Archive of SID

فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال دوم، شماره ۶، بهار ۱۳۸۹

بررسی مقایسه ای اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره و نگهدارنده بنزوات سدیم در فرآورده بهداشتی (دهان شویه)

صدیقه مهرابیان[۱]، مرضیه فتاحی دولت آبادی[۲*] و مریم ابراهیمی تاج آبادی[۳]

[۱]. گروه بیولوژی، دانشگاه تربیت معلم ۲. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ۳. گروه بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز

چکیده

نگهدارنده ها برای جلوگیری از آلودگی در طول تولید مواد بهداشتی و همچنین در زمان مصرف مورد نیازند. در این مطالعه توان ضد میکروبی نگهدارنده شیمیایی بنزوات سدیم ۰/۱٪ و نانو ذرات نقره با غلظت ppm ۰/۴ در دهان شویه مورد بررسی قرار گرفته است. اثر ضد میکروبی این دو با انجام روش مواجهه بر روی باکتری های گرم مثبت از قبیل *Streptococcus mutants, Staphylococcus aureus* و باکتری های گرم منفی شامل *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* و مخمر *Candida albicans* انجام شد. نتایج بدست آمده از روش مواجهه تفاوت معنی داری را بین اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره (ppm ۰/۴) و سدیم بنزوات به غلظت ۰/۱٪ بر روی میکروارگانیسم های مورد بررسی نشان داد، به غیر از *S.aureus* و *S.mutans* که تفاوت معنی داری وجود نداشت ($p>0/05$). بررسی کلی نتایج نشان داد که نانوذرات نقره دارای خاصیت آنتی میکروبیال بالایی در غلظت های بسیار کم می باشند و فعالیت آنتی میکروبیال آن بیشتر یا برابر با بنزوات سدیم است همچنین در صورت استفاده ی همزمان آن با بنزوات سدیم در دهان شویه اثر آنتی میکروبیال افزایش می یابد.

واژگان کلیدی: دهان شویه، نانوذرات نقره، نگهدارنده، بنزوات سدیم.

مقدمه

نگرانی در مورد کارایی و اثر ضدمیکروبی نگهدارنده ها که در تهیه‌ی اکثر مواد آرایشی و بهداشتی ضروری می‌باشند، در حال افزایش است. از نگاهدارنده های مواد و بهداشتی می‌توان ترکیباتی مانند فنوکسی اتانول، پارابن‌ها، ترکیبات چهارتایی آمونیوم و بنزوات ها را نام برد، که مستقیماً از خود این مواد یا مشتقات آنها در محصولات آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود (۱). بنزوئیک اسید نگهدارنده‌ای است که اثر ضدمیکروبی خود را با ورود به داخل سلول و تغییر pH به ۵ یا کمتر باعث کاهش ۹۵ درصدی تخمیر بی هوازی گلوکز به واسطه فسفو فروکتو کیناز می‌شود (۲). همچنین، اسیدهای آلی ضعیف در مقادیرکمتر ازغلظت مهارکنندگی باعث استرس اکسیداتیو می‌شوند که این عامل، باعث اختلال در هوموستازی غشا و امکان بی‌نظمی در فیزیولوژی میتوکندریایی می‌شود (۳). اختلال در سازماندهی و هومئوستازی غشا ممکن است در شکلهای متنوع ظاهر شود که محتمل ترین آنها اختلال غیراختصاصی در قابلیت نفوذ پذیری انتخابی غشا است که به موجبات مرگ سلول باکتری را فراهم می‌کند (۴). همچنین تغییر در سیالیت غشا و سازماندهی بخش‌های کوچکتر منجر به اختلال در مسیرهای تبادلی غشاهای داخل سلولی مانند ماکرواتوفاژی می شود (۵).

از زمانهای بسیار دور فلز نقره به عنوان عامل ضد میکروب در پزشکی سنتی کاربرد داشته است (۶) و به

www.SID.ir

Archive of SID

دنبال آن نانو ذرات نقره از نظر داشتن خواص ضد میکروبی مورد مطالعه قرار گرفته اند (۷). به طور کلی مشخص شده است که نانو ذرات نقره امکان اتصال به دیواره سلولی را دارند، بنابراین در نفوذ پذیری و تنفس سلولی اختلال ایجاد می‌کنند. نانو ذرات همچنین امکان نفوذ به داخل سلول را دارند و به واسطه واکنش با ترکیبات محتوی فسفر و سولفور مانند DNA و پروتئین باعث آسیب میشوند.از دیگر علل خواص باکتریسیدالی نانو ذرات، رهاسازی یون‌های نقره از این ذرات می‌باشد (۸). البته این تنها علت نیست چرا که نانو ذرات با داشتن نسبت سطح به حجم بالا قادر به واکنش نزدیک با غشاهای میکروبی می باشند (۹).

