

سنتر سبز و بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات نقره با استفاده از عصاره بهار نارنج

صابر حیدرزاده: کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران. heydarzadehsaber@gmail.com
 *هاشم یعقوبی: استادیار، گروه زیست شناسی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران (*نویسنده مسئول). yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: به دلیل اینکه این نانوذرات نقره می‌توانند کاربردهای فراوانی داشته باشند روش‌های مختلف و زیادی برای تولید نانوذرات نقره وجود دارد. اخیراً استفاده از گیاهان در سنتز نانوذرات به دلیل کم‌هزینه و سازگار بودن با محیط‌زیست، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه سنتز زیستی نانوذرات نقره به وسیله عصاره بهار نارنج و بررسی خصوصیات ضد میکروبی آن گزارش شده است.

روش کار: در این تحقیق از عصاره بهار نارنج به عنوان عامل کاهنده برای تولید زیستی نانو ذرات نقره استفاده شد. احیای یون‌های نقره بعد از ۲۴ ساعت در اثر واکنش عصاره بهار نارنج با نیترات نقره ۱ میلی مولار صورت گرفت. نانو ذرات حاصله برای تعیین اندازه، خواص ساختاری، خواص اپتیکی، مورفولوژی و ریخت شناسی به ترتیب با دستگاه‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: تشکیل نانو ذرات زیستی نقره در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (UV) نشان داده شد. اندازه و مورفولوژی این نانو ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری تعیین شد که شکل ذرات کروی و اندازه متوسط آن‌ها در حدود ۴۰-۵۰ نانومتر است. نانو ذرات نقره زیستی دارای فعالیت ضد میکروبی بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بودند.

نتیجه گیری: عصاره بهار نارنج قادر به احیای یون Ag^+ به نانو ذرات نقره می‌باشد. همچنین نانو ذرات نقره تولید شده به روش سبز دارای فعالیت ضد میکروبی مناسبی نیز هستند.

کلیدواژه‌ها: سنتز سبز، بهار نارنج و نانو ذرات نقره

مقدمه

عوامل احیایی و تثبیت کننده را ایفا می‌کنند (۸) و در طبیعت به صورت تجزیه نشده باقی می‌مانند که در نهایت موجب آلودگی شیمیایی محیط زیست می‌شوند (۹). از دیگر معایب این روش‌ها میزان تولید پایین و استفاده از فشار، دما و انرژی‌های بالا در طی فرآیند واکنش است (۱۰).

در بین انواع مختلف نانوذرات، نانوذرات نقره از فواید گسترده‌ای در زمینه‌های زیست نانو فناوری و پزشکی برخوردار است (۱۱). نانوذرات نقره در علم پزشکی جهت درمان سوختگی، تولید مواد دندان، پوشش‌های فلزی، اصلاح و تصفیه آب و مواد ضد عفونی کننده کاربرد دارند. همچنین دارای فعالیت ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد باکتریایی، ضد التهاب، ضد رگ زایی و ضد سرطان را می‌توان نام برد (۱۲).

نانو تکنولوژی حوزه‌ای است که سریعاً در حال رشد بوده و در حال حاضر تأثیرات گسترده‌ای را در زمینه‌های مختلف زندگی بشر از جمله در کاربردهای صنعتی، کشاورزی و پزشکی داشته است. در این راستا سنتز نانوذرات فلزی به دلیل استفاده در زمینه‌های مختلف علمی و صنعتی مورد توجه محققان زیادی قرار گرفته است (۱) و (۲). به منظور سنتز نانوذرات روش‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوتی ابداع شده‌اند که از میان روش‌های فیزیکی و شیمیایی می‌توان به روش‌های احیاء شیمیایی (۳)، لیتوگرافی (۴)، احیاء الکتروشیمیایی (۵)، فرسایش لیزری (۶)، امواج میکروویو (۷) و ... اشاره نمود. از معایب این روش‌ها استفاده از مواد شیمیایی است که نقش

کمتر شناخته شده است از این رو در این تحقیق سنتز سبز نانو ذره توسط این گیاه و خواص ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار داده شد تا شاید نتایج این بررسی بتواند نقش مهمی در تحقیقات مربوط به پزشکی و داروسازی ایفا کند.

روش کار

جمع‌آوری و تهیه عصاره گیاه بهارنارنج: در ابتدا گل‌های بهارنارنج از شیراز جمع‌آوری و با آب مقطر به خوبی شستشو داده شدند. سپس در دمای اتاق قرار گرفته تا خشک شوند و پس از آن با قیچی و هاون به خوبی پودر شدند. ۵ گرم پودر تهیه شده از قسمت گل بهارنارنج را با ۱۰۰ سی سی آب دیونیزه مخلوط شد و به مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای جوش روی هیتز قرار گرفت و بعد از سرد شدن با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شد و عصاره آبی حاصل برای آزمایش‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سنتز نانوذرات: ۱۰ سی سی از عصاره تهیه شده را با ۹۰ سی سی محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار مخلوط کرده و محلول را به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاهی جهت مشاهده تغییرات رنگ و بروی میزان جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Uv-Vis) مدل shimadzu UV2550 ساخت ژاپن در محدوده ۷۰۰-۳۰۰ نانومتر بررسی مورد بررسی قرار گرفت. محلول حاوی نانوذرات ساخته شده با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده، سپس محلول رویی دور ریخته شد.

