



بررسی مقایسه‌ای خاصیت ضدباکتریایی نانو ذرات نقره بیوستنز شده توسط پوست سبز گردو بر روی استرپتوکوکوس موتانس و سودوموناس آئروژینوزا

رویا پرآسا^۱، یونس انزابی*^۲

^۱ کارشناس ارشد رشته زیست شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه غیرانتفاعی میزان، تبریز، ایران

^۲ دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۲

چکیده

با توجه به استفاده بی رویه از مواد ضد عفونی کننده در سرتاسر جهان در جهت گندزدائی محیط که منجر به ایجاد مقاومت متقاطع بین مواد ضد میکروبی مختلف و ایجاد سویه‌های جدید، مقاوم و تولید ابرویروس‌ها و باکتری‌های مقاوم شده است، در سالهای اخیر جهت گیری اصلی تحقیقات علم پزشکی در خصوص فناوری نانو بوده است. لذا با توجه به این دو مسئله در مطالعه حاضر درصدد تهیه ضد عفونی نانو بر پایه متابولیت های گیاهی به طوری که امن، بادوام و قابلیت جایگزینی بالکل را داشته باشد برآمده است. بنابراین مهار ۲ باکتری استرپتوکوکوس موتانس ATCC35668 و سودوموناس آئروژینوزا PTCC1310 توسط عصاره‌های آبی و اتانولی و نانوذره بیوستنز شده توسط عصاره الکل پوست سبز گردو بررسی شد. به منظور بررسی خاصیت ضد باکتریایی، MIC (Minimum Inhibitory Concentration)، MBC (Minimum Bactericidal Concentration)، مواد مورد سنجش قرار داده شد. میزان MIC عصاره‌های آبی، اتانولی و نانوذره بیوستنز شده پوست سبز گردو برای هر دو باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب $1/4$ ، $0/7$ و $0/1$ و MBC $2/8$ ، $1/4$ و $0/1$ میلی گرم بر میلی لیتر برآورد شده است. همینطور میزان MIC و MBC الکل 96% بین $0/7$ تا $2/8$ میلی گرم بر میلی لیتر برآورد شده بود، که حاکی از توانایی بیوستنز قوی پوست سبز گردو و خاصیت آنتی باکتریال قوی آن بوده است. به نظر می‌رسد می‌توان از نانو ذره نقره بیوستنز شده توسط پوست سبز گردو به عنوان ضد عفونی کننده مناسب بجای الکل و ترکیبات مشابه آن بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: عصاره پوست سبز گردو، نانوذره نقره، الکل، باکتری استرپتوکوکوس موتانس، سودوموناس آئروژینوزا

* anzabi@iaut.ac.ir

ممکن است به دلیل اثر تحت کشندگی (Sublethaleffect) باشد که الکل روی باکتری باقیمانده داشته است (۴).

با ارزیابی فعالیت ویروس کشی ضد عفونی کننده های فاقد الکل و مبتنی بر الکل در برابر پاتوژن های ویروسی نوظهور مانند ویروس ابولا، ویروس زیکا، سندرم تنفسی حاد کرونا و کرونا ویروس SARS-COV، ویروس MERS-COV و سندرم تنفسی خاورمیانه مشخص شده که این عوامل بیماری زا و همچنین ویروس های دیگری می توانند به طور مؤثر الکل را غیرفعال کنند (۵).

اتانول متداول ترین ماده الکلی، موثرترین الکل در برابر ویروس ها است. در حالی که پروپانول به عنوان یک الکل ضد باکتری بهتر شناخته می شود. همچنین ترکیب الکل ها ممکن است اثر هم افزائی داشته باشد. با این حال الکل ها فعالیت بسیار کمی در برابر تک یاخته ها، ویروس های غیر پوششی و اسپور باکتری دارند و کریپتوسپوریدیوم، انگل منتقله از آب را بطور موثر از بین نمی برد (۵).

پاتوژن های مختلف پاسخ های متفاوتی نسبت به ضد عفونی کننده ها و گندزداها نشان می دهند که همین باعث شده انتخاب یک ضد عفونی کننده یا گند زدای مناسب به عنوان یک مشکل شایع مطرح گردد (۶). به دلیل عدم وجود گزینه های درمانی برای انواع عفونت های ویروسی، تلاش های زیادی برای کشف فعالیت ضد ویروسی ترکیبات طبیعی مانند متابولیت های گیاهی انجام شده است، با این حال اکثریت ترکیبات موجود در گیاهان، حلالیت در آب کم و در دسترس بودن کمی دارند و در نتیجه اثر درمانی ندارند. لذا به منظور بهبود اثر درمانی، ترکیبات گیاهی با حامل های مختلف مبتنی بر نانوترکیب شده اند (۱). مواد ضد عفونی کننده شیمیائی اغلب با اشکالاتی مانند نیاز به غلظت بالا برای ویروس، اثربخشی محدود در طول زمان و خطرات احتمالی برای سلامت عمومی و محیط زیست همراه هستند. در نتیجه نانو ذرات فلزی به عنوان مثال نانوذرات نقره و مس و دی اکسید تیتانیوم به دلیل فعالیت ضد ویروسی ذاتی گسترده، ماندگاری، توانایی موثر بودن در دوز بسیار پایین به عنوان گزینه های جایگزین پیشنهاد شده اند (۷).

مقدمه

طی دهه های گذشته شیوع بیماری های ویروسی با سرعتی نگران کننده افزایش یافته است. مخصوصا ویروس تنفسی کرونا ویروس انسانی (SARS-COV2) معروف به COVID-19 در سراسر جهان پخش شده است و این شیوع محدودیت های سیستم مراقبت بهداشتی را به چالش کشیده است (۱).

در تلاش برای مهار شیوع بیماری ناشی از ویروس کرونا، در چین از ضد عفونی کننده های کلردار برای فضا های داخلی و خارجی استفاده شده است. چین برای به حداقل رساندن فرصت های سندرم حاد تنفسی ویروس کرونا COVID-19 و ویروسی که باعث رشد (SARS-COV2) می شود، حداقل ۲۰۰۰ تن مواد ضد عفونی کننده را فقط در شهر ووهان توزیع کرده است که این مواد شیمیائی می توانند وارد سیستم فاضلاب شده و منابع آب آشامیدنی را آلوده کند. لذا به نظر می رسد که در سراسر جهان افزایش COVID-19 با گسترش استفاده از مواد ضد عفونی کننده، می تواند منجر به فاجعه های ثانویه در سراسر جهان در اکوسیستم های آبی شود (۲).

همچنین استفاده از مواد تمیز کننده و محصولات ضد عفونی کننده منجر به طیف وسیعی از اثرات سوء تنفسی که باعث تحریک حاد مجاری هوایی فوقانی یا بیماری انسدادی ریه را شامل می شود با این حال قرار گرفتن در معرض مکرر سطح پایین روزانه مواد ضد عفونی کننده، بیشتر برای ایجاد آسم ناشی از تحریک نیز عنوان شده است (۳).

