



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Biological Journal of Microorganism

12th Year, Vol. 12, No. 46, Summer 2023 pp. 51-68

Received: 14.05.2022

Accepted: 25.06.2022

(Research Paper)

A Study of Antimicrobial Activity of Biosynthesized Nanoparticles via Two Different Methods by Freshwater Cyanobacteria *Nostoc* sp.

Zahra Gholizadeh

Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran,
zgholizade1910@gmail.com

Bahareh Nowruzi*

Department of Biocenology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran,
bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir

Sarvenaz Falsafi

Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran,
sarvenaz_falsafi@yahoo.com

Abstract

Introduction: Today, the production of green silver nanoparticles by cyanobacteria as antimicrobial agents is widely used in medical and therapeutic industries. In this study, considering that so far no study has been conducted to investigate the potency of cyanobacteria *Nostoc* sp. as aquatic water belonging to the freshwater of Golestan province, we decided to evaluate the potential of this strain in the biosynthesis of silver nanoparticles by performing different techniques.

Materials and Methods: After the growth and molecular identification of cyanobacteria *Nostoc* sp. in the BG-110 culture medium in the growth chamber, two wet biomass and boiling methods were used to produce silver nanoparticles. Then, by inoculating wet biomass at concentrations of 1, 2, and 3 mM silver nitrate and comparing color change, UV-Vis spectroscopy peaks, and measuring stability at 0, 12, 24, and 48 hours, the most efficient method of silver nanoparticle

*Corresponding Author Bahareh Nowruzi

2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2022.133646.1470](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.133646.1470)



biosynthesis was selected. In addition, instrumental analysis of Raman and Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy, Dynamic Light Scattering (DLS), Scanning Electron Microscopy (SEM), and antimicrobial disk antimicrobial properties for the best and most stable nanoparticle production method was done.

Results: Among the two methods used in the production of silver nanoparticles, by examining the dark brown color and the strong 420 nm peak obtained from UV-Vis spectroscopy, the wet biomass method at a concentration of 1 mM at zero time had the highest adsorption compared to the boiling method. The results of FTIR showed successful production of silver nanoparticles using wet biomass of cyanobacterium *Nostoc* sp. at a concentration of 1 mM silver nitrate at time zero as a safe and biodegradable method, environmentally friendly, low cost, and in accordance with the principles of green chemistry. In addition, the results of FTIR showed that biosynthesized silver nanoparticles had a protein coating that plays a major role in the reduction and stability of silver nanoparticles. The DLS results showed that the nanoparticles produced were between 28 and 50 nanometers in size and the average size of silver nanoparticles was 16.1 nanometers. The results of SEM microscopy showed that the size of the produced nanoparticles was between 28 and 50 nm in terms of spherical morphology. Also, the results of the one-way analysis of variance and Tukey test showed significant inhibitory power of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

Discussion and Conclusion: Cyanobacteria *Nostoc* sp. can be used as a potential factor in the production of silver nanoparticles with unique properties and performance for various applications in medicine, industry, etc.

Key words: *Cyanobacteria Nostoc* sp., Bioactive Compounds, Green Biosynthesis of Silver Nanoparticles, FTIR, SEM, DLS



<https://bjm.ui.ac.ir>

زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها

سال دوازدهم، شماره ۴۶، تابستان ۱۴۰۲، صفحه ۵۱ - ۶۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۴

مقاله پژوهشی

مطالعه فعالیت ضد میکروبی نانوذرات بیوسنتز شده با دو روش متفاوت توسط سیانوباکتری آب

شیرین *Nostoc* sp.

زهرا قلی‌زاده: کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری پیشرفته، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، zgholizade1910@gmail.com
بهاره نوروزی*: استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir
سروناز فلسفی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری پیشرفته، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، falsafi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: امروزه تولید سبز نانوذرات نقره توسط سیانوباکتری‌ها به عنوان عوامل ضد میکروبی، کاربرد عمده‌ای در صنایع پزشکی و درمانی دارد. در این مطالعه با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی در زمینه بررسی توانمندی سیانوباکتری *Nostoc* sp. آبری متعلق به آب شیرین استان گلستان انجام نشده بود، سعی شد توانمندی این سویه در بیوسنتز نانوذرات نقره با انجام تکنیک‌های مختلف سنجیده شود.