تعیین اندازه و مورفولوژی نانوذرات: نانوذرات نقره سنتز شده از عصاره بهارنارنج، برای تعیین اندازه، خواص ساختاری، خواص اپتیکی، مورفولوژی و ریخت شناسی بترتیب با دستگاه‌های پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی میدان گسیلی (FESEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مورد آنالیز و بررسی قرار گرفتند. برای تعیین فازهای بلورین (کریستالی) نانوذرات نقره سنتز شده، همچنین اندازه‌گیری ثابت‌های کریستالی نانوذرات نقره و محاسبه سائز بلورک‌ها از الگوی پراش اشعه ایکس، XRD

اخیراً سنتز زیستی توسط عوامل طبیعی و زیست تخریب پذیر مثل باکتری‌ها (۱۳)، قارچ‌ها (۱۴) و گیاهان (۱۵) در تحقیقات گوناگون به اثبات رسیده است و در حال حاضر مورد توجه بیشتر محققان در این زمینه می‌باشد.

در روش سنتز سبز یون‌های فلزات با استفاده از ترکیبات گیاهی معمولاً یک واکنش تک مرحله‌ای بوده که بدون نیاز به سورفکتانت و سایر عوامل پایدار کننده به نانو ذره تبدیل می‌شوند. مواد و ترکیبات فعال زیستی در عصاره‌های گیاهان از جمله فلاونوئیدها و سایر متابولیت‌های مؤثر فعال محلول در آب می‌توانند برای احیا یون‌های فلزی به نانوذرات در دمای اتاق مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۶).

نارنج به نام علمی *Citrus aurantium* از خانواده مرکبات (*Rutaceae*) است. درختی است تا ارتفاع ۵ متر با شاخه‌هایی که دارای خارهای پراکنده هستند. برگ‌ها بیضی‌شکل و نوک نیز، گل‌ها به صورت منفرد و یا چندتایی در طول محور شاخه قرار گرفته‌اند. این گل‌ها سفیدرنگ، معطر، ترد و شکننده، هستند و دارای ۵ گلبرگ می‌باشند. میوه بهارنارنج نوعی سته با پوست ضخیم و نارنجی رنگ است. نارنج از جمله گیاهان دارویی پر مصرف و بومی کشور ایران است که عمدتاً در گرگان، گیلان، مازندران، فارس، کرمان و خوزستان یافت می‌شود. در طب سنتی ایران از خواص درمانی این گیاه به‌عنوان ضدالتهاب، ضد اکسیدان، ضد عفونی کننده، ضد اسپاسم، ضد نفخ، ضد سرفه، ضد زخم‌های داخلی، کاهش دهنده کلسترول، قند خون، چربی، پرفشاری، اسید اوریک، محرک سیستم ایمنی بدن، مسهل و مقوی معده می‌توان نام برد و نیز به عنوان آرام بخش و خواب آور مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷ و ۱۸). نارنج حاوی اسانس لیمونن ۹۰٪، فلاونوئیدها، ثرمل لینالیل استات، ژرانیول، کومارین‌ها، تری ترپن‌ها، ویتامین E، C، کاروتن و پکتین است. فلاونوئیدها که یکی از ترکیبات مؤثر در سنتز سبز بوده و خاصیت ضد التهابی، ضد ویروس، ضد باکتریایی و ضد قارچی دارند (۱۹). بررسی مطالعات نشان می‌دهند که سنتز سبز ذرات نقره با استفاده از عصاره بهارنارنج