هدف از این مطالعه مقایسه توان ضدمیکروبی نانوذرات نقره و بنزوات سدیم (نمک اسید بنزوئیک) به عنوان نگهدارنده در دهان شویه با استفاده از روش مواجهه (Challeng test) می باشد.

مواد و روش ها

محلول نانوذرات

محلول کلوئید نانوذرات نقره LS که از شرکت نانو نصب پارس تهیه شد. غلظت نقره در محلول 4000ppm و ذرات دارای شکل حلقوی و قطری مابین ۱۰-۴۰nm بودند. همچنین بنزوات سدیم به صورت محلول در دهانشویه مورد استفاده قرار گرفت.

میکروارگانیسم های مورد استفاده

Escherichia coli ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027، به عنوان باکتری‌های گرم منفی و *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 به عنوان باکتری های گرم مثبت و *Candida albicans* ATCC 10231 به عنوان مخمر استفاده شد. هر کدام از سویه های باکتریایی روی سطح اسلنت مولر آگار کشت داده شدند و برای رشد مخمر از اسلنت سابرو دکستروز آگار استفاده شد. محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگزاری شدند، سپس میکروارگانیسم ها با استفاده از لوپ استریل در شرایط آسپتیک به سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ کلرید سدیم انتقال داده می شوند تا کدورت سوسپانسیون حاصل در دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۶۰۰nm به میزان ۰/۱ تنظیم شود، که این مقدار معادل CFU/ml 10^8 می‌باشد. از سوسپانسیون حاصل ۱ میلی لیتر برداشته و به ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی انتقال داده شد و از سوسپانسیون آخر برای تلقیح استفاده می شود.

مقایسه ی فعالیت ضدمیکروبی و اثر نگهدارندگی نانو ذرات نقره و بنزوات سدیم

برای مقایسه اثر نگهدارندگی نانوذرات نقره و بنزوات سدیم از روش مواجهه استفاده شد(۱۲و۱۱،۱۰). در این روش برای هر میکروارگانیسم، ۴ نمونه که به ترتیب حاوی ۱۰۰ml دهان شویه بدون نگهدارنده، دهان شویه‌های حاوی ۰/۱٪ بنزوات سدیم، دهان شویه حاوی نانوذرات نقره با غلظت ۰/۴ppm و دهان شویه حاوی هر دو نگهدارنده تهیه شد. سپس به هرکدام از نمونه ها ۰/۱ml از سوسپانسیون میکروبی که این حجم محتوی CFU 1×10^6 میکروارگانیسم می باشد، تلقیح شد. سپس در فواصل زمانی، ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه مقدار ۱ml از نمونه را برداشته و پس از رقیق سازی مناسب به محیط مولر آگار انتقال می دهیم. محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگزاری شدند و بعد از آن تعداد کلنی‌های تشکیل شده شمارش شدند. برای داده های بدست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه، P value محاسبه شد و P value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان وجود اختلاف معنی دار بین اثر ضد میکروبی نانو ذرات نقره و بنزوات سدیم در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

روش مواجهه با دو بار تکرار انجام شد و با شمارش تعداد کلنی ها و انتقال داده‌ها به نرم افزار spss با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه محاسبات آماری صورت گرفت.

مقادیر P value و حداقل زمان لازم برای مهار کامل رشد میکروارگانیسم در جدول (۱) آورده شده است. P value<0.05 نشان دهنده‌ی وجود تفاوت معنی دار بین دو تیمار مورد بررسی است. با مقایسه‌ی P value محاسبه شده به این نتیجه می‌رسیم که بین اثر نگهدارندگی نانوذرات نقره و بنزوات سدیم در دهان شویه

