



Scan online to view this article

Green biosynthesis of silver nanoparticles by freshwater cyanobacteria *Nostoc* spp. and evaluation of its antimicrobial activity

Fatemeh Zandi¹, Bahareh Nowruzi^{*2}, Sarvenaz Falsafi¹

1. Department of microbiology, faculty of advanced science and technology, Tehran medical science, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Biotechnology, Faculty of Converging Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background: Cyanobacteria are one of the important candidates in nanoparticle biosynthesis due to their ability to collect heavy metals. Therefore, the aim of this study was to produce and characterization of the specificity of silver nanoparticles by the native cyanobacterial strain of *Nostoc* spp.

Materials and Methods: After culturing and molecular identification of cyanobacteria *Nostoc* spp., boiling and wet biomass methods were used to produce silver nanoparticles at different concentrations. Characterization of nanoparticle production were performed by optical spectroscopy, Ultraviolet (UV-Vis), Raman and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), scanning electron microscopy (SEM). As well as antimicrobial activity of silver nanoparticles was performed by antibiogram assay.

Results: The results of UV-Vis showed that the production of silver nanoparticles with the help of wet biomass at a concentration of 1 mM had a higher adsorption rate than the boiling method. The results of FTIR showed the successful production of silver nanoparticles using the wet biomass method at a concentration of 1 mM silver nitrate. In addition, the results of one-way analysis of variance and Tukey's test showed significant inhibitory power of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*, *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusion: *Nostoc* spp., as a potential strain in the production of silver nanoparticles have unique properties and performance for use in microbial biotechnology.

Keywords: Cyanobacteria *Nostoc* spp., bioactive compounds, green biosynthesis of silver nanoparticles, Iau Science.

Corresponding author:

Iran

Email: bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir





برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بیوسنتز سبز نانوذرات نقره تولید شده توسط یک سیانوباکتری جنس *Nostoc spp.* آب شیرین و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی فاطمه زندی^۱، بهاره نوروزی^{۲*}، سروناز فلسفی^۱

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران
۲. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سیانوباکتری‌ها، به دلیل توانایی در جمع‌آوری فلزات سنگین یکی از کاندیدهای مهم در بیوسنتز نانوذرات هستند. بنابراین هدف از این پژوهش، تولید و بررسی خصوصیت نانوذرات نقره توسط سویه سیانوباکتری بومی جنس *Nostoc spp.* است.

مواد و روش‌ها: پس از کشت و شناسایی مولکولی سیانوباکتری جنس *Nostoc spp.* از روش‌های جوشاندن و بیومس تر برای تولید نانوذرات نقره در غلظت‌های مختلف استفاده گردید. تعیین خصوصیت تولید نانوذرات به روش‌های طیف سنجی نوری ماورای بنفش (UV-Vis)، طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز (FTIR)، پراکندگی نور دینامیکی (DLS)، میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) انجام گرفت. علاوه بر آن فعالیت ضد میکروبی نانوذرات نقره به روش آنتی‌بیوگرام انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از UV-Vis نشان داد که تولید نانوذرات نقره با کمک بیومس تر در غلظت ۱ میلی‌مولار نسبت به روش جوشاندن، میزان جذب بیش‌تری داشته‌است. نتایج حاصل از FTIR، تولید موفق نانوذرات نقره را با استفاده از روش بیومس تر را در غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات نقره نشان داد. DLS، اندازه نانوذرات تولیدی را در حدود ۲۸ تا ۵۰ نانومتر و میکروسکوپ الکترونی SEM، بین ۲۸ تا ۵۰ نانومتر نشان داد. به‌علاوه، نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، قدرت مهارکنندگی قابل توجه نانوذرات نقره را علیه باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *E. coli* و *Pseudomonas aeruginosa* نشان داد.

نتیجه‌گیری: سویه سیانوباکتری بومی جنس *Nostoc spp.* به‌عنوان یک سویه بالقوه در تولید نانوذرات نقره، خواص و کارایی منحصر به فردی برای استفاده در بیوتکنولوژی میکروبی خواهد داشت.

واژگان کلیدی: سیانوباکتری جنس *Nostoc spp.*، ترکیب‌های زیست فعال، بیوسنتز سبز نانوذرات نقره، Iau Science.

مقدمه

ساختارهای زیستی مورد استفاده، سیانوباکتری‌ها، توجه خاصی را به خود جلب کرده‌اند، زیرا آن‌ها توانایی از بین بردن فلزات سمی را دارند (۲). سیانوباکتری‌ها، با توانایی خود در تثبیت نیتروژن اتمسفر (N₂) با احیا گاز نیتروژن به آمونیاک و با استفاده از آنزیم‌های نیتروژن ردوکتاز متمایز می‌شوند (۳). این یک مزیت قابل توجه در نقش آن‌ها در تبدیل زیستی فلزات به نانوذرات است، زیرا آن‌ها توانایی حذف یون‌های فلزات سنگین را از محیط اطراف خود دارند. علاوه بر این، آن‌ها حاوی مولکول‌های زیستی مختلفی از جمله متابولیت‌های ثانویه، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها

در حال حاضر نانو ذرات، با ویژگی‌های منحصر به فرد خود، نقش مهمی را در مواردی همانند تشخیص پزشکی، ژن درمانی و مهندسی بافت ایفاء می‌کنند (۱). در میان

نویسنده مسئول:

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیکی: bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۵

ذرات نقره با فعالیت ضد میکروبی بالقوه توسط سیانوباکتریوم بومی جنس نوستوک آب شیرین انجام شده است. این پژوهش، جزء اولین کارهای انجام شده در ایران است. در این بررسی علاوه بر سنتز نانوذرات نقره و تأیید آن‌ها به کمک تکنیک‌های آزمایشگاهی، از روش‌های مولکولی نیز به منظور شناسایی سویه مورد بررسی استفاده گردیده است.

مواد و روش‌ها

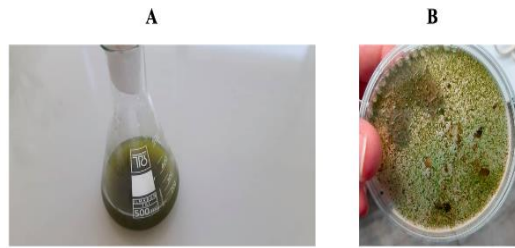
فهرست مواد مصرفی و دستگاه‌ها و شرکت‌های سازنده محیط کشت BG-11₀، CTAB، آمونیوم سیترات، نیترات نقره، ایزوپروپانول و کلروفرم از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. پرایمرهای Forward و Reverse نیز از شرکت سیناکلون، و دیسک امپیسیلین ۱۰ و دیسک سیپروفلوکسوسین ۵ از شرکت پادتن طب ایران تهیه شدند. به علاوه دستگاه‌های پراکندگی نور دینامیکی (DLS) مدل Sympatec Helos H2396 (آلمان)، اسپکتروفتومتر UV-Vis (شرکت UNICO، آمریکا)، میکروسکوپ الکترونیر SEM (شرکت میکروسکوپ الکترونیر SEM، جمهوری چک)، FTIR (شرکت Thermo، آمریکا)، سانتریفیوژ (شرکت بهداد، ایران) و فوتومیکروسکوپ (شرکت سلسترون، آلمان) استفاده گردید.