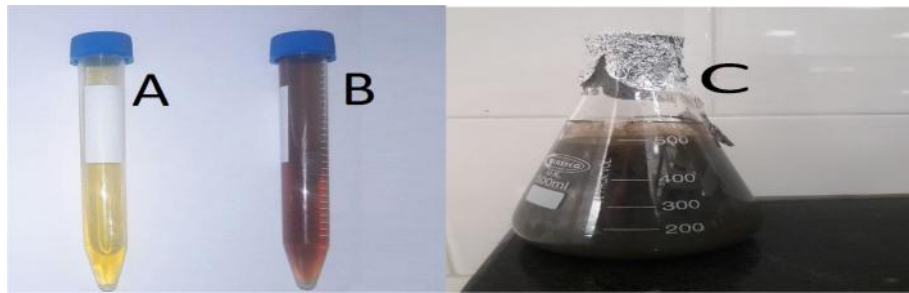
عصاره استریل در لوله شماره یک و یک میلی لیتر در لوله شماره دو ریخته شد. سپس از محیط کشت مولر هینتون برات استریل به میزان یک میلی لیتر در لوله های شماره دو تا ۱۰ اضافه شد. جهت تهیه سری رقت محتویات لوله دو خوب مخلوط شده و یک میلی لیتر از آن به لوله شماره سه اضافه شد. سپس از لوله سه به لوله چهار و به همین ترتیب تا لوله شماره نه ادامه داده شد. در پایان از لوله نه یک میلی لیتر برداشته و دور ریخته شد. از سوسپانسیون میکروبی با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند به هر لوله یک میلی لیتر اضافه شد. حجم نهایی هر لوله دو میلی لیتر است. لوله ۱۰ به عنوان کنترل مثبت بوده و حاوی یک میلی لیتر محیط کشت و یک میلی لیتر باکتری است. لوله یک به عنوان کنترل منفی بوده و حاوی یک میلی لیتر ماده ضد میکروبی و یک میلی لیتر باکتری می باشد. لوله ها به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس لوله ها از نظر وجود کدورت بررسی شد. حداقل غلظتی که عصاره رشد باکتری را مهار بکند و لوله شفاف بود مشخص شد و میزان MIC از روی آن محاسبه گردید. پس از تعیین حداقل غلظتی از عصاره ای که برای باکتری مهار کننده است جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره در برابر باکتری از لوله های شفاف که رشد در آن ها مهار شده بود به کمک سوآپ استریل روی سطح محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت داده شد و پلیت ها ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. کم ترین غلظت عصاره که در آن غلظت هیچ باکتری زنده نمانده بود بیان کننده میزان حداقل غلظت های کشنده یا MBC آن عصاره در نظر گرفته شد (۲۲ - ۲۰).

یافته ها

سنتر و طیف سنجی ماوراءبنفش - مرئی نانوذرات: روش سنتر سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای یون های نقره به وسیله عصاره گیاه بهار نارنج انجام شد. اولین نشانه تولید نانوذرات نقره تغییر رنگ نانوذرات نقره تغییر رنگ است. رنگ قهوه ای تیره حاصل بعد از ۲۴ ساعت

نمونه ها بهره استفاده شد. برای تهیه الگوی پراش اشعه ایکس از دستگاه پراش سنج پودری اشعه ایکس مدل Philips X'pert Pro ساخت کشور هلند با منبع لامپ آند مسی Cu K با طول موج $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ استفاده شد. این دستگاه قابلیت آنالیز نمونه ها را به صورت پودر، لایه های نازک و همچنین حالت ژله ای یا خمیری ماده مورد نظر را دارد برای تعیین اندازه و توزیع پراکندگی نانوذرات نقره سنتر شده از عصاره بهار نارنج، میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل LEO-912AB با ولتاژ اعمالی 120 کیلو ولت برای گسیل اشعه الکترونی استفاده شد. جهت آماده سازی نمونه در تصویر برداری TEM از حلال مناسب نانوذرات استفاده می شود که همگنی نانوذرات با دستگاه تراسونیک به مدت یک ساعت انجام می گیرد مقدار بسیار کمی توسط میکروپیت از این محلول روی شبکه های پوشیده شده با کربن قرار داده شده تا لایه نازکی از نمونه حاصل شود و آماده تصویر برداری گردد. مورفولوژی و ریخت شناسی نانوذرات نقره سنتر شده از عصاره توسط دستگاه میکروسکوپ الکترون روبشی میدان گسیلی (FESEM) مدل Mira-Xmu مورد بررسی قرار گرفت برای آماده سازی نمونه تصویر برداری، پودر نانوذرات با لایه بسیار نازکی از طلا پوشش داده می شود تا باعث رسانای سطحی شده طوری که مسیر باریکه های الکترونی برگشتی را تغییر ندهد همچنین پودر نانوذرات نقره بایستی روی یک سطح هادی که بیشتر از جنس آلومینیوم است پخش شده باشد.

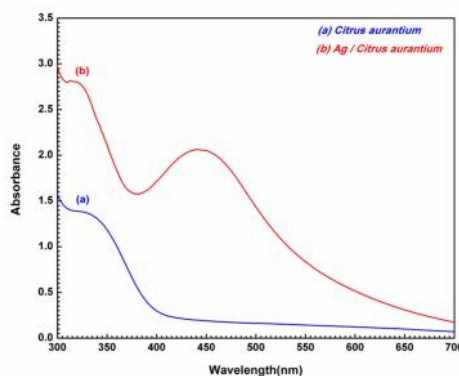
اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره: سوبه های میکروبی استاندارد / شریشیا کلی (ATCC11303)، سودوموناس آئروژینوزا (ATCC 342)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 6538) و باسیلوس سرئوس (ATCC 12817) از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران (IROST) تهیه شدند. جهت بررسی تعیین حداقل غلظت های باز دارنده (Minimum Inhibitory Concentration) از روش رقت در لوله استفاده شد. بدین منظور ۱۰ لوله آزمایش استریل آماده و از یک تا ۱۰ شماره گذاری شدند. یک میلی لیتر از