مواد و روش‌ها: پس از رشد و شناسایی مولکولی سیانوباکتری *Nostoc* sp. در محیط کشت BG-11^{۱۰} در اتاقک رشد، از دو روش بیومس تر و جوشاندن برای تولید نانوذرات نقره استفاده شد. سپس با تلقیح بیومس تر در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار نیترات نقره و مقایسه تغییر رنگ، پیک‌های طیف سنجی UV-Vis و سنجش پایداری در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، کارآمدترین روش بیوسنتز نانوذره نقره انتخاب شد. علاوه بر آن، آنالیزهای دستگاهی طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز (FTIR)، پراکندگی نور دینامیکی (DLS)، میکروسکوپ الکترونی

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © The Authors.

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2022.133646.1470](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.133646.1470)

رویشی (SEM) به همراه سنجش خواص ضد میکروبی با روش دیسک آنتی بیوگرام برای بهترین و پایدارترین روش تولید نانوذرات نقره انجام شدند.

نتایج: از بین دو روش به کار گرفته شده در تولید نانوذرات نقره، با بررسی رنگ قهوه‌ای تیره و پیک قوی ۴۲۰ نانومتر حاصل از طیف سنجی UV-Vis، روش بیومس تر در غلظت ۱ میلی مولار در زمان صفر نسبت به روش جوشاندن، بیشترین میزان جذب را داشت. نتایج حاصل از FTIR، تولید موفق نانوذرات نقره را با استفاده از بیومس تر سیانوباکتری *Nostoc sp.* در غلظت ۱ میلی مولار نیترا نقره در زمان صفر به صورت یک روش ایمن و زیستی سریع، سازگار با محیط زیست، کم هزینه و منطبق با اصول شیمی سبز نشان دادند. همچنین، نتایج حاصل از FTIR نشان دادند نانوذرات نقره بیوسنتز شده، پوشش پروتئینی داشتند که در احیای نانوذرات نقره و پایداری آنها نقش عمده‌ای دارند. نتایج حاصل از DLS، اندازه نانوذرات تولیدی را ۲۸ تا ۵۰ نانومتر و میانگین اندازه نانوذرات نقره را ۱۶/۱ نانومتر مشخص کردند. نتایج حاصل از میکروسکوپ SEM، اندازه نانوذرات تولیدی را ۲۸ تا ۵۰ نانومتر و از لحاظ مورفولوژی کروی تشخیص دادند. همچنین نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، قدرت ممانعت کنندگی چشمگیر نانوذرات نقره را در مقابل باکتری‌های *E. coli*، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: استفاده از سیانوباکتری *Nostoc sp.* می‌تواند به عنوان یک سویه بالقوه در تولید نانوذرات نقره با خواص و کارایی منحصر به فرد برای کاربردهای مختلف در پزشکی، صنایع و غیره به کار آید.

واژه‌های کلیدی: سیانوباکتری *Nostoc sp.*، ترکیبات زیست فعال، بیوسنتز سبز نانوذرات نقره، FTIR، SEM، DLS

مقدمه

امروزه نقش سیانوباکتری‌ها در سنتز نانوذرات فلزی مانند کادمیوم، طلا و نقره بسیار حائز اهمیت است (۱-۳). عصاره سیانوباکتری‌ها منبعی از ترکیب‌های با ارزش مانند کاروتنوئیدها، اسیدهای چرب، پلی ساکاریدها، لیپوپپتیدها و سایر ترکیب‌های زیست فعال هستند که به سنتز ترکیب‌هایی با ارزش در محیط کشت منجر می‌شوند (۴)؛ برای مثال، گونه‌های جنس *Nostoc* از سیانوباکتری‌های مهم در بیوتکنولوژی‌اند؛ زیرا این گونه‌ها سم تولید نمی‌کنند و در محیط کشت ارزان و ساده رشد می‌کنند. همچنین دیگر گونه‌های سیانوباکتری رشته‌ای نظیر *Anabaena*، *Calothrix* و *Leptolyngbya* توانایی تشکیل نانوذرات با اندازه کنترل شده را دارند (۵).