الف) کشت سیانوباکتری جنس *Nostoc spp.* سویه سیانوباکتری جنس *Nostoc spp.* از مجموعه کشت سیانوباکتری های دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات CCC (*Cyanobacteria culture collection*) تهیه گردید. نمونه متعلق به آب‌های شیرین روان در جنگل النگ دره استان گلستان است. نمونه‌های آب توسط بطری‌های پلاستیکی از سطح و کناره‌های رودخانه جمع-آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور کشت و خالص‌سازی نمونه‌های آب ابتدا از محیط کشت جامد BG-11₀ استفاده گردید. بعد از دو هفته، کلنی‌های رشد یافته به منظور خالص‌سازی، در محیط کشت‌های جداگانه دوباره کشت گردیدند. کشت نمونه‌های سیانوباکتری در اتاقک رشد با دمای $20 \pm 2^\circ \text{C}$ و روشنایی ممتد فلورسنت با شدت ۶۰ میکروانشتین در مترمربع در ثانیه انجام شد و در نهایت عکس‌های ماکروسکوپی تهیه گردید (شکل ۱) (۱۵).

و رنگدانه‌ها هستند که خواص زیستی مهمی مانند فعالیت ضد میکروبی و ضدسرطانی را دارند (۴). در میان محصول‌های مهم نانوتکنولوژی، نانوذرات نقره AgNPs با اندازه کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر، به‌عنوان کاندیدای مؤثری در جهت رساندن بسیاری از بیومولکول‌های بزرگ یا مولکول‌های دارویی حائز اهمیت هستند (۵). نانوذرات نقره، دارای ویژگی‌های مشخص زیستی با کاربردهای متنوع در درمان‌های ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضدویروسی و ضدسرطانی هستند (۶). نانوذرات نقره، اهمیت بالایی در درمان عفونت‌های خارجی، بهبود زخم و ضد عفونی کردن تجهیزات پزشکی را بر عهده دارند (۷). تولید نانوذرات به روش زیستی، به‌واسطه دوست‌دار محیط زیست بودن و هزینه پایینی که داراست، اهمیت زیادی پیدا می‌کند (۸). به‌علاوه این‌که نیازی به استفاده از دما و فشار بالا و هم‌چنین ترکیب‌های شیمیایی سمی نبوده، بنابراین این رویکرد می‌تواند به‌عنوان یک روش اقتصادی و ارزشمند در جهت تولید نانوذرات فلزی در مقیاس صنعتی مورد استفاده قرار گیرند (۹).

در روش‌های زیستی، عصاره میکروارگانیسم‌ها ممکن است هم به‌عنوان عوامل احیاء کننده و هم به‌عنوان عنوان عوامل پوشش دهنده در سنتز نانوذرات نقره عمل کنند. کاهش یون Ag^+ می‌تواند به‌وسیله ترکیب‌های مولکول‌های زیستی موجود در عصاره سیانوباکتری‌ها مانند آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، پلی‌ساکاریدها و ویتامین‌ها که برای محیط زیست بی‌خطر است، انجام شود. در این میان مشخص شده است که عصاره سیانوباکتری‌ها منبعی از ترکیب‌های با ارزش مانند کارتنوئیدها، اسیدهای چرب، پلی‌ساکاریدها، لیپیدها و سایر ترکیب‌های زیست فعال هستند که باعث سنتز ترکیب‌هایی در محیط کشت می‌شوند (۱۰، ۱۱). متابولیت‌های ثانویه به‌طور عمده در اعضای اسیلاتوریال و پس از آن به‌وسیله نوستوکال، کروکوکال، پلوروکاپسال و استیگونماتال وجود دارند (۱۲).

از آنجایی‌که جنس نوستوک (*Nostoc spp.*) دارای ترکیب‌های فعال زیستی بیش‌تری است (۱۲)، به‌نظر می‌رسد که توانایی احیای نمک نقره را دارا است. بنابراین به‌کارگیری عصاره آن‌ها جهت بیوسنتز نانوذرات فلزی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۳، ۱۴). بنابراین در مطالعه حاضر بیوسنتز نانو



شکل ۱. سیانوباکتری جنس *Nostoc* spp. تلقیح شده در محیط کشت (A) مایع و (B) جامد BG-11₀

۱۰۰ ml محلول نیترات نقره با غلظت‌های یک، دو و سه میلی‌مولار در pH ۷ تلقیح و در ۲۵°C قرار داده شد (۱۹،۱۸).

در روش جوشاندن، بیومس سیانوباکتری در ۶۰°C خشک شد. یک گرم وزن خشک در ۱۰۰°C جوشانده شد و در ۱۰۰۰۰ rpm برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت جمع‌آوری شد و برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شدند. سپس دو میلی‌لیتر از عصاره، درون ۱۰ ml محلول نیترات نقره یک میلی‌مولار ریخته شد. مخلوط واکنش در ۱۰۰°C قرار داده شد و هم زدن به‌طور مداوم انجام شد. محلول بی‌رنگ به تدریج به زرد مایل به قهوه‌ای تبدیل شد و سپس بعد از چرخش مداوم بعد از ۴۵ دقیقه به آرامی به قهوه‌ای تیره تبدیل شد. نانوذرات نقره سنتز شده، به کمک سانتریفیوژ در ۱۵۰۰۰ rpm و ۲۰ دقیقه در ۴°C جمع‌آوری و خشک شد تا در نهایت پودر نانو ذره نقره خالص به‌دست آمد. در نهایت طیف سنجی در فواصل زمانی (۰، ۲۴، ۱۲، ۴۸ ساعت) بین ۲۰۰ تا ۸۰۰ nm با استفاده از طیف سنجی نوری انجام شد (۲۰).

ث) آنالیز میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ (SEM)
نانوذرات تولید شده ابتدا توسط دستگاه اولتراسونیک پردازش گردیدند و تصویر برداری به کمک دستگاه میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ، انجام گرفت. سپس با چسب نواری رسانای آلومینیوم رسانا سازی شدند. در گام دیگر رساناسازی سطحی نمونه‌ها به روش PVD انجام گرفت. شکل‌های به دست آمده با میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ با بهره‌گیری از نرم افزار Image J واکاوی شده و میانگین اندازه نانوذرات موجود در شکل‌ها به‌دست آمد. جدول فراوانی نانوذرات در شکل‌ها نیز با نرم‌افزار Excel کشیده شدند (۱۸).

ج) طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز (FT-IR)

در این طیف سنجی، از روش تهیه قرص پتاسیم برماید (KBr) با مخلوط ماده استفاده شد. مقدار ۰/۱ گرم از

ب: شناسایی مولکولی براساس توالی 16S rRNA استخراج DNA

استخراج DNA به روش دستی CTAB انجام گردید و برای تعیین کیفیت DNA، از روش‌های کیفی به کمک لود کردن روی ژل الکتروفورز و کمی به کمک دستگاه نانودراپ استفاده شد.

تکثیر توالی ژن 16S rRNA

به‌منظور تکثیر توالی ژن ۱۶S rRNA، از پرایمرهای
27FI: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
S30Ra: 5'-۲۳ و (۱۶)
CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT (۱۷)
استفاده شد. برنامه PCR برای تکثیر ژن 16S rRNA در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام شد.