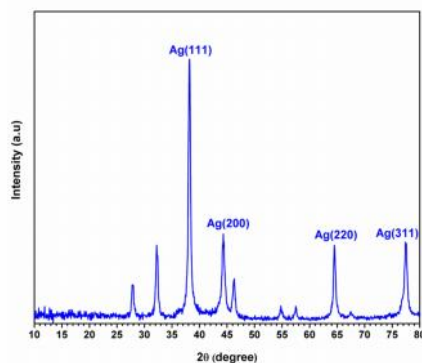
شکل ۱ - نانو ذرات سنتز شده (A) قبل از شیک (B) ۱۰ دقیقه بعد از شیک (C) ۲۴ ساعت بعد از شیک

محاسبه رابطه شرر، سایز کریستالی نانوذرات n به دست می‌آید که با تصاویر TEM همخوانی خوبی دارد.

شکل ۴، نشان دهنده میکروسکوپ الکترونی عبوری، TEM نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بهار نارنج می‌باشد. همانطور که از تصاویر مشخص است نانوذرات نقره در تصویر تیره‌تر بوده و شکل کروی دارند و از توزیع مناسبی برخوردار هستند و اطراف نانوذرات زمینه‌ای روشن مشاهده می‌شود که مربوط به حلال است و به دلیل اینکه چگالی



شکل ۲ - طیف اسپکتوفتومتر مرئی-فرابنفش نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بهار نارنج (A) عصاره (B) عصاره به همراه نقره



شکل ۳ - الگوی پراش اشعه ایکس، XRD نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بهار نارنج

نشان از تولید نانوذرات نقره در محلول است که در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج طیف سنجی ماوراءبنفش- مرئی عصاره بهار نارنج قبل و بعد از سنتز نانوذرات نقره در شکل ۲ آورده شده است. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود عصاره به همراه نقره در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ نانومتر پیک جذبی دارد در حالیکه در عصاره چنین جذبی مشاهده نمی‌شود. وجود پیک جذبی حداکثر در منحنی به دست آمده از عصاره به همراه نقره در محدوده ۴۰۰ الی ۴۵۰ یکی از ساده‌ترین روش‌ها برای نشان دادن سنتز نانوذرات نقره است.

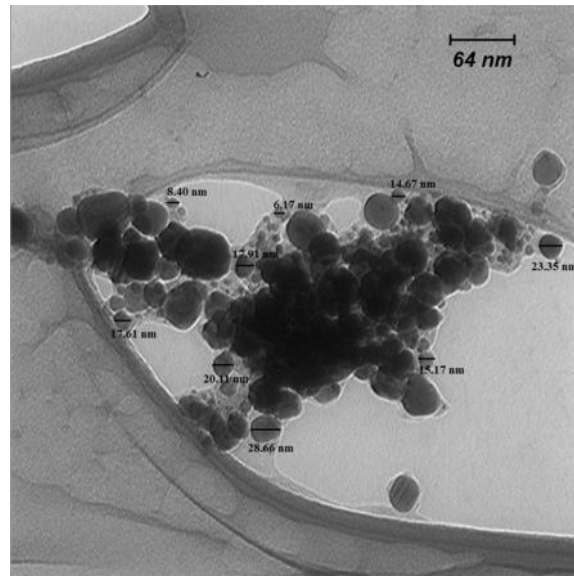
تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات نقره: شکل ۳، الگوی پراش اشعه ایکس، XRD نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بهار نارنج را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود پیک‌های (۱۱۱)، (۲۰۰)، (۲۲۰)، (۳۱۱) در $2\theta = 38.17^\circ$ ، 4.31° ، 64.50° و 74.47° مربوط به ساختار FCC نانوذرات نقره می‌باشد که با الگوی استاندارد پراش اشعه ایکس نقره تطابق کامل دارد (دارد) ((پهنای کم الگوی پراش در نصف ماکزیمم پیک (۱۱۱) نشان دهنده بزرگ بودن سایز کریستالی نانوذرات نقره می‌باشد. سایز کریستالی نانوذرات نقره از رابطه شرر به دست می‌آید.

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

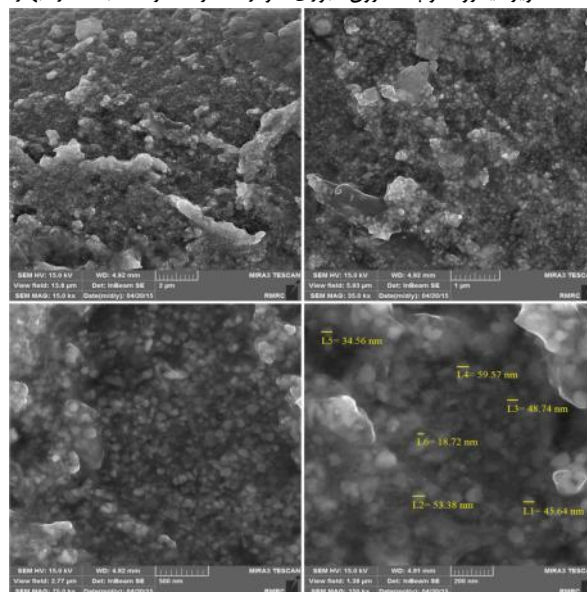
که در رابطه فوق $k=0.9$ فاکتور شکلی بوده، λ طول موج پرتو ایکس و معادل 1.5406 \AA می‌باشد. پهنای کامل در نصف ماکزیمم پیک پراش و θ زاویه مربوط به پیک پراش می‌باشد. از