استفاده نادرست و ناامن از این مواد اثرات سمی دارد که از خود ویروس بسیار خطرناکتر است. اعتقاد بر این است که رعایت توصیه های بهداشت دست، نقش مهمی در کاهش خطر عفونت های گوارشی و تنفسی دارد. همچنین شرایطی وجود دارد که این محصولات ایده آل نیستند و هیچ فعالیت ماندگار قابل توجهی ندارند و مستند شده است که رشد مجدد باکتری پس از استفاده به آرامی اتفاق می افتد که

فلزات اعم از ضروری و غیرضروری برای بدن در بالاتر از غلظت آستانه مشخص می‌تواند سمی باشد بعضی از یون-های فلزی مانند نقره، مس، جیوه، کبالت، سرب، روی، آلومینیوم، نیکل دارای خواص قوی باکتری‌ساید می‌باشد. ترکیباتی مانند سولفات مس، نیتريد نقره، اکسید روی با ایجاد کاتیون‌های Cu^{2+} ، Zn^{2+} ، Ag^{2+} و همچنین H^+ باعث انعقاد پروتئین می‌گردند قدرت منعقدکنندگی دارد. غلظت نقره تا میزان ۱۵ میکروگرم در لیتر برای نابودی اکثر میکرو ارگانسیم‌ها کافی می‌باشد. ترکیباتی از نقره که به عنوان باکتری‌ساید بکار می‌روند، عبارتند از نترات نقره و لاکتات نقره و سترات نقره و یون مس که بیشتر به صورت سولفات مس می‌باشد. املاح مختلف فلزات سنگین به شکل لوسیون و کرم به عنوان ترکیبات آنتی‌سپتیک‌ها برای ضدعفونی پوست و زخم‌ها به کار می‌رود. املاح جیوه به دوصورت املاح معدنی و آلی در ضدعفونی موضعی باکتری‌ها و قارچ‌ها به عنوان بیواستاتیک استفاده می‌شود (۸). غیرازنانو ذرات فلزی (نقره، طلا، روی، جیوه، کبالت، سرب، آلومینیوم، نیکل) نانو ذرات پلیمری، نانو ذرات سیلیس، نانو پلیمرهای کربنی و کوانتومی نیز هم اکنون برای تشخیص و پروس استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد رویکردهای مبتنی بر نانو در آینده نزدیک اولین انتخاب برای توسعه موثرترین روش‌های درمانی، برای طیف وسیعی از بیماری‌ها باشد (۱).

آسیب برسانند. به دلیل کوچک بودن نانو ذرات و فعال بودن بیش از حد آنها وقتی وارد سلول می‌شوند، آسیب آنها به سلول بسیار بیشتر از ذرات با اندازه بزرگتر است (۹). نانو ذرات نقره متداول، با استفاده از مواد شیمیایی به عنوان عوامل کاهنده، با استفاده از روش‌های شیمیایی سنتز می‌شوند ولی به دلیل سمیت آنها و خطرات مختلف بیولوژیکی، باعث ایجاد نگرانی جدی برای توسعه فرایندهای دوستدار محیط زیست شده‌اند. سنتز نانو ذرات نقره با روش‌های مختلف شیمیایی و فیزیکی که بسیار گران و خطرناک برای محیط زیست هستند، شامل استفاده از مواد شیمیایی سمی و خطرناک است که مسئول خطرات مختلف بیولوژیکی هستند (۱۰). برای این منظور سنتز با استفاده از مولکول‌های بیولوژیکی مشتق شده از منابع گیاهی به صورت عصاره‌هایی که برتری را نسبت به روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی نشان می‌دهند، انجام می‌شود (۱۱). در حالی که گیاهان موجود در طبیعت می‌توانند منبعی برای درمان تمام بیماری‌های قابل تصور باشند از برخی گیاهان مانند پوست گردو که دارای خواص درمانی و ضدعفونی قوی می‌باشد استفاده شده است (۱۲).

گردو با نام علمی (*Juglans regia*) رچیا جاگلانس از تیره *Juglandacea* است. دارای میوه خوراکی هستند که به عنوان یک گیاه دارویی (ضد قارچی) توسط بومیان روستاها مورد توجه بوده است (۱۳). پوست سبز و تازه گردو، خارجی‌ترین قسمت آن است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌بیوتیکی است (۱۲).

نقره فلزی سفید، براق و با ارزش در عین حال یک آنتی‌بیوتیک طبیعی است که باکتری‌ها را از بین می‌برد. این فلز گرانبها از نظر شیمیایی غیر فعال است، در آب پایدار و در هوا اکسید نمی‌شود و بالاترین رسانایی الکتریکی را در میان فلزات دارد (۹).

در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار تولید نانو ذرات نقره توسط گیاهان را گزارش کرده‌اند. همچنین گیاهان *camellia sinensis*، *chenopodium album*، چای سیاه، *Rhus coriaria* سماق سیسیلی توانستند یون‌های نقره را در اندازه‌های زیر ۵۰ nm احیا کنند. فناوری نانو باعث بوجود آمدن انقلابی شگرف در مواد ضد باکتریایی است، آنها عوامل ضد باکتریایی مهمی علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۱۴). منابع زیستی از جمله میکروارگانسیم‌ها و گیاهان به طور ذاتی

نانو ذرات نقره با اندازه کوچکتر از ۳۰۰ nm به راحتی می‌توانند توسط سلول‌ها جذب شده، وارد بافت‌ها شوند. در برخی تولیدات تجاری، نانو ذرات نقره در محدوده ۱۰-۵۰ nm ساخته می‌شوند. نانو ذرات نقره خوشه‌هایی از اتم‌های نقره (Ag°) هستند که برای اهداف مختلفی از جمله خاصیت ضد باکتریایی طراحی و ساخته می‌شود. نانو ذرات با اندازه کمتر از ۷۰ nm براحتی وارد هسته سلول می‌شوند و می‌توانند به آن

عصاره آبی با استفاده از روش ماسراسیون (خیساندن) تهیه شده و با استفاده از دستگاه روتاری تغلیظ و خشک گردید. بدین منظور مقدار ۲۰ گرم از پوست سبز گردوی خشک شده، آسیاب شده و در ۱۰۰ سی سی آب خیس گردید. در ادامه به مدت سه روز در تاریکی قرار داده چندین بار روزانه بهم زده شد. در نهایت از صافی عبور داده سپس به دستگاه روتاری انتقال داده شد. تا مقداری از آب جدا شود الباقی آب در انکوباتور ۳۷ درجه تا مرحله نزدیک به خشک شدن، خارج گردید. در نهایت عصاره را با وزن مشخص با آب رقیق کرده و رقت ۱۰۰٪ در گوده اول مورد استفاده قرار گرفت. (۱۴).