پ) آنالیزهای بیوانفورماتیک و رسم درخت فیلوژنتیک

توالی‌های فوروارد و ریورس با کمک نرم‌افزار BioEdit، هم‌ردیف‌سازی شدند. سپس توالی حاصل از هم‌ردیف‌سازی، به‌منظور مقایسه به کمک Blast N با توالی‌های موجود در بانک ژنوم مقایسه و درصد تشابه آن‌ها با سایر ژن‌های ثبت شده بررسی گردید. صد سویه‌ای که دارای بیش‌ترین شباهت با ژن مورد نظر بودند، به کمک سایت YMAFFT VERGEN هم‌ردیف‌سازی شدند و در نهایت پس از انتخاب بهترین مدل، رسم درخت فیلوژنتیک به کمک برنامه Iq tree web server انجام گردید. از سویه *Gloeobacter violaceus* VP3-01 (FR798924) به‌عنوان ریشه استفاده گردید.

ت) بیوسنتز نانوذرات نقره

در روش بیومس تر، کشت‌های فاز لگاریتمی توسط سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه در ۲۰°C، جدا شدند و سوپرناتانت دور ریخته شد. سه گرم بیومس تر با

ماده با ۰/۴ گرم پتاسیم برماید مخلوط شد و سپس به کمک دستگاه پرس مخصوص تهیه قرص IR تحت فشار ۱۵ تن قرص مربوطه آماده شد و طیف سنجی انجام گرفت (۲۱).

چ) پراکندگی نور دینامیک (DLS)

برای بررسی پراکندگی نور دینامیک، نمونه با جذب ویژه نانوذرات نقره بدون ته نشینی و دارای پایداری کلوئیدی برگزیده شد و درون ویال شیشه‌ای ریخته شد و سنجش پراکندگی نور دینامیک انجام گردید (۲۲).

ح) فعالیت آنتی باکتریال نانوذرات نقره (ارزیابی

سنجش حساسیت ضد میکروبی (AST)

ارزیابی ویژگی‌های ضد میکروبی با روش انتشار دیسک و نسخه ویرایش شده Nowruzi و همکاران انجام گرفت (۲۳). در این پژوهش سویه‌های باکتریایی *E. coli* ATCC 25922، *S. aureus* ATCC 25923 و *P. aeruginosa* ATCC 27853 سنجش شدند. سویه‌ها از کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی واقع در پژوهشکده زیست فناوری در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردیدند.

سویه‌های لیوفیلیزه برای ارزیابی شدن در بسترهای کشت مایع TSB نهاده شده و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵°C جای گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت با استفاده لوپ از TSB دارای سویه‌های ارزیابی شده بر روی بسترهای کشت‌های بلاد آگار کشت شده و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵°C جای گرفتند. پس از آماده شدن محلول‌های باکتریایی با غلظت نیم مک فارلند با سوآپ‌های استریل از محلول نیم مک فارلند برداشت شده و به گونه کشت چمنی بر روی بسترهای مولر هینتون آگار کشت داده شدند. بر روی هر پلیت مورد آزمون در کنار شعله با استفاده از پنس استریل، ۳ دیسک جایگذاری شد. یک دیسک آنتی‌بیوتیک به‌عنوان شاهد مثبت، یک دیسک آغشته شده به ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر نانوذره و یک دیسک برای کنترل منفی و بدون نانوذره بود. برای ارزیابی نانوذرات سنتز شده از دیسک دارای عصاره بدون نانوذرات نقره برای کنترل منفی بهره‌گیری شد. دیسک‌های سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم برای آزمون با سویه‌های *E. coli*، *aeruginosa* و *Pseudomonas* و دیسک آمپی‌سیلین ۱۰ میکروگرم برای آزمون با سویه *Staphylococcus aureus* به‌کار رفتند.

خ) روش‌های آماری

واکوی داده‌های آماری به‌دست آمده از هر آزمایش با نرم-افزار SPSS (نسخه ۲۴) و Excel انجام شد. معنی‌دار بودن تفاوت‌ها بین موارد اندازه‌گیری شده با آنالیز واریانس یک طرفه با حدود اطمینان ۹۵٪ و مقایسه میانگین‌ها با آزمون ANOVA و tukey انجام گردیده و یافته‌های مربوط به مقایسه‌ها به‌صورت نمودار با برنامه Excel نشان داده شد.

نتایج

الف) نتایج حاصل از شناسایی مولکولی

درخت فیلوژنتیک، روابط فیلوژنتیک بین سویه مورد مطالعه و سویه‌های مشابه را بر اساس توالی ژن 16S rRNA نشان داده است. سویه مورد مطالعه با رنگ قرمز مشخص شده است. اعداد کنار هر گره انشعابی، نشان‌دهنده فراوانی حاصل از آنالیز Bootstrap حاصل از ۱۰۰۰ تکرار است. با توجه به درخت فیلوژنتیک رسم شده، هر شاخه روابط بین آرایه‌ها از نظر نسل یا جد (نیاکان) را معین می‌کند. طول شاخه، بیانگر میزان تفاوت‌ها نسبت به نیای مشترک است. درخت رسم شده با روش Iq tree web server نشان داد که سویه سیانوباکتری جنس *Nostoc* spp. با قرابت فیلوژنتیکی ۹۴/۳٪ همراه با سایر سویه‌های جنس *Nostoc* درون یک کلاد قرار گرفته است (شکل ۲).

ب) نتایج ارزیابی سنتز نانوذرات نقره توسط بیومس

تر

در روش سنتز نانوذرات توسط بیومس تر، در غلظت ۱ میلی‌مولار در زمان صفر تا ۴۸ ساعت تغییر رنگ به قهوه‌ای تیره دیده شد که نشان از پایداری نانوذرات نقره بود. در غلظت ۲ و ۳ میلی‌مولار در زمان صفر تغییر رنگ به قهوه‌ای تیره مشاهده شد، اما در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تغییر رنگی مشاهده نشد و این نشان از عدم پایداری نانوذرات در این زمان‌ها در غلظت ۲ و ۳ میلی‌مولار بود. طیف سنجی نیز برای این غلظت‌ها در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت صورت گرفت (شکل ۳).