نانومتر دارند که با توزیع لانگ نرمال، قطر میانگین در حدود ۲۵ نانومتر است. شکل ۵، تصاویر میکروسکوپ الکترون روبشی گسیل میدانی، FESEM نانوذرات نقره سنتز شده

حلال در مقابل عبور نور از چگالی نانوذرات نقره کمتر بوده و به همین دلیل نانوذرات نقره در تصویر، تیره تر و حلال، روشن تر مشاهده می شود. نانوذرات سنتز شده، قطری در محدوده ۵ تا ۴۰



شکل ۴- تصویر میکروسکوپ الکترون عبوری نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بهار نارنج



شکل ۵- تصویر میکروسکوپ الکترون روبشی گسیل میدانی نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره بهار نارنج با بزرگ‌نمایی مختلف

جدول ۱- نتایج MIC و MBC ایجاد شده توسط نانوذرات نقره تولید شده به روش سبز بر روی سویه های باکتریایی گرم مثبت و منفی

MBC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	سویه های باکتریایی
۱۰	۵	اشریشیا کلی ATCC 11303
۲۰	۱۰	سودوموناس آئروژینوزا ATCC 34
۴۰	۲۰	استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538
۴۰	۲۰	باسیلوس سرئوس ATCC 12817

MIC (حداقل غلظت‌های باز دارندگی) و MBC (حداقل غلظت‌های کشندگی)

میلی لیتر تعیین شد.

بحث و نتیجه‌گیری

تولید نانوذرات به علت خواص شیمیایی و الکتریکی غیر معمول که دارند جالب توجه است. از این بین فلزاتی مانند نقره که رزونانس پلاسمون سطحی قوی که دارند در سنتز نانو بسیار حائز اهمیت هستند (۴-۶). روش‌های فیزیکی تولید نانوذرات نیازمند صرف انرژی بالایی بوده و روش شیمیایی نیز معمولاً منجر به باقی ماندن مقداری از واکنش‌های سمی و عدم استفاده از ذرات حاصل در کاربردهای زیستی می‌شود به همین دلیل اخیراً بیوسنتز نانوذرات به وسیله گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها به عنوان روش زیست سازگار و سبز مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. استفاده از عصاره برگ و میوه گیاهان به دلیل هزینه پایین، ایمنی، غیر سمی و سازگار با محیط می‌تواند جایگزین بهتری برای روش‌های قبلی تولید نانو شود (۱۱-۱۵).

در این تحقیق نحوه سنتز سبز نانوذرات نقره عصاره بهارنارنج و اثرات ضد باکتریایی آن مورد بررسی قرار گرفت. تغییر رنگ مشاهده شده به قهوه ای تیره در عصاره بهارنارنج یک نشانه واضح از تشکیل نانوذرات نقره در واکنش بوده که این تغییر رنگ ناشی از ارتعاشات پلاسمون سطحی در نانوذرات است (۲۴). طیف UV-Vis ثبت شده به طور کامل نشان دهنده افزایش ارتعاشات پلاسمون سطحی در طول موج ۴۵۰ نانومتر است. در واقع الکترون‌های آزاد موجود در نانوذرات نقره با جذب نور مرئی برانگیخته می‌شود و به یک تراز انرژی بالاتر می‌روند، ولی چون الکترون در حالت برانگیخته ناپایدار است بنابراین دوباره به تراز انرژی پایه برمی‌گردد یک فوتونی را از خود ساطع می‌کند (۲۵). شکل ۲ نشان داد که max در حدود ۴۲۰ نانومتر است که با نتایج سایر محققین هم خوانی دارد (۱۶ و ۲۶-۲۴). در این مطالعه با استفاده از روش XRD از وجود و سنتز نانوکریستال‌های نقره توسط عصاره بهارنارنج اطمینان حاصل شد. با استفاده از الگوی XRD اندازه کریستال‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به

با عصاره بهارنارنج را با بزرگنمایی‌های مختلف ۲، ۱ میکرومتر، ۵۰۰ و ۲۰۰ نانومتر نشان می‌دهد که همه این بزرگنمایی‌ها مربوط به یک نمونه می‌باشد. تصویر FESEM نشان دهنده ابعاد نانومتری ذرات نقره بوده و بیانگر شکل تقریباً کروی در همه بزرگنمایی‌ها می‌باشد. تعیین سایز نانوذرات از طریق FESEM دقیق نمی‌باشد، چون قدرت تفکیک FESEM نسبت TEM پایین است و به همین دلیل برای بیان سایز میانگین از آنالیز TEM استفاده می‌شود. مطابق تصاویر FESEM اندازه تجمعی نانوذرات بین ۱۰ تا ۶۰ نانومتر متغیر است. در قسمت‌هایی از تصویر، تجمعی شدن با ابعاد بزرگتر از ۵۰ نانومتر مشاهده می‌شود که می‌توان با تکرار روش التراسونیک این ذرات را به صورت یکنواخت پخش نمود و تصویر برداری کرد.