تهیه عصاره الکلی پوست سبز گردو

مقدار ۲۰ گرم از پوست سبز گردوی خشک شده آسیاب شده را در ۱۰۰ سی سی الکل ۹۶٪ خیس کرده بمدت سه روز در تاریکی قرار داده چندین بار روزانه بهم زده شد در آخر از صافی عبور داده شد، سپس به دستگاه روتاری انتقال داده شد تا مقداری از حلال الکل ۹۶٪ جدا شود الباقی الکل ۹۶٪ در انکوباتور ۳۷ درجه تا مرحله نزدیک به خشک شدن قرار داده شد. در نهایت عصاره را با وزن مشخص با الکل ۹۶٪ رقیق کرده و رقت ۱۰۰٪ در گوده اول در محاسبات مورد استفاده قرار گرفت. (۱۴).

بیوستز نانوذرات نقره پوست سبز گردو

ابتدا از عصاره الکلی به غلظت ۰/۱۲ گرم بر لیتر تهیه کرده و برای تیمار عصاره از نمک نترات نقره با غلظت ۱ میلی مولار استفاده شده به سه میلی لیتر از عصاره در دمای 25°C ، $\text{pH}=6/5$ ، ۱۰۰ میلی لیتر نترات نقره ۱ میلی مولار اضافه کرده در حالیکه به شاهد نترات نقره اضافه نشد. عصاره در گرمخانه شیکردار در دمای 37°C و سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه و در تاریکی قرار داده شد. محلول موردنظر را هر ۱۵ دقیقه مشاهده کرده و تغییرات رنگ (نسبت به شاهد) قرائت گردید (۱۴). محلول کلوئیدی حاصله را با سرعت ۹۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول رویی دور ریخته شد و به منظور شست و شو آب

دارای قابلیت احیای فلزات از طریق مسیرهای متابولیک ویژه خود هستند. به طور کلی دوراه برای ساخت نانو ذرات وجود دارد که شامل روش‌های سبز و روش‌های غیر سبز است. روش‌های غیر سبز شامل روش‌های شیمیایی و فیزیکی می‌باشد، در حالی که روش‌های سبز شامل روش‌های استفاده از پلی ساکارید، تولنز، پلی اکسو متالیت و زیستی می‌باشند (۱۵). نانوذرات مغناطیسی هم در حال حاضر در زمینه‌های مربوط به زیست شناسی مولکولی بسیار استفاده میشود (۱۶). این رویکرد ساده، مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست از سیستم‌های بیولوژیکی شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها، عصاره‌های گیاهی و مولکول‌های زیستی کوچک مانند ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه و آنزیم‌ها برای سنتز AgNP استفاده می‌کند. رویکرد سبز به دلیل در دسترس بودن مجموعه وسیعی از منابع بیولوژیکی، کاهش نیاز به زمان، چگالی بالا، پایداری و حلالیت آماده NP‌های آماده شده در آب، به طور گسترده پذیرفته شده است (۱۷).

باتوجه به مطالب ذکر شده، هدف ما بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های آبی، الکلی و نانوذره نقره بیوستز شده با پوست سبز گردو بر روی ۲ باکتری استرپتوکوکوس موتانس و سودوموناس آیروژینوزا به روش MIC, MBC (حداقل میزان بازدارندگی و کشندگی) بود.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نمونه گردو

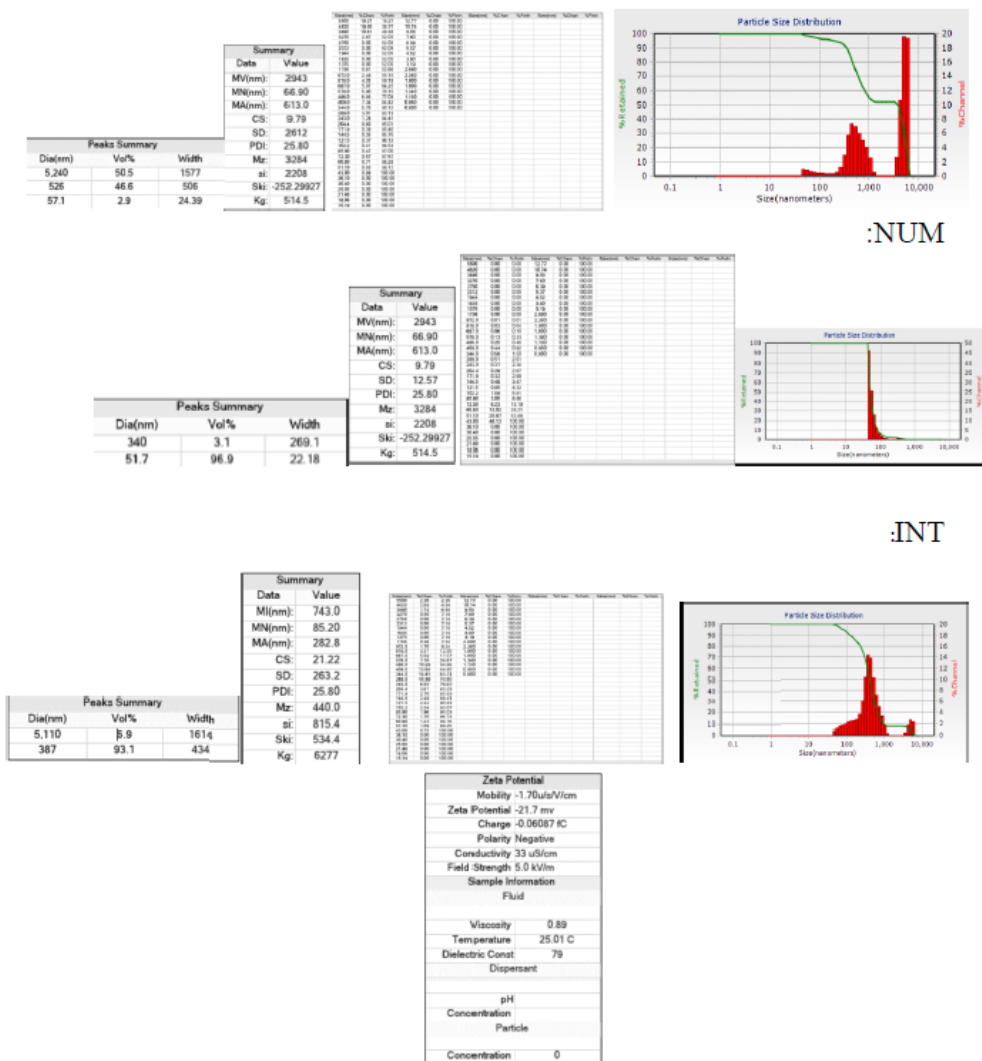
میوه گردو را در اواخر شهریور از یک باغ محلی واقع در شهرستان خوی تهیه کردیم گردوها از نوع چوالدوز از واریته‌های بومی منطقه خوی بوده و دارای ارتفاع ۶-۷ متر بوده عمر درخت حدود ۵۰ سال، دیررس (بطوریکه حدود ده سال طول میکشد تا اولین محصول به بار بنشیند) بوده و در ضمن از هیچ گونه آفت کش استفاده نشده و گردوها به صورت تصادفی از محصول برداشت شده، انتخاب شدند و بعد از پوست گیری گردوها، پوست سبز گردو دور از نور آفتاب و در دمای محیط خشک شد.