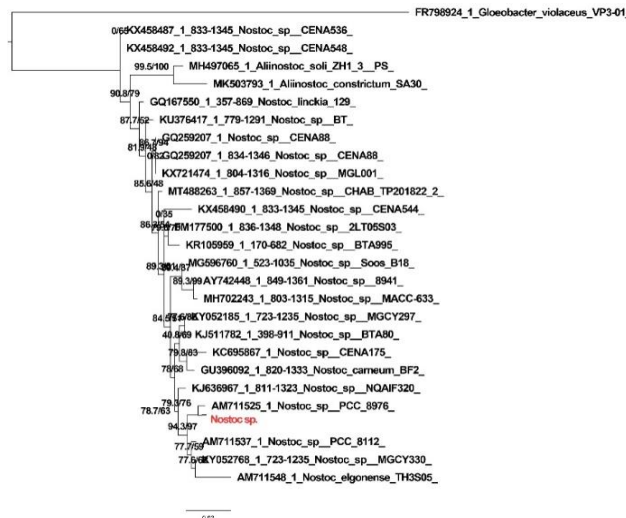
پ) نتایج ارزیابی تولید نانوذرات نقره با روش

جوشاندن

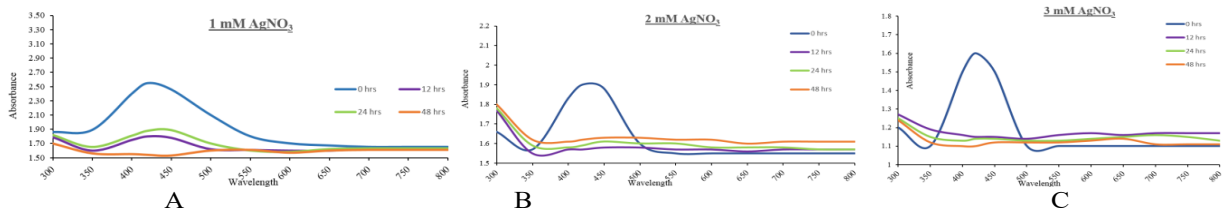
در سنتز نانوذرات نقره از طریق روش جوشاندن، با غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات نقره در زمان صفر، تغییر رنگ به قهوه‌ای تیره دیده شد که حاکی از پایداری نانوذرات نقره

سنجی UV-Vis در فواصل زمانی ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام گرفت.

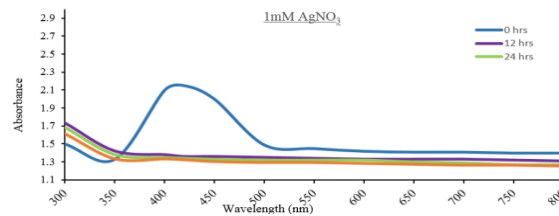
در این زمان بود (شکل ۴) اما در زمان های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، عدم تغییر رنگ در این غلظت، نشان از ناپایداری نانوذرات نقره بود. بعد از خشک شدن بیومس، طیف



شکل ۲. درخت فیلوژنتیک، روابط فیلوژنتیک بین سویه مورد مطالعه و سویه های مشابه را بر اساس توالی ژن 16S rRNA نشان می دهد.



شکل ۳. نمودار طیف سنجی UV-Vis غلظت یک (A)، دو (B) و سه (C) میلی مولار نیترات نقره تولیدی توسط بیومس تر.



شکل ۴. نمودار طیف سنجی نانوذرات نقره تولیدی با روش جوشاندن.

سنتز شده مشخص کرد که نقش اساسی و مهمی در احیای یون های نقره به نانوذرات نقره و پایداری نانوذرات حاصل دارند (شکل ۵).

طیف IR دو پیام برای ارتعاش کششی پیوند ($C_{sp^3}-H$) آلکان در ناحیه 2918 cm^{-1} و 2849 cm^{-1} و یک پیام دیگر برای ($C_{sp^2}-H$) آلکن در 3027 cm^{-1} نشان می دهد. پیک هایی متوسط در ناحیه حدود 1380 مربوط به CH_2 و CH_3 خمشی است. همچنین دو جذب در ناحیه 1633 و 1466 cm^{-1} نشان دهنده حلقه آروماتیک هستند. در ناحیه 1039 پیک مربوط به $C-N$ کششی به-

نتایج حاصل از طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز (FTIR)

در این روش از نانوذره های که با روش بیومس تر در غلظت یک میلی مولار نیترات نقره در زمان ۴۸ ساعت سنتز شده بود به منظور طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز (FTIR) استفاده گردید.

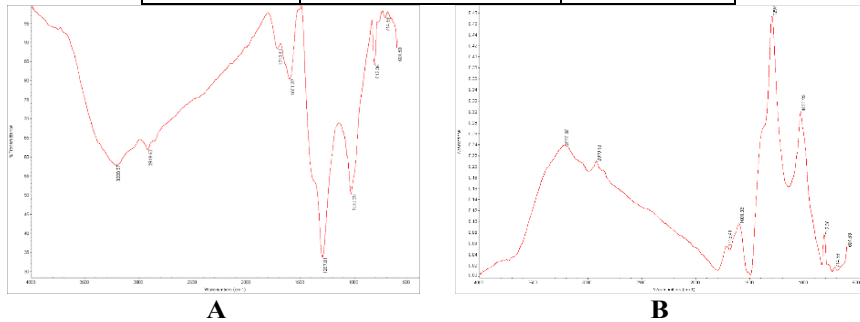
آنالیز داده های مربوط به تولید نانوذره نقره در شکل ۵ نشان داده شده است. پروتئین به عنوان عامل تثبیت کننده نانوذرات نقره را احاطه کرده است. طیف به دست آمده حضور گروه های مختلفی را برای نانوذرات نقره

گروه NH و OH در ناحیه 3146 cm^{-1} و 3250 cm^{-1} نشان داده شده است (جدول ۱).

صورت یک پیک متوسط دیده می شود. هم چنین جذب مشاهده شده در ناحیه 1694 cm^{-1} پیک مربوط به C=N و گروه آمیدی است. جذب های مربوط به ارتعاش کششی

جدول ۱. بررسی گروه های عاملی نانوذرات تولید شده در غلظت یک میلی مولار در زمان ۴۸ ساعت. پروتئین به عنوان عامل تثبیت کننده، نانوذرات نقره را احاطه کرده است.

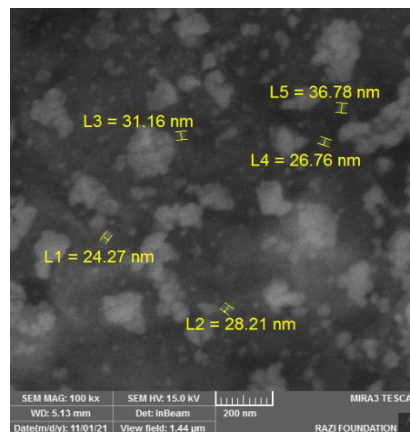
گروه عاملی	نوع	طول موج
N-H	آمید (N-H آزاد)	3230 cm^{-1}
C-H	آلکان	2919 cm^{-1}
C-H	آلکان	1713 cm^{-1}
C=C	آلکن ((CHR ₁ =CHR ₁))	1601 cm^{-1}
CH ₃ COOR	استر	1297 cm^{-1}
C-OH	الکل	1030 cm^{-1}



شکل ۵. نمودار حاصل از تجزیه و تحلیل طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز، از نوع TABLET مربوط به نانوذرات نقره تولید شده به روش بیومس تر در غلظت ۱ میلی مولار در زمان ۴۸ ساعت است. گروه های عاملی مشخص شده توسط پیک ها، وجود پوشش پروتئینی برای کاهش یون های نقره را نشان می دهند (A). تجزیه و تحلیل طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز از نوع ATR مربوط به نانوذرات نقره تولیدی به روش بیومس تر در غلظت ۱ میلی مولار در زمان ۴۸ ساعت. گروه های عاملی مشخص شده توسط پیک ها، وجود پوشش پروتئینی برای کاهش یون های نقره را نشان می دهند (B).