سویه‌های میکروبی و روش بررسی اثرات ضد باکتریایی نانوذرات نقره: فعالیت ضد میکروبی نانوذرات تولید شده نیز با مشاهده و اندازه‌گیری کمترین غلظت مهار کنندگی و کمترین غلظت باکتری کشی در محلول نانوذرات نقره بر روی تمامی میکروارگانیسم‌های آزمایش شده به اثبات رسید. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود محلول حاوی نانوذرات نقره دارای فعالیت ضد میکروبی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است. کمترین غلظت مهار کنندگی و کمترین غلظت باکتری کشی نانوذرات *Citrus aurantium* بر روی سویه‌های استاندارد باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژنز و استافیلوکوکوس اورئوس تعیین گردید. در این مطالعه کمترین غلظت مهار کنندگی نانوذره برای باکتری اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژنز به ترتیب برای نانوذره معادل ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر و کمترین غلظت باکتری کشی نانوذره به ترتیب ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر، در حالی که کمترین غلظت مهار کنندگی نانوذره برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری باسیلوس سرئوس به ترتیب معادل ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر و کمترین غلظت باکتری کشی نانوذره به ترتیب ۴۰ و ۸۰ میکروگرم بر

بر روی هر سه سویه برای نانوذرات نقره با میانگین قطر ۷ نانومتری به ترتیب با ۳، ۲ و ۱۹ میکروگرم بر میلی لیتر بود، در حالیکه کمترین غلظت مهارکنندگی در تحقیق حاضر به ترتیب ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد برای نانوذرات نقره با میانگین قطر ۷۰ نانومتر، به ترتیب ۳۴ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شد که تا حدودی مشابه نتایج حاصله در این تحقیق می باشد که این نشان دهنده اینست که اندازه نانوذرات هر چه قدر بزرگتر شود باعث کاهش فعالیت ضد باکتریایی نانو ذره خواهد شد (۳۰).

در این مطالعه مشخص شد که نانوذرات نقره سنتز شده به روش سبز به مراتب بر روی باکتری های گرم منفی مانند اشرشیا کلی، موثرتر بودند در حالی که روی باکتری های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس تاثیر کمتری داشتند که این نتایج با تحقیق ناندا و همکاران (۳۱)، مبارک علی و همکاران (۳۲) همخوانی دارد که علت این امر ضخامت بیشتر دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت از جمله استافیلوکوکوس ذکر کرد چون باکتری های گرم منفی دارای دیواره نازک تری بوده و از طرف دیگر سطح بیرونی باکتری های گرم منفی لایه ای از لیپوپلی ساکارید وجود دارد که دارای بار منفی است. وجود بار منفی در سطح این باکتری ها باعث آسان تر کردن برهم کنش نانوذرات نقره که دارای بار مثبت ضعیف هستند، می شود. در نتیجه احتمالاً این برهم کنش در ابتدا باعث ایجاد سوراخ در دیواره سلولی شده و متعاقباً با ورود نانو ذره به درون سلول باکتری در نهایت باعث مرگ باکتری باکتری می شود. همچنین در مطالعات شیری واستاوا و همکاران (۳۳) و گوزمان و همکاران نشان دادند هر چقدر اندازه نانوذرات کوچکتر باشد دارای خاصیت ضد باکتری بیشتری از خود نشان خواهند داد به همین دلیل تفاوت در حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت باکتری کشی در انواع نانوذرات سنتز شده را می توان به تفاوت اندازه نسبت داد. همچنین این تفاوت در نتایج می تواند مربوط به نوع شکل نانوذره و نیز تفاوت ساختاری و ژنتیک سویه ها با توجه به مکان جغرافیایی باشد.