تهیه عصاره آبی پوست سبز گردو

فعالیت بیولوژیکی نانوذرات نقره به مورفولوژی، ساختار، اندازه، شکل، بار و پوشش، ترکیب شیمیایی، پتانسیل زتا، انحلال ذرات، آزادسازی یون و درجه تجمع بستگی دارد (۱۷). از آنجا که در کار کرد با نانو مواد اندازه نانوذرات به عنوان عامل مهم اصلی در عملکرد ذرات می‌باشد اقدام به اندازه گیری نانوذرات سنتز شده با دستگاه زتاسایزر شد. بنابراین نانوذره نقره حاصل از بیوسنتز برای محاسبات زتا به دانشکده شیمی خوارزمی سپرده شده است.

دیونیزه به محلول اضافه و سانتیفریوژ ۳ بار تکرار شده است. پس از هر بار سانتیفریوژ، فاز رویی را جدا و به ماده ته نشین شده آب دیونیزه اضافه گردید. سوسپانسیون باقیمانده را بر روی پلیت سیلیکونی ریخته تا خشک شود سپس نانوذرات نقره خشک شده، وزن و غلظت آن بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر برآورد شد (۱۴).

ارزیابی اندازه نانو ذرات بیوسنتز شده

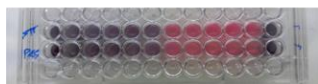
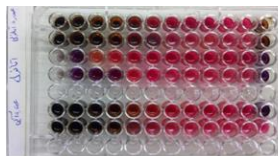


نمودار ۱. گراف‌های VOL، INT و NUM وزتا حاصل از زتاسایزر که حاکی از پولاریته منفی و توزیع یکنواخت و اندازه ذرات 51 nm برآورد شد.

• از معرف ۰/۱٪ Resazurin به مقدار ۲۰ میکرو لیتر به تمامی گوده‌ها ریخته شده و مجدداً بمدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه کرده سپس قرائت گردید.

نحوه قرائت: گوده ۱۱ (شاهد باکتری): جهت کنترل باکتری و معرف در این گوده (محیط کشت + باکتری + Resazurin) به عنوان کنترل مثبت بوده و رنگ آن قرمز بوده است.

گوده ۱۲ (شاهد عصاره): جهت کنترل عصاره از نظر آلودگی در این گوده (محیط کشت + ۵۰ میکرو عصاره + Resazurin) به عنوان کنترل منفی بوده و رنگ آن آبی بوده است (۱۸).



شکل ۱. آزمایش تعیین MIC بروی عصاره آبی والکلی و نانوذره نقره بیوستز شده والکل ۹۶٪ با استفاده از معرف رنگی Resazurin

در این شکل چاهک‌های دوردیف بالا مربوط به رقت‌های مختلف عصاره الکل، چاهک‌های دو ردیف دوم مربوط به رقت‌های تهیه شده از الکل، دوردیف سوم مربوط به رقت‌های مختلف عصاره آبی و دوردیف چهارم رقت‌های نانوذره نقره می‌باشد. همچنین بالاترین رقت بارنگ صورتی در هر ردیف نشان دهنده MIC ترکیب مورد آزمایش در آن ردیف می‌باشد.

نحوه تعیین MBC (حداقل غلظت کشندگی) ترکیبات مورد آزمایش

حداقل غلظت کشندگی باکتری یا MBC با توجه به مقادیر MIC تعیین خواهد شد، به طوری که مقدار ۱۰ میکرو لیتر از رقت MIC و ۱۰ رقت بالاتر از آن بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار به روش دیسک کشت داده خواهد شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در گرمخانه قرار خواهد گرفت، سپس پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی

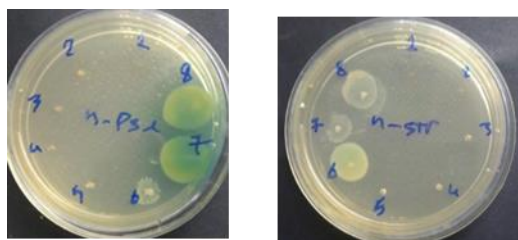
درز تاسایزر با توجه به اینکه گراف‌ها، میانگین اندازه ذرات (NUM)، میانگین جذب نوری ذرات (INT) و میانگین اندازه حجمی ذرات (VOL) و پتانسیل زتا (پولاریته ذرات) و توزیع نانو ذرات (PDI) را بدست می‌دهد، نموداری مورد استناد قرار می‌گیرد که تولرانس داده‌ای یکنواخت داشته باشد، لذا نمودار (NUM)، که در آن اندازه ۹۶٪ ذرات nm ۵۱ گزارش شده است مورد استناد قرار می‌گیرد، در مورد زتا که نشان دهنده مقدار بار یک ذره می‌باشد، می‌تواند مثبت یا منفی باشد که حاکی از بار الکتریکی ذرات نانو می‌باشد و هر چقدر قدر مطلق اندازه زتا زیاد باشد نشان می‌دهد که دافعه ذرات زیاد بوده و نشان از ثبات و پایداری ذرات نانو بوده و در طول زمان به هم نخواهند چسبید و بزرگتر نخواهند شد. در این مطالعه مقدار زتا ۲۱/۷- برآورد شده است. همینطور مقدار (PDI) در گراف‌ها گزارش شده است که هر چقدر کوچک باشد نشان دهنده توزیع اندازه یکسانی بوده و پایداری بیشتر داشته و قابل استناد می‌باشد.

نحوه تعیین MIC (حداقل میزان بازدارندگی) ترکیبات مورد آزمایش

• مرحله اول: در هر میکرو پلیت به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت مولر هیتون پراث به غیر از گوده اول ریخته شد.
• مرحله دوم: در گوده اول و گوده دوم ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره (یا ماده مورد نظر) تهیه شده ریخته شد به علت اینکه غلظت عصاره در گوده اول خالص باشد، از گوده دوم ۱۰۰ میکرو لیتر برداشته به گوده سوم و از سوم به چهارم الی دهم و از دهم به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر خارج می‌شود. به گوده ۱۲ هم ۵۰ میکرو لیتر از عصاره اضافه شد.

• مرحله سوم: از کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد نظر (استرپتوکوکوس موتانس ATCC-۳۵۶۸۸ یا سودوموناس اثرورژینوزا PTCC 1310) کدورت نیم مک فارلند (۱/۵×۱۰^۸) رقت ۰/۱ تهیه و در تمامی گوده‌ها ۱۰ میکرو لیتر به غیر از گوده ۱۲ ریخته شد.

• مرحله چهارم: ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه و در تاریکی و دستگاه انکوباتور قرار داده شد.



و پایین‌ترین غلظتی از نانو ذره که ۹۹/۹٪ یا ۱۰۰٪ باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی یا MBC در نظر گرفته خواهد شد (۱۴).