رسوب نانوذرات نقره در سطوح سلولی ایجاد شد (شکل ۶). نانوذرات نقره کروی کوچک با اندازه های ۲۸ تا ۵۰ نانومتر در سطوح سلولی رسوب کردند.

ث) آنالیز میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) با توجه به تصویر میکروسکوپ الکترونی، مشخص شد با افزودن بیومس تر به نیترات نقره با غلظت یک میلی مولار،



شکل ۶. تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM. اندازه نانوذرات به روش بیومس تر در غلظت یک میلی مولار در زمان صفر، بین ۲۸ تا ۵۰ نانومتر و نانوذرات کروی شکل بود.

سیانوباکتری جنس *Nostoc spp.* در غلظت یک میلی-مولار نیترات نقره در زمان ۴۸ ساعت، وجود سیگنال عنصری نقره تأیید شد (شکل ۷).

ج) طیف سنجی پراکندگی انرژی (اشعه ایکس) (EDS)

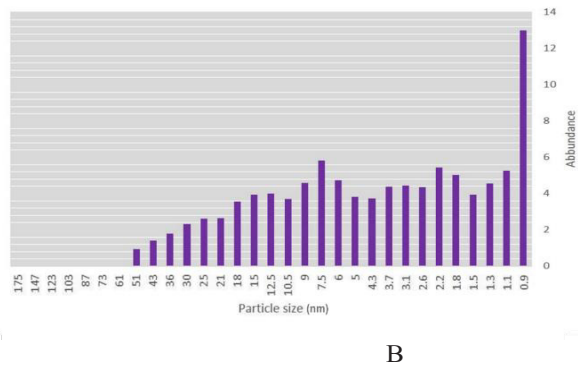
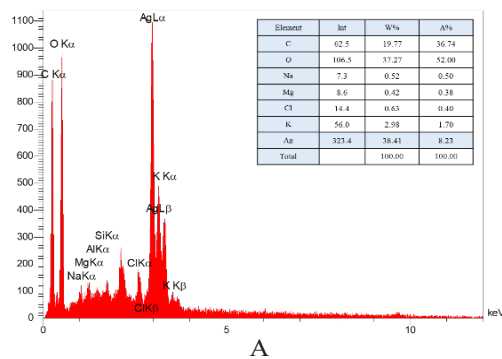
نتایج حاصل از طیف سنجی پراکندگی انرژی، وجود ذرات نقره را به میزان بیش تری با ردیابی عناصر مختلفی مانند منیزیم، سدیم، پتاسیم، کلسیم و کلرید نشان داد. در این تجزیه و تحلیل توسط طیف سنجی پراکندگی انرژی (اشعه ایکس) نانوذرات نقره سنتز شده به روش بیومس تر سویه

چ) آنالیز پراکندگی نور دینامیکی (DLS)

قطر هیدرودینامیکی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از بیومس تر در غلظت یک میلی مولار در زمان ۴۸ ساعت با دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) مدل

Sympatec Helos H ۲۳۹۶ اندازه گیری شد. نتایج مشخص کرد که نانوذرات نقره سنتز شده اندازه‌ای در

حدود ۰/۹ تا ۸۷ نانومتر داشته و میانگین اندازه نانوذرات نقره ۱۶/۱ نانومتر بود (شکل ۷).

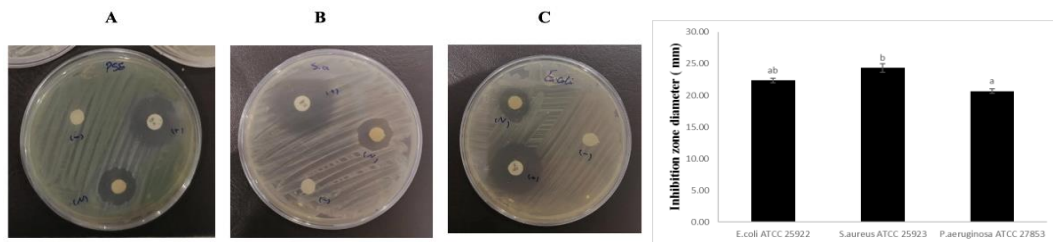


شکل ۷. طیف سنجی پراکندگی انرژی (اشعه ایکس) (EDS) نانوذرات نقره سنتز شده در روش بیومس تر سویه سیانوباکتری جنس *Nostoc spp.* با غلظت یک میلی‌مولار نیترات نقره در زمان صفر (A). تجزیه و تحلیل پراکندگی نور پویا (DLS) نانوذرات نقره سنتز شده در روش بیومس تر سویه سیانوباکتری جنس *Nostoc spp.* با غلظت یک میلی‌مولار نیترات نقره در زمان صفر (B).

ح) نتایج فعالیت آنتی باکتریال نانوذرات نقره (ارزیابی سنجش حساسیت ضد میکروبی)

وجود دارد. میانگین هاله عدم رشد بعد از ۳ تکرار و بررسی‌های آماری برای *E. coli*، *S. aureus* و *P. aeruginosa* به ترتیب برابر ۱۵/۳۳، ۱۹/۳۳ و ۲۲/۳۳ میلی‌متر بود (شکل ۸. A-C).

نتایج حاصل از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون Tukey نشان داد که تفاوت معناداری در قطر ممانعت از رشد در بین باکتری‌های *E. coli*، *S. aureus* و *P. aeruginosa*



شکل ۸. تست آنتی‌بیوگرام. پلیت‌های A تا C به ترتیب نشان دهنده (A) سودوموناس آئروژینوزا، (B) استافیلوکوکوس اورئوس و (C) اشیریشیاکلی، به همراه سه تکرار N= دیسک حاوی نانوذرات نقره، + نشان دهنده کنترل مثبت و - نشان دهنده دیسک بدون آنتی‌بیوتیک (دیسک سیپروفلوکساسین برای سویه‌های *E. coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و دیسک آمپی‌سیلین برای سویه *Staphylococcus aureus*) بوده‌است. دیاگرام واکاوی داده‌های آزمون میکروبی را نشان می‌دهد. تفاوت حروف روی ستون‌ها (a,b,c)، نشان دهنده تفاوت معنادار در قطر ممانعت از رشد نانوذرات نقره است.

بحث

نانوتکنولوژی، به یکی از مهم‌ترین فناوری‌ها در تمام زمینه‌های علوم تبدیل شده است. نانوذرات، به‌عنوان عامل ضد میکروبی جدید و به‌دلیل نسبت سطح به حجم و ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی منحصر به فرد خود بسیار مورد توجه هستند (۲۴). تاکنون، انواع نانوذرات نظیر مس، روی، تیتانیوم، منیزیم، طلا، آلزینات و نقره مورد بررسی قرار گرفته‌اند. فعالیت‌های ضدباکتریایی نانوذرات به‌طور عموم به عوامل مختلفی مانند شکل، غلظت و اندازه ذرات و انحلال آن در محیط‌های رشد بستگی دارند (۲۵).

خواص اپتیک، خواص الکترونی، خواص ضد میکروبی و خواص مغناطیسی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۲۷).