طوری که اندازه کریستال در حدود ۳۰ نانومتر بود. الگوی XRD با نیترا نقره چهار پیک مجزا در زاویای ۱۱۱ و ۲۰۰ و ۲۲۰ و ۳۱۱ را نشان می دهد که این یافته کاملاً با نتایج حاصل از پژوهش سایر محققین هم خوانی دارد (۱۵، ۱۶ و ۲۴-۲۶). شکل (TEM/SEM) جهت بررسی شکل و اندازه نانوذرات تولیدی از میکروسکوپ الکترونی روبشی و عبوری را نشان می دهد که نانوذرات نقره به اشکال کروی و در محدوده ۳۰ تا ۵۰ نانومتر است. نتیجه فوق با نتیجه حاصل از پژوهش سایر محققین همخوانی دارد (۹، ۱۳، ۲۵، ۲۶) البته لازم به ذکر است که تغییرات دما و PH و مدت زمان و غلظت های مختلف بر هم کنش محلول نمکی و عصاره گیاهی می تواند بر روی دامنه تغییرات اندازه نانوذرات تاثیر داشته باشد (۲۷). پس از ظهور و افزایش مقاومت باکتری ها نسبت به آنتی بیوتیک ها تحقیقات زیادی برای جایگزینی آنتی بیوتیک ها در حال انجام شدن است. یکی از کاربردهای مهم نانوذرات نقره در پزشکی، کاربرد آنها به عنوان مواد ضد میکروبی است. با پیشرفت نانو تکنولوژی بررسی اثرات نانوذرات نقره بر روی باکتری اشرشیا کلی نشان داد که این نانوذرات دارای خاصیت ضد میکروبی دارد (۲۸).

در مطالعه حاضر اثر نانوذرات نقره سبز سنتز شده و عصاره بهار نارنج بر روی سویه های استاندارد باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی، سودوموناس آروژنز و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی گردید. در گزارش های ارائه شده در مورد کمترین غلظت مهارکنندگی و کمترین غلظت باکتری کشی نانو نقره نتایج متفاوتی حاصل شده است، کریشنا راج و همکاران کمترین غلظت مهارکنندگی نانو نقره را بر روی اشرشیا کلی و سودوموناس آروژنز به ترتیب معادل ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش کرده اند که این میزان در تحقیق حاضر به ترتیب ۵ و ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر است (۲۹). همچنین کایدارف و همکاران تاثیر نانوذرات نقره با میانگین مختلف را بر روی باسیلوس سرئوس، اشرشیا کلی، سودوموناس آروژنز مورد بررسی قرار دادند. کمترین غلظت مهارکنندگی نانوذرات نقره

using *Turbinaria conoides* and its characterization. JNSC. 2013; 3: 44.

11. Jegadeeswaran P, Shivaraj R, Venckatesh R. Green synthesis of silver nanoparticles from extracts of *Padina tetraströmatica* leaf. Dig J Nanomater Biostruct. 2012; 7(3): 991-8.

12. Kalishwaralal K, Deepak V, Ram Kumar Pandian S, Kottaisamy M, Barathmani Kanth S, Kartikeyan B, et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010; 77:257-62.

13. Shahverdi AR, Minaeian S, Shahverdi HR, Jamalifar H, Nohi AA. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: a novel biological approach. Proc Biochem. 2007; 42:919-23.

14. Gajbhiye M, Kesharwani J, Ingle A, Gade A, Rai M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. Nano med NBM. 2009; 5:382-6.

15. Shankar SS, Rai A, Ahmad A, Sastry M. Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core Ag shell nanoparticles using *Neem* (*Azadirachta indica*) leaf broth. J Colloid Interface Sci. 2002; 275:496-502.

16. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. Biotechnol Adv. 2013; 31(2): 346-56.

17. Moraes TM, Kushima H, Moleiro FC, Santos RC. Effects of limonene and essential oil from *Citrus aurantium* on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion, Chem. Biol. Interact. 2009; 180: 499-505

18. Pultrini Ade M, Galindo LA, Costa M. Effect of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. Life Sci. 2006; 78: 1720-1725.

19. Suryawanshi J. A. S, An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases. Afr. J. Plant Sci. 2011; 7: 390-5.

20. Mahmoudi R, Ehsani A, Tajik H, Akhonzade Basti A, Khosrowshahi A. Antimicrobial effects of *Mentha Longifolia* L. essential oil and *Lactobacillus casei* against *staphylococcus aureus* in Iranian white cheese. 2011; 3(1): 147-161.

21. Kermanshah H, Hashemi KS, Arami S, Mirsalehian A, Kamalinejad M, Karimi M, et al. Antibacterial effect of hydro alcoholic extract of *Salvia Officinalis* and *Mentha longifolia* on three bacteria cause tooth decay in vitro. Journal of Dental School. 2011; 4: 232-7.

22. Salehi M, Reissnia N, Mehrabian S. Antibacterial effect of external shell of *Pistacia Vera* extract. IJMB. 2011; 3(1): 53-9.

23. Owen E A, William G. I. X-Ray Measurements on Lithium at Low Temperatures. J. Sci Instrum. 1954; 31:17-26.

24. Jagtap UB, Bapat VA. Green synthesis of

اندازه و مورفولوژی خاص نانوذرات باعث شده که بتواند با آسیب رساندن و تخریب غشاء توانایی نفوذ به غشاء سیتوپلاسمی و اثر بر زنجیره تنفس سلول و DNA و RNA فعالیت ضد میکروبی بالایی از خود نشان دهند (۳۴).

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل که ما را در اجرای هر چه بهتر تحقیق یاری کردند صمیمانه سپاسگذاری می‌نماییم.