شکل ۲. تست MBC نانو ذره تهیه شده توسط پوست سبز گردو به ترتیب بروی باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس و سودوموناس آئروژینوزا که حاکی از هاله عدم رشد باکتری‌ها تا رقت ۶ تهیه شده از MIC نامومی باشد.

نتایج

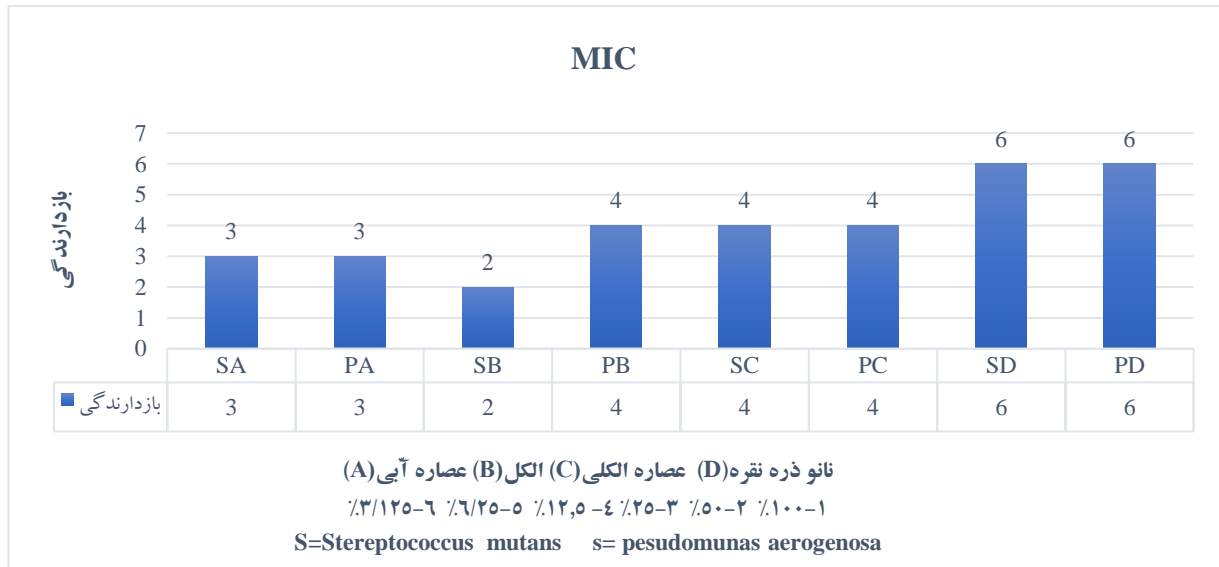
جدول ۱. نتایج MIC و MBC برای عصاره آبی، الکلی، نانو ذره نقره بیوسنتز شده پوست سبز گردو و الکل ۹۶٪

نمونه	ماده	آزمون	۱۰۰٪	۵۰٪	۲۵٪	۱۲.۵٪	۶.۲۵٪	۳.۱۲۵٪	۱.۵۶۲٪	۰.۷۸۱٪	۰.۱۹۵٪	۰.۰۹۷٪	شاهد باکتری	شاهد نانو
۱	عصاره الکلی	Str Mutans PTCC-۱۶۸۳	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
۲	پوست گردو	Pseudomonas aeruginosa PTCC-۱۳۱۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
۳	الکل ۹۶ درصد	Str Mutans PTCC-۱۶۸۳	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
۴	عصاره آبی	Pseudomonas aeruginosa PTCC-۱۳۱۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
۵	پوست گردو	Str Mutans PTCC-۱۶۸۳	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
۶	نانو ذرات نقره	Pseudomonas aeruginosa PTCC-۱۳۱۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
۷	با عصاره گردو	Str Mutans PTCC-۱۶۸۳	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
۸	با عصاره نانو ذرات نقره	Pseudomonas aeruginosa PTCC-۱۳۱۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

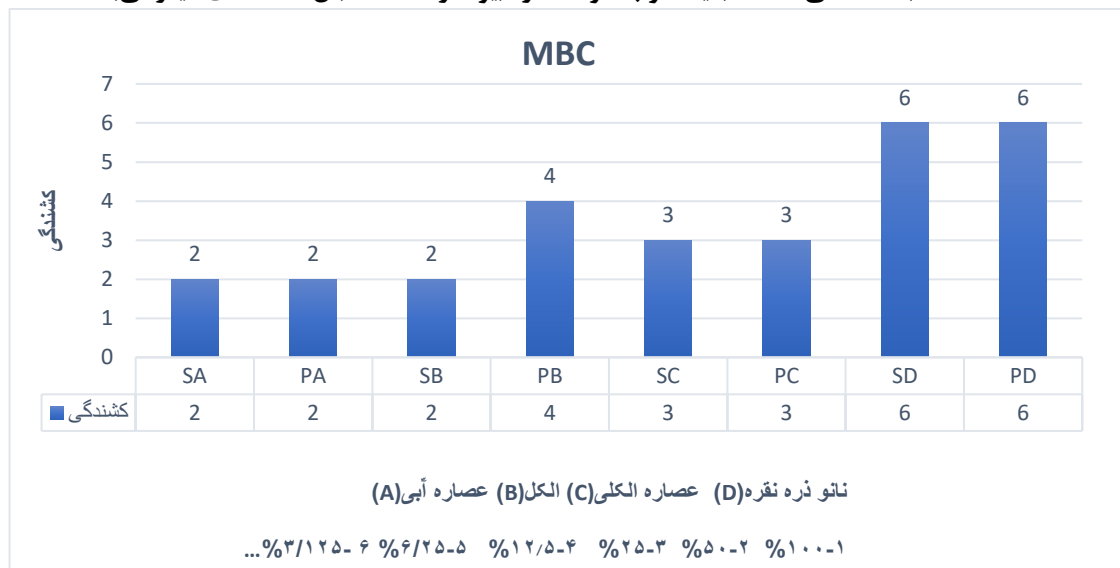
جدول ۲. میزان MIC, MBC, الکل ۹۶٪، عصاره‌های الکلی و آبی و نانو ذره نقره بیوسنتز شده با پوست سبز گردو

ماده	باکتری	MBC	MIC
الکل	<i>Streptococcus mutans</i>	۲/۸	۲/۸

۰/۷	۰/۷	<i>Pseudomonas</i>	عصاره الکلی
۱/۴	۰/۷	<i>Streptococcus mutans</i>	
۱/۴	۰/۷	<i>Pseudomonas</i>	عصاره آبی
۲/۸	۱/۴	<i>Streptococcus mutans</i>	
۲/۸	۱/۴	<i>Pseudomonas</i>	نانوذره نقره
۰/۱۷	۰/۱۷	<i>Streptococcus mutans</i>	
۰/۱۷	۰/۱۷	<i>Pseudomonas</i>	



نمودار ۲. مقایسه قدرت بازدارندگی از رشد (MIC) چهار عصاره آبی، الکلی، نانو ذره نقره بیوستز شده والکل ۹۶٪ که حاکی از قدرت بازدارندگی از رشد بسیار خوب نانوذره نقره بیوستز شده در قبال عصاره‌های دیگر می‌باشد.