مکانیزم‌های ضد باکتریایی نانوذرات اکسید فلزی یا فلزی به‌دلیل نفوذ ذره در داخل سلول باکتری و انتشار یون‌های فلزی و آسیب DNA است (۲۶). نانوذرات فلزی با توجه به ویژگی‌های خاص خود مانند فعالیت‌های کاتالیزوری،

سیانوباکتری‌ها، به‌خصوص سویه جنس *Nostoc*، توانایی بالقوه‌ای در تولید نانوذرات نقره با خواص و کارایی منحصر به‌فردی نشان می‌دهد. این سیانوباکتری به‌علت داشتن رنگدانه‌های فتوسنتزی فیکوسیانین، فیکواریترین و آنزیم‌های اکسیدوردوکتازی قوی، می‌تواند به‌عنوان یک میکروارگانیسم مناسب جهت تولید نانوذرات استفاده شود.

سیانوباکترها، هنگامی که در محیط‌های سمی قرار بگیرند و زیکول‌های غشایی را از خود آزاد می‌کنند که می‌تواند به‌عنوان یک لایه محافظ در نظر گرفته شود. ترکیب‌های این زیکول‌ها شامل پروتئین‌های غشایی، پری پلاسمیک، لیپوساکاریدها و غیره هستند. علاوه بر این، این سیانوباکتری توانایی رشد در شرایط سخت را داشته و

ابتدا در غلظت‌های ۱ و ۲ و ۳ میلی‌مولار سنتز نانوذرات نقره انجام شد و نتیجه نشان داد که در غلظت‌های ۱ میلی‌مولار در زمان‌های ۰ و ۱۲ و ۲۴ و ۴۸، تغییر رنگ قهوه‌ای پرنگ مشاهده شد و بیشترین تولید نانوذره نقره در زمان صفر بوده است. این نشان دهنده سنتز نانوذرات نقره توسط سیانوباکتری‌های جنس *Nostoc spp.* آب شیرین بوده است. به‌علاوه، تغییر رنگ نشان از پایداری نانوذرات نقره در زمان‌های نام برده شده است. نتایج ارزیابی تولید نانوذرات نقره توسط توده زیست سیانوباکتری به‌کار گرفته در تیمارهای مورد نظر نشان دهنده این بود که در غلظت‌های ۱ و ۲ و ۳ میلی‌مولار نیترا نقره، فقط در غلظت ۱ میلی‌مولار در مدت زمان ۰ و ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ ساعت در حضور بیومس تر، نانوذرات نقره ایجاد شد، که مشاهده رنگ قهوه‌ای در مدت ذکر شده تأیید کننده وجود نانوذرات نقره بوده که از پایداری بالائی برخوردار شد. ولی در غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌مولار در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ عدم تغییر رنگ ایجاد شد که در مدت نگهداری ایجاد رنگ سیاه در محلول شده و اکسید نقره که نشان از عدم پایداری نانوذرات نقره داشت، برای ادامه کار در نظر گرفته نشد. در زمان صفر، تغییر رنگ قهوه‌ای تیره بوده است که نشان دهنده پایداری نانوذرات نقره است. نتایج جذب نانوذرات پایدار تولیدی، نشان دهنده حداکثر جذب در طول موج ۴۲۰ بود که تأیید کننده نانوذرات نقره است. همانند مطالعه پیش رو در استفاده از روش بیومس تر، Patel و همکاران در سال ۲۰۱۵، مطالعه‌ای مشابه انجام دادند، با این تفاوت که آن‌ها نه تنها از روش بیومس تر، بلکه از روش تولید نانوذره به کمک مایع کشت بدون سلول نیز بهره بردند.

این دانشمندان نشان دادند که نانوذرات نه تنها در حضور زیست توده، بلکه در مایع کشت بدون سلول نیز تولید می‌شوند. این نشان می‌دهد که ترکیب فعال در تشکیل نانوذرات نقره، یک ترکیب خارج سلولی است که پیش‌تر در طی کشت ارگانیسیم یا پس از افزودن $AgNO_3$ آزاد شده است. نانوذرات تولیدی توسط Patel و همکاران، اندازه‌ای در حدود ۱۳ تا ۳۱ نانومتر را داشته است (۱۸). استفاده از سیانوباکتری‌ها به عنوان میکروارگانیسیم برتر در تولید نانوذرات نقره، توسط Hamida و همکاران در سال ۲۰۲۰ نیز مورد بررسی قرار گرفته است. آن‌ها تولید نانوذرات نقره را توسط سویه *Desertifilum sp.* مورد مطالعه قرار دادند. همانند مطالعه ما، نانوذرات تولیدی کروی بودند ولی اندازه نانوذرات در حدود ۴/۵ تا ۲۶ نانومتر بوده است. به‌علاوه این دانشمندان نشان دادند که

می‌تواند غلظت‌های بالایی از فلزات را تحمل کنند که یک ویژگی مهم در تولید نانوذرات به شمار می‌روند. وجود ساختارهای متمایز مانند هتروسیست و تولید ترکیب‌های موسیلاژی از دیگر ویژگی‌های بارز این میکروارگانیسیم است که می‌تواند به‌عنوان یک عامل کمک کننده در مقاومت در برابر شرایط سخت به‌شمار رود. در این مطالعه یک روش زیست سازگار با توانایی تولید نانوذرات با پتانسیل بالا برای استفاده در صنایع گوناگونی هم‌چون پزشکی، با خواص ضد میکروبی مناسب پیشنهاد شده است. در تولید نانوذرات، روش‌های متفاوتی در پژوهش‌ها بیان شده است. در این پژوهش، روش بیومس و جوشاندن در تولید نانوذرات نقره به کار گرفته شد. اما در پژوهشی که توسط Lengke و همکارانش انجام شد، تولید نانوذرات طلا به کمک سیانوباکتری رشته‌ای *plectonema boryanum* تولید نانوذرات طلا توسط واکنش تیوسولفات طلا و کمپلکس‌های کلرید طلا در سیستم‌های آبیوتیک و دمای حدود ۲۵ تا ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. نتیجه، تولید نانوذراتی با اندازه ۲۵ نانومتر بوده است (۲۸). در مقایسه با مطالعه‌های Lengke و همکاران، قطر هیدرودینامیکی نانوذرات نقره سنتز شده توسط سیانوباکتری با استفاده از دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) اندازه‌گیری شده نشان داد که اندازه نانوذرات حاصل از بیوسنتز، بین ۰/۹ تا ۵۰ نانومتر و اندازه میانگین ۷/۷ نانومتر بوده است. این مقدار در مقایسه با میکروسکوپ الکترونی ذرات با قطر کم‌تری را نشان داد که می‌تواند حاصل از پراکندگی ذرات و عدم تجمع و تراکم آن‌ها باشد. تولید نانوذرات نقره، توسط Husain و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ انجام شده است. این دانشمندان نانوذرات نقره را به کمک ۳۰ نوع از سیانوباکتری‌ها تولید کردند. نتایج نشان داد که اکثر نانوذرات تولیدی، همانند پژوهش ما، کروی بوده است. با این تفاوت که رنج اندازه نانوذرات توسط آن‌ها حدود ۳۸ تا ۸۸ نانومتر است (۲۲).