www.SID.ir

Archive of SID

برای تمام میکروارگانیسم های مورد بررسی اختلاف معنی داری وجود داشت، به غیر از *S. aureus* و *S. mutans* که اثر نگهدارندگی هر دو برای این دو باکتری یکسان بود ($P>0.05$)با این تفاوت که حداقل زمان لازم برای مهار کامل *S. aureus* ۱۰دقیقه و برای *S. mutans* دقیقه بود. بیشترین اختلاف معنی‌دار به ترتیب مربوط به باکتری *E. coli* ($P=0.0046$)، *C. albicans* ($P=0.014$) و در آخر *P. aeruginosa* ($P=0.021$) می‌باشد. روند کاهش تعداد میکروارگانیسم ها در دهان شویه محتوی سدیم بنزوات و دهان شویه حاوی نانودرات نقره در فواصل زمانی (۱۰-۰) دقیقه بر روی نمودارهای ۵-۱ قابل مشاهده است. با توجه به داده های جدول و نمودارها، مدت زمان لازم برای مهار کامل رشد میکروارگانیسم ها توسط نانوذرات نقره (۰/۴ppm) کمتر از بنزوات سدیم است. به غیر از *S. aureus* و*S. mutans* که زمان لازم برای مهار رشد هر دو برابر است. با استفاده هم زمان نانوذرات نقره و بنزوات سدیم در دهان شویه، برای تمام میکروارگانیسم‌های مورد بررسی زمان مهار کامل رشد به صفر کاهش می یابد.

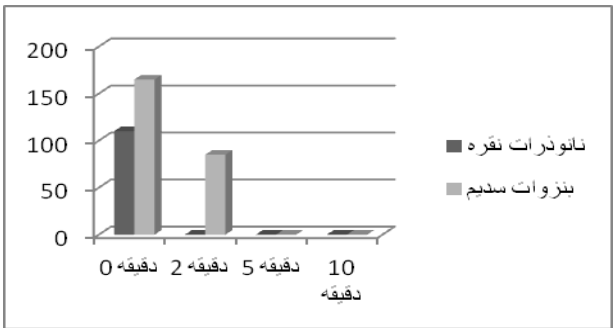
جدول ۱. مقدار p-value و حداقل زمان لازم برای مهار کامل رشد میکروارگانیسم

میکروارگانیسم	حداقل زمان لازم برای مهار کامل رشد میکروارگانیسم			
	P-value	بنزوات سدیم ۰/۱٪	نانو ذرات نقره ppm ۰/۴	نانوذرات نقره و بنزوات سدیم
E. coli	۰.۰۴۶	۱۰	۲	۰
P. aeruginosa	۰.۰۲۱	۵	۲	۰
S. aureus	*P*>۰.۰۵	۱۰	۱۰	۰
S. mutans	*P*>۰.۰۵	۰	۰	۰
C. albicans	۰.۰۱۴	۱۰	۰	۰

نمودار ۱

نمودار ۲

نمودار ۳



www.SID.ir

Archive of SID

نمودار۴

نمودار ۵

نمودارهای ۵-۱. مقایسه ی توان ضدمیکروبی نانوذرات نقره (0.4ppm) و بنزوات سدیم 0.1٪ در فواصل زمانی (۱۰-۰) دقیقه، ۱. *E. coli* ۲. *C. albicns* ۳. *P. aeruginosa* ۴. *S. aureus* ۵. *S. mutans*

در مطالعه ای که انجام شد رشد دو باکتری گرم منفی مذکور در ۲دقیقه به طور کامل مهار می‌شوند، در حالی که این مدت زمان برای باکتری *S. aureus*، ۱۰ دقیقه می‌باشد، این نتایج مشابه مطالعه ای است که در سال ۲۰۰۹ توسط Jain و همکارانش انجام شده است (۱۳)، نانوذرات نقره در غلظت 6.25 ppm، باکتری های گرم منفی از قبیل *E. coli* و *P. aeruginosa* را سریعتر از باکتری گرم مثبت *S. aureus* در غلظتی برابر با 12.5 ppm از بین می برند. نتایج مشابهی نیز توسط Cho و همکارانش در سال ۲۰۰۵ گزارش شده است (۱۴) که در این مطالعه نیز نانو ذرات نقره در غلظت ۱۰ ppm و ۲۰ ppm باکتری گرم منفی *E. coli* را سریعتر از باکتری گرم مثبت *S. aureus* از بین می برند. تفاوت در غلظت نانو ذرات نقره در بررسیهای مذکور ممکن است به خاطر تفاوت در شکل واندازه نانو ذرات نقره (۱۵) یا نوع سویه های باکتریایی به کار رفته باشد (۱۶). با توجه به جدول (۱) مشخص می شود که کاربرد دو نگهدارنده با هم در دهان شویه باعث افزایش سرعت کشندگی می‌شود. افراد دیگری نیز اثر ضدمیکروبی نانوذرات نقره را به همراه سایر عوامل ضدمیکروب مورد بررسی قرار داده‌اند. در مطالعه ای افزایش فعالیت آنتی بیوتیک‌های گوناگون (پنی سیلین G، آموکسی سیلین، اریترومایسین و ...) در حضور نانوذرات نقره گزارش شده است (۱۷). در مطالعه‌ای دیگر، محققان اثر سینرژیستی امواج اولتراسونیک و نانوذرات نقره را بر روی باکتری *E. coli* مشاهده کرده اند که با استفاده از نانوذرات نقره مدت زمان تیمار با امواج اولتراسوند کاهش می یابد (۱۸).