نمودار ۳. مقایسه قدرت کشندگی (MBC) چهار عصاره آبی، الکلی، نانو ذره نقره بیوستز شده والکل ۹۶٪ که حاکی از قدرت کشندگی بسیار خوب نانو ذره نقره در قبال عصاره‌های دیگر می‌باشد.

بحث

طبق فرضیاتی که داشتیم عصاره الکلی و آبی پوست سبز گردو دارای خاصیت ضد باکتریایی بوده است و نتایج ضد باکتریایی نزدیک به الکل ۹۶٪ نشان داده است. ولی در مقایسه، عصاره الکلی نسبت به عصاره آبی و الکل ۹۶٪ خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری نشان داد و نانوذره نقره بیوسنتز شده با عصاره الکلی پوست سبز گردو بیشترین خاصیت ضد باکتریایی و ضد ویروسی را در مقابل عصاره آبی و عصاره الکلی و الکل ۹۶٪ از خود نشان داد.

در مطالعه حاضر مهار ۲ میکروارگانیزم استرپتوکوکوس موتانس، سودوموناس آئروژینوزا توسط عصاره‌های آبی و اتانولی و نانو ذره نقره بیوسنتز شده توسط پوست سبز گردو به اثبات رسید. میزان MIC عصاره آبی پوست سبز گردو در برابر باکتری استرپتوکوکوس موتانس و سودوموناس آئروژینوزا ۱/۴ و برای عصاره الکلی ۰/۷ و برای نانو ذره بیوسنتز شده ۰/۱ و برای الکل ۹۶٪ به ترتیب ۲/۸ تا ۰/۷ میکروگرم بر میلی لیتر برآورد شده است و میزان MBC برای عصاره آبی ۲/۸ و عصاره الکلی ۱/۴ و نانوذره نقره بیوسنتز شده ۰/۱ و برای الکل ۹۶٪، ۲/۸ تا ۰/۷ میکروگرم بر میلی لیتر برآورد شده است.

Ali-Shtayeh و همکاران در سال ۱۹۹۹ در فلسطین عصاره آبی گردو را از لحاظ داشتن خاصیت ضد قارچی و تعیین MIC بر روی ۹ سویه درماتوفیت میکروسپوروم کانیس، ترایکوفایتون متاگروفایتیس و ترایکوفایتون ویولاسئوم بررسی کردند. در این مطالعه عصاره Jaglans regia رشد میکروسپوروم کانیس و ترایکوفایتون ویولاسئوم را بطور کامل متوقف کرد (۱۹). براساس پژوهش دولت آبادی و همکاران در سال ۱۳۹۳ پوست سبز گردو از فعالیت میکروارگانیزم‌های گرم مثبت مانند لیستریا مونوسیژنوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و میکروارگانیزم‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلی، پروتئوس و لگاریس و سالمونلا تیفی جلوگیری می‌کند غلظت ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره پوست سبز گردو بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و غلظت ۱۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر سایر میکروارگانیزم‌ها

اثر مهارکنندگی رشد دارد. لازم به ذکر است که این عصاره در غلظت ۱۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر باکتری‌های سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیژنوزا اثر کشندگی داشت (۲۰). Oliveira و همکاران هم در گزارشی در سال ۲۰۰۸ اعلام کردند که عصاره آبی پوست گردو با اثر مهارکنندگی رشد ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مؤثر است و همینطور میزان اثر مهارکنندگی رشد عصاره آبی پوست سبز گردو را برای اشرشیاکلی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آوردند (۲۱). در تحقیق حاضر نیز میزان اثر مهارکنندگی رشد عصاره آبی برای هر دو باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس، سودوموناس آئروژینوزا ۱/۴ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. که نشانگر خاصیت آنتی باکتریال مناسب عصاره آبی پوست سبز گردو برای باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌باشد.

حشمتی و همکاران در سال ۱۳۹۵، در تحقیقی، مهار ۳ میکروارگانیزم ساکارومایسس سرویزیه، آسپرژیلوس نایجر و باسیلوس لجنی فرمیس را توسط عصاره‌های اتانولی و متانولی برگ و پوست سبز میوه گردو به روش پرکولاسیون را اثبات کردند عصاره فعالیت ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای در مقابل تمامی باکتری‌های مورد بررسی نشان داد. میزان MIC بین ۰/۶۲۵ و ۱/۲۵ و MBC بین ۱/۲ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود (۲۲). در مطالعه حاضر نیز مهار ۲ میکروارگانیزم استرپتوکوکوس موتانس، سودوموناس آئروژینوزا توسط عصاره‌های آبی و اتانولی پوست سبز گردو به اثبات رسید. میزان MIC بین ۰/۷ و ۱/۴ میلی گرم بر میلی لیتر و MBC بین ۱/۴ و ۲/۸ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب برای عصاره اتانولی و برای عصاره آبی برآورد شد.

عمرانی و همکاران در سال ۱۳۹۶ در مقایسه اثر ضد باکتریایی نانوذرات بیوسنتز شده با دونه عصاره شیرین بیان و نعنای نشان دادند که اثر ضد باکتریایی نانوذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان بر روی لاکتوباسیلوس رامنوس و اکتینومایسس ویسکوسوز، استرپتوکوکوس موتانس به ویژه بر روی باکتری استرپتوکوکوس موتانس بیشتر از نانو ذره

تغییر در عدد MIC می‌تواند به علت شرایط آب و هوایی متفاوت رشد گیاه، بومی بودن گردو و سوش‌های مختلف باکتری‌ها باشد (۲۵).

در مطالعات Suwanchawalit و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش شده است که اندازه و شکل ذرات نقره عاملی مهم برای خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره به شمار می‌رود؛ به گونه‌ای که کاهش اندازه ذرات باعث درگیری مناسب با باکتری شده و این خاصیت را افزایش می‌دهد. کاهش اندازه ذرات باعث افزایش یون نقره آزاد شده از سطح شده و خاصیت ضد باکتریایی بیشتری را فراهم می‌نماید. افزون بر اندازه نانوذرات، شکل ذرات نیز مؤثر بوده و ریخت‌شناسی کروی شکل، توانایی درگیری با باکتری و در نهایت انهدام باکتری را دارد (۲۶). در مطالعه Ahmed و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثرات وابسته به شکل نیز در مطالعات با استفاده از نانوذرات نقره با اندازه‌های مختلف گزارش شده است به طوریکه AgNP مثلثی شکل کوتاه شده، نسبت به AgNP‌های کروی و میله‌شکل، عملکرد ضد باکتریایی قوی‌تری داشت. کاهش سمیت سلولی نیز با ذرات آگلومره در مقایسه با نقره‌های آزاد مشهود است که سرنوشت و سمیت نانوذرات نقره بر اساس نوع پوشش آنها تعیین می‌شود. به مطالعه‌ای که صورت گرفت نانومکعب‌های نقره در مقایسه با نانونقره‌های کروی و میله‌ای با اندازه ۵۵ نانومتر، اثر ضد باکتریایی بیشتری علیه *اشریشیا کلی* نشان دادند (۱۰). در مطالعه عمرانی و همکاران در سال ۱۳۹۶ طی تحقیقی با عنوان بیوسنتز نانوذرات نقره با استفاده از گیاهان شیرین بیان و نعناع، اندازه نانو ذرات نقره ۵۵nm تعیین شد. با توجه به اینکه اثر ضد باکتریایی نانو ذرات نقره، به اندازه و شکل آنها بستگی دارد، نتایج این مطالعه نشان داد که با کاهش اندازه نانو ذرات نقره از ۱۰۰ nm به ۱۶nm، مقدار MIC نصف می‌گردد و این به معنای افزایش خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره با اندازه کوچکتر است (۱۴). در مطالعه حاضر نیز اقدام به اندازه‌گیری نانوذرات بادستگاه زتاسایزر کردیم. بطوریکه حدود ۹۷٪ اندازه نانوذرات نقره