همان‌طور که گفته شد، تولید نانوذرات نقره به دو روش بیومس و جوشاندن انجام گرفت. نتایج نشان دادند که تولید نانوذرات نقره از سویه نوستوک با روش بیومس تر و جوشاندن، در غلظت‌های متفاوت نیترا نقره در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از بررسی‌های محدوده UV-Visible، تأیید شده است. تغییر رنگ محلول‌های مورد آزمایش از بی‌رنگ به زرد رو به قهوه‌ای اولین نشانه از سنتز نانوذرات بوده است. این تغییر رنگ بر پایه پدیده رزونانس پلاسمون سطحی رخ داده است.

حضور آمیدها و گروه‌های هیدروکسیل در پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها، عوامل مهمی در بیوسنتز نانوذره نقره است (۳۰).

نانوذرات فلزی مختلف، از جمله طلا، پلاتین، نقره، پالادیم و نانوذرات نقره، به دلیل افزایش طیف گسترده ضد باکتری خود، به عنوان شایع‌ترین عامل ضد باکتری با مدت اثر ضد عفونی کننده طولانی مدت شناخته شده‌اند که کاربردهای وسیعی در طب سنتی و مواد غذایی را دارا هستند (۳۲، ۳۳). در این پژوهش، بررسی اثر ضد میکروبی نانوذرات نقره تولید شده توسط سیانوباکتری نوستوک، مورد بررسی قرار گرفت. قدرت مهارکنندگی قابل توجه نانوذرات نقره تولیدی با اندازه میانگین ۷/۷ نانومتر و با کمک تست آنتی‌بیوگرام در مقابل باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* و *E. coli* نشان دادند که تفاوت معناداری در قطر ممانعت از رشد در بین باکتری‌های گفته شده وجود داشته است. نتایج مطالعه‌های ما با پژوهش‌های دیگر دانشمندان نیز هم‌راستا بود. برای مثال، در مطالعه‌ای که توسط Patel و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام گرفت، خاصیت ضد میکروبی ۳۰ نوع از سیانوباکتری‌ها، هاله عدم رشد را در مقابل استریپتومایسین، پنی‌سیلین و نئوماسین نشان دادند. اما تنها با این‌که سیانوباکتری *limnothrix* sp. تولید کننده نانو ذره نقره است، اما خاصیت ضد میکروبی ندارد (۱۸). هم‌چنین، خاصیت ضد میکروبی سیانوباکتری تولید کننده نانوذرات نقره نیز توسط Hamida و همکاران در سال ۲۰۲۰ بیان شده است. آن‌ها نشان دادند که نانوذره نقره تولید شده، اثرات ضد باکتریایی قوی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اعمال کردند. علاوه بر این، سمیت سلولی قابل توجهی را علیه HepG2، MCF-7 و Caco2 نیز نشان دادند (۳۰). همانند اثر ضد میکروبی سویه نوستوک در این پژوهش، Suganya و همکاران در سال ۲۰۱۵، اثر ضد میکروبی و مهارتی نانوذرات نقره را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دادند که رابطه‌ای میان نانوذرات نقره تولید شده و ژن‌های مربوط به یک سیستم ترشح باکتریایی وجود دارد. به این صورت که نانوذرات تولید شده، منجر به کاهش بیان ژن‌های *VgrG-3* و *VgrG-1*، *hcp-1* و *hns* می‌شوند که مسئول القای سیستم ترشحی هستند. برهم‌کنش نانوذرات طلا با میکروارگانیسم‌های گرم مثبت (*B. subtilis* و *S. aureus*) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری نیز نشان داد که نانوذرات نقره به دیواره سلولی باکتری آسیب رسانده و در نتیجه حفره‌هایی در

قسمت بیرونی سلول ایجاد می‌شود و غشای سلولی تغییر شکل می‌دهد و در نتیجه عملکرد باکتری‌ها مانند تنفس و نفوذپذیری را مختل می‌کند (۳۵).

طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز (FTIR)، ابزار مهمی برای شناسایی گروه‌های عاملی و برهم‌کنش‌های بین مولکول‌ها است. در این پژوهش نشان داده شده است که طیف IR یک پیام برای ارتعاش کششی پیوند (C_{sp}³-H) آلکان در ناحیه ۲۹۲۳ cm⁻¹ و یک پیام دیگر برای (C_{sp}²-H) آلکن در ناحیه بین ۳۰۰۰-۳۱۰۰ را نشان می‌دهد. به علاوه، طیف‌سنجی پراکندگی انرژی (EDS) وجود ذرات نقره را به میزان بیشتری با ردیابی عناصر مختلفی مانند منیزیم، سدیم، پتاسیم، کلسیم و کلرید نشان داد. در مطالعه‌های دیگری که توسط Hamida و همکاران در سال ۲۰۲۰ انجام شد، تولید نانوذرات نقره به کمک *1220 Desertifilum* B-*IPPAS* مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به طیف غالب FTIR، این دانشمندان گزارش کردند که بیومولکول‌های اصلی مسئول فرآیندهای کاهش زیستی و تثبیت، پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها هستند (۲۹). طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز سنتز نانوذره نقره به کمک جنس‌های *Spirulina platensis* و *Nostoc sp.* توسط Ahmad و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز تأیید شده است.

بر اساس مطالعه‌های انجام شده در این مقاله، سویه سیانوباکتری نوستوک می‌تواند به عنوان سویه‌ای ارزشمند و الگوی زیستی مناسب در تولید نانوذرات نقره در نظر گرفته شود. نتایج به صورت کلی نشان دادند که استفاده از سیانوباکتری نوستوک یک روش سازگار با محیط زیست بوده که می‌تواند به عنوان روشی مؤثر در تولید نانوذرات پیشنهاد شود. نانوذرات تولیدی از سویه نوستوک به علت ویژگی‌ها مطلوب می‌تواند کاربرد ویژه‌ای در صنایع درمانی و دارویی تلقی گردند.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، عصاره سیانوباکتری انکوبه شده با نیترات نقره در غلظت ۱ میلی‌مولار (در زمان صفر) نسبت به روش جوشاندن، میزان جذب بیشتری داشته است. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی SEM، نشان داد که با افزودن AgNO₃ به سلول‌های سیانوباکتری، رسوب نانوذرات نقره کروی (۲۴ تا ۳۷ نانومتر) در سطوح سلولی تشکیل شده است. هم‌چنین در

نتایج حاصل از آزمون EDS، وجود سیگنال عنصری نقره نیز تأیید شد. نتایج حاصل از دستگاه پراکندگی نور پویا (DLS) مشخص کرد که اندازه نانوذرات حاصل از بیوسنتز توسط باکتری بین ۰/۹ تا ۵۰ نانومتر و اندازه میانگین ۷/۷ نانومتر بوده است. این مقدار در مقایسه با میکروسکوپ الکترونی ذرات با قطر کمتری را نشان داد که می‌تواند حاصل از پراکندگی ذرات و عدم تجمع و تراکم آن‌ها باشد. در نهایت، با بررسی تست آنتی‌بیوگرام، قدرت مهار کنندگی نانوذرات نقره تولیدی به کمک سویه نوستوک، تفاوت معناداری در قطر ممانعت از رشد در بین سه باکتری *Staphylococcus aureus*، *E.coli* و *Pseudomonas aeruginosa* وجود داشته است.