منابع

1. Nadagouda MN, Hoag G, Collins J, Varma RS. Green synthesis of Au nanostructures at room temperature using biodegradable plant surfactants. Cryst Growth Des. 2009; 9: 4979-83.

2. Tran QH, Nguyen VQ, Le AT. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Adv Nat Sci. 2013; 4: 3871-8.

3. Faure C, Derre A, Neri W, Spontaneous formation of silver nanoparticles in multilamellar vesicles. J Phys Chem B. 2003; 107: 4738-46.

4. Jensen TR, Malinsky MD, Haynes CL, Duynes RPV. Nanosphere lithography: tunable localized surface plasmon resonance spectra of silver nanoparticles. J Phys Chem. 2000; 104: 10549-56.

5. Zhang YH, Chen F, Zhuang JH, Tang Y, Wang D. Synthesis of silver nanoparticles via electrochemical reduction on compact zeolite film modified electrodes. Chem Commun. 2002; 23: 2814-15.

6. Tsuji T, Kakita T, Tsuji M. Preparation of nano-size particles of silver with femtosecond laser ablation in water. Appl Surf Sci. 2003; 206: 314-20.

7. Speth TF, Varma RS. Microwave-assisted green synthesis of silver nanostructures. Accounts Chem Res. 2011; 44: 469-478.

8. Senapati S, Syde A, Moez S, Kumar A, Ahmah A. Intracellular synthesis of gold nanoparticles using alga *Tetraselmis kochinensis*. Materials Letters. 2012; 104: 10549-56.

9. Sahayaraj K, Rajesh S. Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. 2011; 23:228-244

10. Rajeshkumar S, Malarkodi C, Gnanajobitha G, Paulkumar K, Vanaja M, Kannan C, et al. Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles

silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* lam. Seed extract and its antibacterial activity. *Ind Crops Prod.* 2013; 46: 132-7.

25. Thangaraju N, Venkatalakshmi RP, Chinnasamy A. Synthesis of silver nanoparticles and the antibacterial anticancer activities of the crude extract of *Sargassum polycystum* C. Agardh. *Nano Biomed. Eng.* 2012; 4(2): 89-94.

26. Honary S, Barabadi H, Gharaei-Fathabad E, Naghibi F. Green synthesis of silver nanoparticles induced by the fungus *Penicillium citrinum*. *Trop J Pharm Res.* 2013; 12:7-11.

27. Renu S, Arunachalam K, Annamalai P, Selvaraju K, Kanchi Subramanian, Vilwanathan. *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2013; 108:80-4.

28. Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 2004; 275: 177-182.

29. Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against Water borne pathogens. *Coll surfa B: Biointerfaces.* 2010; 76: 50-6.

30. Khaydarov RR, Khaydarov RA, Estrin Y, Evgrafova S, Scheper T, Endres C, Cho SY. Silver nanoparticles nanomaterials: Risks and benefits. *NATO Science for Peace and Security Series C: Environ Security.* 2009; 287-29.

31. Nanda A, Saravanan M. Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 2010; 77:214-8.

32. Mubarakali D, Thajuddin N, Jeganathan K, Gunasekaran M. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 2011; 85:360-5.

33. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2007; 18:103-18.

34. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine.* 2012; 8:37-45.

Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles by using the extract of *Citrus aurantium*

Saber Heydarzadeh, MSc of Biochemistry, Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran. heydarzadehsaber@gmail.com

***Hashem Yaghoubi**, PhD, Assistant Professor of Biochemistry, Department of Biology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran. (*Corresponding author) yaghoubi_h@iauardabil.ac.ir

Abstract

Background: As nanoparticles have multiple applications, there are many different methods for the production of silver nanoparticles (Ag-NPs). Recently, plants are being used in the synthesis of nanoparticles, due to their cost- effectiveness and eco-friendliness approach. In this study, the biosynthesis of silver nanoparticles using extract of *Citrus aurantium* for its antimicrobial properties has been reported.

Methods: in this study, the extract of *Citrus aurantium* as the reducing agent was used for the biosynthesis of silver nanoparticles. Reduction of Ag⁺ ion was obtained after 24 h using *Citrus aurantium* extract in the presence of 1 mM silver nitrate (AgNO₃) solution. The size, structural, optical and morphological properties of nanoparticles were analyzed by facility of: X-ray Diffraction and Field Emission Scanning (Transmission) Electron Microscope.

Result: UV-Vis spectrum exhibit an absorption band at around 400-450 nm suggesting the formation of biological Ag nanoparticles. The size and morphological properties of nanoparticles were assessed by TEM which showed that particles have spherical shape with diameter of about 5-40 nm. Silver nanoparticles presented the antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative bacteria.

Conclusion: The extract of *Citrus aurantium* has the ability of reducing Ag⁺ ion to Ag nanoparticles. Also, Ag nanoparticles produced by green synthesis have good antibacterial activity.

Keywords: Green synthesis, *Citrus aurantium*, Silver nanoparticle