نعناع است. در بین باکتری‌های مورد مطالعه مقاومت باکتری *لاکتو باسیلوس رامنوس* در مقابل نانو ذرات بیوسنتز شده بیشتر از باکتری‌های *استریتوکوکوس موتانس* و *اکتینو مایسس ویسکوسوز* گزارش شد. میزان MIC برای نانو ذرات بیوسنتز شده با عصاره شیرین بیان در برابر باکتری‌های بالا به ترتیب ۱/۵۶، ۶/۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و میزان MIC نانو ذرات بیوسنتز شده با عصاره نعناع در برابر باکتری‌های ذکر شده به ترتیب ۱۲/۵ و ۱۲/۵ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد (۱۴). کاوسی و همکاران در سال ۱۳۹۶، کمترین مهارکنندگی نانوذره و عصاره مرزنجوش اروپائی در برابر باکتری *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* به ترتیب معادل ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین غلظت باکتری کشی نانوذره و عصاره به ترتیب ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، تعیین شد (۲۳). فرخ پور و همکاران در سال ۱۳۹۶، نانوذره نقره در تلفیق با عصاره و اسانس گیاه اکالیپتوس میکروتنکا فعالیت ضد میکروبی مناسبی علیه باکتری بیماری‌زای *استریتوکوکوس موتانس* نشان داد (۲۴). در مطالعه حاضر نیز کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت باکتری کشی نانو عصاره الکلی پوست سبز گردو برای هر دو باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *استریتوکوکوس موتانس* ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد شده است. از مقادیر MIC MBC برآورد می‌شود که قدرت ضد باکتریایی نانوذره بیوسنتز شده توسط پوست سبز گردو از عصاره‌های نعناع، شیرین بیان و مرزنجوش اروپائی بیشتر بوده است.

طبق گزارش Darmani و همکاران در سال ۲۰۰۶ که روی گونه‌های مختلف باکتری گرم مثبت و منفی کار کرده اند گزارش نمودند که عصاره آبی گردو روی باکتری‌های گرم مثبت اثرگذار است. به طور عمده باکتری‌های گرم منفی به نسبت گرم مثبت‌ها مقاوم تر می‌باشند (۱۲). در مطالعه حاضر عصاره آبی پوست سبز گردو تاثیر یکسانی روی باکتری گرم مثبت *استریتوکوکوس موتانس* و گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* از خود نشان داد که با نتایج فوق متفاوت است.

۵۱ nm برآورد شده است. همینطور مقدار (PDI) در گراف-ها گزارش شده است که مقدار کوچک آن نشان دهنده توزیع اندازه یکسان بوده و پایداری بیشتر و قابل استناد بودن آن است.

نتیجه گیری

لازم به ذکر است که پوست سبز گردو که به عنوان ضایعات محصولات کشاورزی دور ریخته می شود می تواند جهت استخراج ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی با منشاء طبیعی جهت استفاده در محصولات مختلف بهره-برداری شود. بنا به اطلاعات بدست آمده ، عصاره های الکلی و نانو ذره نقره بیوسنتز شده توسط عصاره الکلی پوست سبز گردو قدرت ضدباکتریایی قویتری نسبت به الکل ۹۶٪ نشان

داده و قابلیت جایگزینی آن با الکل (با پالایش بعضی فاکتورهای رنگی آن) را دارا می باشد. نتیجه نهایی اینکه به نظر می رسد می توان از نانو ذره نقره بیوسنتز شده توسط پوست سبز گردو به عنوان ضدعفونی کننده مناسب به جای الکل و ترکیبات مشابه استفاده کرد، در آینده می توان از ضایعات پوست سبز گردو، در تهیه مواد ضدعفونی کننده گیاهی و پایداروامن استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

در پایان از جناب آقای دکتر یونس انزابی عضو محترم هیات علمی دانشکده دامپزشکی، واحد پاتوبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز بابت راهنمایی های ارزنده و پربارشان جهت ارتقاء این مطالعه تحقیقی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