1. Alavi M, Kowalski R, Capasso R, Douglas Melo Coutinho H, Rose Alencar De Menezes I. Variou novel strategies for functionalization of gold and silver nanoparticles to hinder drug-resistant bacteri and cancer cells. *Micro Nano Bio Aspects*. 2022;1(1):38-48.
2. Ghobashy RS, Elsheekh MM, Ismail GA, Gheda SF. Biosynthesis of metal nanoparticles usin blue-green algae (Cyanobacteria) and their possible applications: Thesis Abstract. *Internationa Journal of Cancer and Biomedical Research*. 2021;5:6-.
3. Nowruzi B. A review of the industrial application of microalgae and cyanobacteria in the remove of heavy metals and the synthesis of nanoparticles. *Environmental Geology Quarterly* 2021;15(54):49-62.
4. Mukherjee A, Sarkar D, Sasmal S. A review of green synthesis of metal nanoparticles using algae *Frontiers in Microbiology*. 2021;12.
5. Mandhata CP, Sahoo CR, Padhy RN. Biomedical applications of biosynthesized gold nanoparticle from cyanobacteria: An overview. *Biological Trace Element Research*. 2022:1-21.
6. Mandhata CP, Sahoo CR, Mahanta CS, Padhy RN. Isolation, biosynthesis and antimicrobia activity of gold nanoparticles produced with extracts of *Anabaena spiroides*. *Bioprocess an Biosystems Engineering*. 2021;44(8):1617-26.
7. Marambio-Jones C, Hoek E. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials an potential implications for human health and the environment. *Journal of nanoparticle research* 2010;12(5):1531-51.
8. Jha AK, Prasad K. Green synthesis of silver nanoparticles using *Cycas* leaf. *International Journal o Green Nanotechnology: Physics and Chemistry*. 2010;1(2):P110-P7.
9. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh V, Shamsi S, Mehta B, et al. Rapid synthesis of silve nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids and Surfaces B: Biointerface* 2010;81(1):81-6.
10. Rajabpour N, Nowruzi B, Ghobeh M. Investigation of the toxicity, antioxidant and antimicrobia activities of some cyanobacterial strains isolated from different habitats. *Acta Biologica Slovenica* 2019;62(2):3-14.
11. Nowruzi B, Fahimi H, Lorenzi AS, editors. Recovery of pure C-phycoerythrin from a limeston drought tolerant cyanobacterium *Nostoc* sp. and evaluation of its biological activity. *Anales d Biología; 2020: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia*.
12. Nowruzi B, Haghghat S, Fahimi H, Mohammadi E. *Nostoc* cyanobacteria species: a new and ric source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research*. 2018;9(1):5-12.
13. Shahnazi M, Azadmehr A, Hajiaghaee R, Mosalla S, Latifi R. Effects of *Artemisia absinthium* I extract on the maturation and function of dendritic cells. *Jundishapur J Nat Pharm Proc* 2015;10:e20163.
14. Nowruzi B, Sarvari G, Blanco S. Applications of cyanobacteria in biomedicine. *Handbook o Algal Science, Technology and Medicine: Elsevier; 2020. p. 441-53.*
15. Andersen LB, Harro M, Sardinha LB, Froberg K, Ekelund U, Brage S, et al. Physical activity an clustered cardiovascular risk in children: a cross-sectional study (The European Youth Heart Study). *The Lancet*. 2006;368(9532):299-304.
16. Neilan BA, Jacobs D, Blackall LL, Hawkins PR, Cox PT, Goodman AE. rRNA sequences an evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1997;47(3):693-7.

17. Lepère C, Wilmotte A, Meyer B. Molecular diversity of *Microcystis* strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Systematics and Geography of Plants*. 2000;275-83.
18. Patel V, Berthold D, Puranik P, Gantar M. Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. *Biotechnology Reports*. 2015;5:112-9.
19. Ahmed E, Hafez A, Ismail F, Elsonbaty M, Abbas H, Eldin R. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Spirulina platensis* and *Nostoc* sp. *Glo Adv Res J Microbiol*. 2015;4(4):36-49.
20. Sharma G, Jasuja ND, Kumar M, Ali MI. Biological synthesis of silver nanoparticles by cell-free extract of *Spirulina platensis*. *Journal of nanotechnology*. 2015;2015.
21. Richert L, Golubic S, Guédès RL, Ratiskol J, Payri C, Guezennec J. Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from Polynesian microbial mats. *Current microbiology*. 2005;51(6):379-84.
22. Husain S, Sardar M, Fatma T. Screening of cyanobacterial extracts for synthesis of silver nanoparticles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015;31(8):1279-83.
23. Nowruzzi B, Blanco S, Nejadstari T. Chemical and molecular evidences for the poisoning of a duck by anatoxin-a, nodularin and cryptophycin at the coast of Lake Shoormast (Mazandaran province, Iran). *Int J Algae*. 2018;20(4).
24. Hanna AL, Hamouda HM, Goda HA, Sadik MW, Moghanm FS, Ghoneim AM, et al. Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Produced by *Phormidium ambiguum* and *Desertifilum tharense* Cyanobacteria. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2022;2022.
25. Husain S, Verma SK, Azam M, Sardar M, Haq Q, Fatma T. Antibacterial efficacy of facile cyanobacterial silver nanoparticles inferred by antioxidant mechanism. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;122:111888.
26. Bakir EM, El Semary NA. Spectrofluorometric method for detection glycogen using chemically gold nanoparticles: cyanobacteria as biological model. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2022:121584.
27. Karageorgou D, Zygouri P, Tsakiridis T, Hammami MA, Chalmpes N, Subrati M, et al. Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles with High Antibacterial Activity Using Cell Extracts of *Cyanobacterium Pseudanabaena/Limnothrix* sp. *Nanomaterials*. 2022;12(13):2296.
28. Lengke MF, Fleet ME, Southam G. Morphology of gold nanoparticles synthesized by filamentous cyanobacteria from gold(I)-thiosulfate and gold(III)-chloride complexes. *Langmuir*. 2006;22(6):2780-7.
29. Singh P, Kim YJ, Wang C, Mathiyalagan R, Yang DC. *Weissella oryzae* DC6-facilitated green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial potential. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2016;44(6):1569-75.
30. Hamida RS, Abdelmeguid NE, Ali MA, Bin-Meferij MM, Khalil MI. Synthesis of silver nanoparticles using a novel cyanobacteria *Desertifilum* sp. extract: their antibacterial and cytotoxicity effects. *International journal of nanomedicine*. 2020;15:49.
31. Rejeeth C, Nataraj B, Vivek R, Sakthivel M. Biosynthesis of silver nanoscale particles using *Spirulina platensis* induce growth-inhibitory effect on human breast cancer cell line MCF-7. *Med Aromat Plants*. 2014;3(03):2167-0412.1000163.
32. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2007;18(22):225103.

33. Li X, Xie J, Liao L, Jiang X, Fu H. UV-curable polyurethane acrylate–Ag/TiO₂ nanocomposites with superior UV light antibacterial activity. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2017;66(16):835-43.
34. Wang C, Kim YJ, Singh P, Mathiyalagan R, Jin Y, Yang DC. Green synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus methylotrophicus*, and their antimicrobial activity. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2016;44(4):1127-32.
35. Suganya KU, Govindaraju K, Kumar VG, Dhas TS, Karthick V, Singaravelu G, et al. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. *Materials Science and Engineering: C*. 2015;47:351-6.