بررسی کلی نتایج نشان داد که نانوذرات نقره دارای خاصیت آنتی میکروبیال و اثرات نگهدارندگی بالایی در غلظت بسیار کم می باشند و می توان آن را جایگزین بنزوات سدیم و یا همراه با آن در دهان شویه استفاده کرد، البته باید اثرات بیولوژیکی نانوذرات نقره بر روی بدن انسان و محیط زیست مورد بررسی بیشتری قرار بگیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع:

1. Ishiwatari S; Suzuki T; Hitomi T; Yoshino T; Matsukuma S; Tsuji T, (2007). Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. J. Appl. Toxicol.; **27**:1-9.
2. Krebs HA; Wiggins D; Stubbs M; Sols A; Bedoya F, (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. Biochem. J.; **214** (3): 657-63.
3. Piper P W, (1999). Yeast superoxide dismutase mutans reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. Free radic. Biol. Med.; **27**: 1219-1227.
4. Brul S and P coote, (1990). Preservative agents in foods. Mod of action and microbial resistance mechanisms. Int. J. Food Microbiol.; **50**: 1-7
5. Hazan R; Levine A; Abeliovich H, (2004). Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking pathways in *Saccharomyces cerevisiae.* Applied and Environmental Microbiology. J.; **70**(8): 4449-4457.
6. Wei D; Sun W; Qian W; Ye Y; Ma X, (2009). The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. Carbohydrate Research.; **344**: 2375-2382.
7. Morones JR; Elechiguerra JL; Camacho A; Holt K; Kouri JB; Ramirez JT, et al, (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology.; **16**:2346-2353.
8. Holladay R; Moeller W; Mehta D; Brooks J; Roy R; Mortenson M, (2006). Silver/water, silver gels and silver based compositions; and methods for making and using the same. Application Number WO 20051230 European patent office.
9. Panacek A; Kvitek L; Prucek R; Kolar M; Vecerova R; Pizurova N; Sharma V K; Nevecna T; Zboril R, (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis. Characterization and their antimicrobial activity. J. Phys. Chem. B110 16248-53.
10. The american society for testing and materials, designation: E 640 – 78 (reapproved 1998), Standard test method for preservatives in water-containing cosmetics, 141-142.
11. AOAC official methods of analysis (2000), Chapter 15, Efficacy of preservation of non-eye area water-miscible cosmetic and toiletry formulations, 3-5.
12. British pharmacopeia 2003 version 7 , Volume 3, Appendix XVI C, Efficacy of antimicrobial preservation, 136.
13. Jain J; Arora S; Rajwade J M; Omray P; Khandelwal S; Paknikar K M, (2009). Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. Molecular Pharma Ceutics.; **6**(5): 1388-1401.
14. Cho K H; Park E J; Osaka T; Park S G, (2005). The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochemica Acta; **51**:956-960.
15. Pal S, Tak Y and Song M, (2007). Does the antimicrobial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. Applied and Environmental microbiology: **73** (6): 1712-1720.
16. Ruparelia JP, Kumar Chatterjee A, Duttagupta P, Mukherji S, (2008). strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. Acta Biomaterialia; **4**:707-716.
17. Shahverdi, A r, Fakhimi A, Shahverdi H R and Minaian S, (2007). synthesis and effect of silver nanaoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphyococcus aureus and Escherichia coli. Nanomed: Nanotechnol., Biol., Med; **3**:168-171.
18. Tiwari D K and Behari J, (2009). Biocidal nature of combined treatment of Ag-nanoparticle and ultrasonic irradiation in Escherichia coli dH5. Advances in Biological Research; **3** (3-4): 89-95.

www.SID.ir