- Campos EV, Pereira AE, De Oliveira JL, Carvalho LB, Guilger-Casagrande M, De Lima R, et al. How can nanotechnology help to combat COVID-19? Opportunities and urgent needs. *Journal of Nanobiotechnology*. 2020;18:1-23. Available at: <https://doi.org/10.1186/S12951-020-00685-4>.
- Zhang H, Tang W, Chen Y, Yin W. Disinfection threatens aquatic ecosystems. *Science*. 2020;368(6487):146-7.
- Clausen PA, Frederiksen M, Sejbæk CS, Sørli JB, Hougaard KS, Frydendall KB, et al. Chemicals inhaled from spray cleaning and disinfection products and their respiratory effects. A comprehensive review. *International journal of hygiene and environmental health*. 2020;229:113592. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.Ijheh.2020>.
- Atolani O, Baker MT, Adeyemi OS, Olanrewaju IR, Hamid AA, Ameen OM, et al. COVID-19: Critical discussion on the applications and implications of chemicals in sanitizers and disinfectants. *EXCLI journal*. 2020;19:785. doi:10.17179/excli2020-1386.
- Gold N, Mirza T. Avva. U. Alcohol Sanitizer. *StatPearls*. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30020626>. 2020.
- MalAmiri H, Astana SB, Kaveh M, Alizadeh Barei M, Samabgi P, Ghafari S. Evaluation of Disinfectants. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2018(350):2-30. Available at: <https://www.Iphco.CoM>.
- Talebian S, Wallace GG, Schroeder A, Stellacci F, Conde J. Nanotechnology-based disinfectants and sensors for SARS-CoV-2. *Nature nanotechnology*. 2020;15(8):618-21. Available at: <https://doi.org/10.1038/S41565-020-0751-0>.
- Hashemi A. *Disinfectants and Cleaners*. Sixth edition ed, 2018.
- Ehsanpour AA. An Analysis of The Positive And Negative Effects of Nano Particles, Especially Nano Silver, On Plants and Animals and The Environment. *Congress of Agricultural Sciences and Plant Breeding of Iran 2011*. p. Available at: <https://www.Sid.Ir/Fa/Seminar/Viewpaper.aspx?Id=21157>.
- Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A Review On Plants Extract Mediated Synthesis Of Silver Nanoparticles For Antimicrobial Applications: A Green Expertise. *Journal Of Advanced Research*. 2016;7(1):17-28. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.Jare.2015.02.007>.
- Mousavi Komazani M. Investigating The Effect of Silver Nanoparticles on The Antimicrobial Power of Pecan Plant Alcoholic Extract Against Escherichia Coli Bacteria. *Scientific-Research Journal of Applied Chemistry*. 2018;14(51):DOI:10.22075/CHEM.2018;15210.1470.
- ChiragAli M, Mirmoqtadai L, Aliabadi SS, Hosseini SM. Comparison of Antimicrobial and Antioxidant Properties of Aqueous Extract of Walnut Green Skin Before And After Microcoating. *Iranian Journal of Nutritional Sciences and Food Industries*. 2015;2(11):113-24.
- Latifi Y, Chaharlang M, Daneshniam M, Khaki Arani S, Borzouni M, Baghri P. Investigating The Antioxidant And Antimicrobial Properties of The Methanolic Extract of Green Walnut Skin. *Tarbiat Modares University Press, Journal of food science and technology(Iran)*. 2018:DOI 10.29252/FSCT.17.11.10.
- Omrani S, Zhiyani R, Daefa Jafari M. Biosynthesis of Silver Nanowire Using Licorice and Mint Plants and Investigation of Its Antimicrobial Effect Against Many Bacteria Causing Tooth Decay. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2016;16(10):953-68. Available at: <https://www.Sid.Ir/Fa/Journal/Viewpaper.aspx?Id=349161>.
- Abbasi Z. Preparation of silver nanoparticles using green walnut skin extract: Al-Zahra University; 2016.
- Raffi S, Tofiqi SA, Ardakani MR, Maddkar A. Investigating the direct effect of magnesium oxide nanoparticles on foot-and-mouth disease virus in laboratory conditions. *Journal of Veterinary Microbiology*. 2014;11(1):47-39.
- Ferdous Z, Nemmar A. Health impact of silver nanoparticles: a review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(7):2375. Doi: 10.3390/Ijms21072375.
- Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology letters*. 2016;38:1015-9. Doi 10.07/S10529-016-2079-2.
- Ali-Shtayeh M, Abu Ghdeib SI. Antifungal Activity of Plant Extracts Against Dermatophytes. *Mycoses*. 1999;42(11-12):665-72.

20. Dolatabadi M, Raftani Amiri Z, Ismaelzadeh Kanari R. Comparison of Total Phenol and Antioxidant Properties of Green Walnut Skin in Northern Areas of Iran (Shahrood, Bandar Gaz and Tarbiat ThousandJereyb) Modares University. Journal of Food Science and Industry (Iran). 2013;11(45).
21. Oliveira I, Anabela S, Morais J, Ferreira I, Albino B, Estevinho L, et al. Chemical Composition, And Antioxidant And Antimicrobial Activities Of Three Hazelnut (*Corylus Avellana* L.) Cultivars Food And Chemical Toxicology. 2008;46:1801-7.
22. Heshmatami A, M. AS, Old P. Antimicrobial Effect Of Ethanolic And Methanolic Extract Of Leaves And Green Skin Of Walnut Fruit Against *Saccharomyces Cerevisiae*, *Bacillus Lichenium Fermes* And *Aspergillus Niger* In Palm Dates. Iranian Journal Of Nutrition And Food Technology. 2016;11(4): 81-8.
23. Kavousi S, Yaqoubi H. Synthesis of Silver Nanoparticles By Green Method Using Extract of European Myrrh Plant (*Origanum Majorana*) and Investigation of Its Antimicrobial Effects. Cell and Molecular Research (Biology of Iran). 2016;30(2):299-311. Available at: <https://www.sid.ir/Fa/Journal/Viewpaper.aspx?Id=334566>.
24. Farrokhpour R, Anzabi Y, Jafarzadeh Malmiri H. Synergistic evaluation of antimicrobial activity of silver nanoparticles and *Eucalyptus microtheca* plant against *Streptococcus mutans* bacteria. Faiz 2018;23(4):334-43. Available at: <https://www.sid.ir/Fa/Journal/Viewpaper.aspx?Id=535229>.
25. Salamat F, Kiwani S, Emami M, Amin G. Investigating The Effect of Green Walnut Skin in Preventing The Growth of Fungi *Microsporum Canis*, *Trichophyton Mentagrophytis*, *Epidermophyton Flucosum*, *Aspergillus Nigerocandida Albicans* By Method. Broth Dilution Journal of Medical Sciences of Islamic Azad University. 2006;16(4):201-5.
26. Suwanchawalit C, Chanhom P, Sriprang P, Wongnawa S. A Ag-Doped TiO₂ Photocatalyst for Dye Decolorization under UV and Visible Irradiation. PACCON. 2011;6:263-70.

Comparative Investigation of The Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles Biosynthesized by The Green Skin of Walnut Against *Streptococcus Mutans* and *Pseudomonas Aeruginosa*

Roya Parasa¹, Younes Anzabi^{*2}

¹ Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Non-Profit University of Mizan, Tabriz, Iran.

² Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

ABSTRACT

Due to the indiscriminate use of disinfectants all over the world in order to disinfect the environment, which has led to the creation of cross-resistance between different antimicrobial substances and new, resistant strains and the production of superviruses and resistant bacteria, in recent years, The main focus of medical science research has been on nanotechnology. Therefore, according to these two issues, in the present study, an attempt has been made to prepare a nano disinfectant based on plant metabolites so that it is safe, durable and can replace alcohol. Therefore, the inhibition of 2 bacteria *Streptococcus mutans* ATCC35668 and *Pseudomonas aeruginosa* PTCC1310 by aqueous and ethanolic extracts and the biosynthesized nanoparticle was investigated by the alcoholic extract of green walnut skin. to check the antibacterial properties of the materials, MIC (Minimum Inhibitory Concentration), MBC (Minimum Bactericidal Concentration) of the materials were measured. MIC levels of aqueous, ethanolic extracts and biosynthesized nanoparticles of green walnut skin for both *Streptococcus mutans* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria were 1.4, 0.7 and 0.1, respectively, and MBC was 2.8, 1.4 and 0.1 milliliters. It is estimated in grams per milliliter. Also, the MIC and MBC of 96% alcohol were estimated between 0.7 and 2.8 mg/ml, which indicated the strong biosynthesis ability of green walnut skin and its strong antibacterial properties. It seems that silver nanoparticles biosynthesized by green walnut skin can be used as a suitable disinfectant instead of alcohol and its similar compounds against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Keywords: green walnut skin extract, silver nanoparticle, alcohol, *Streptococcus mutans* bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*

* anzabi@iaut.ac.ir