericidal Effect of silver Nanoparticles Against Staphylococcus Aureus. J Nanotechnology. 2005 Sep; 16(19): 213–235*
- 26-Shrivastava S, jyung woo, lungue M. *Characterization of Enhanced Antibacterial Effects of Nano Silver Nano Particles. J Nanotechnology. 2010 Jan; 25(12):103– 125.*
- 27-Ruparefca A, Black RJ. *Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and there Activity. J PhysChem. 2009 Feb; 10(12):168–188.*