سیانوباکتری‌ها با توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفر (N_2) و کاهش گاز نیتروژن به آمونیاک با استفاده از آنزیم‌های نیتروژن ردوکتاز منجر به تبدیل زیستی فلزات به نانوذرات می‌شوند و به این گونه فلزات سنگین را از محیط حذف می‌کنند (۶). علاوه بر این، سیانوباکتری‌ها حاوی مولکول‌های زیستی مختلفی از جمله متابولیت‌های ثانویه، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و رنگدانه‌ها هستند که خواص زیستی مهمی مانند فعالیت ضد میکروبی و ضد سرطانی را به همراه دارند.

به طور کلی روش‌های بیوسنتز نانوذرات می‌توانند به سنتز داخل سلولی و خارج سلولی تقسیم شوند. تشکیل درون سلولی نانوذرات، به مواردی گفته می‌شود که کاهش مواد حجیم به نانوذرات در داخل سلول‌های

میکروارگانسیم‌های مختلف انجام شده‌اند؛ اما مطالعات کمی روی سنتز نانوذرات با استفاده از سیانوباکتری‌ها انجام شده‌اند (۱۱-۱۳).

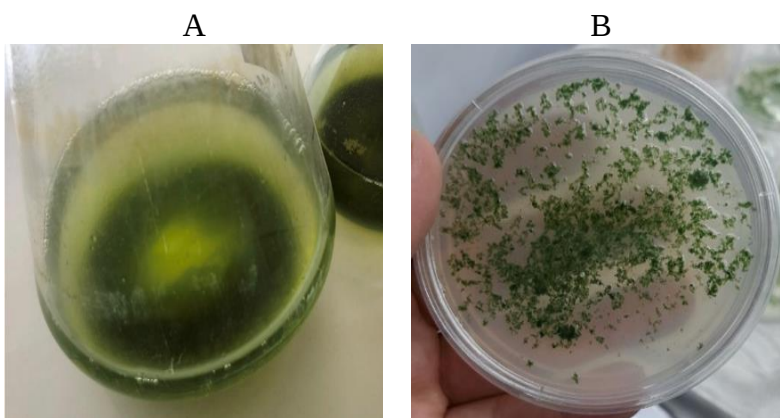
در مطالعه حاضر، سنتز نانوذرات نقره با فعالیت بالقوه ضد میکروبی توسط سیانوباکتریوم بومی نوستوک آب شیرین انجام شده است. این پژوهش، جزء نخستین کارهای انجام شده در ایران است. در این بررسی علاوه بر سنتز نانوذرات نقره و تأیید آنها به کمک تکنیک‌های آزمایشگاهی، از روش‌های مولکولی به منظور شناسایی سویه بررسی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

مواد و روش‌ها

الف- کشت سیانوباکتری *Nostoc sp.*: کشت نمونه‌های خالص شده در محیط کشت BG-11₀ در اتاقک رشد با دمای 28 ± 2 درجه سانتی گراد و روشنایی ممتد فلورسنت با شدت ۳۰۰ میکروانشتین در متر مربع در ثانیه برای ۱۴ روز انجام و در نهایت عکس میکروسکوپی تهیه شد (شکل ۱) (۱۴).

میزبان تحت کنترل عوامل زیستی مختلف انجام می‌شود (۷-۹). سنتز خارج سلولی نانوذرات، در خارج از سلول اتفاق می‌افتد و مولکول‌های زیستی تراوش شده مانند رنگدانه‌ها، یون‌ها، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، هورمون‌ها و آنتی اکسیدان‌ها نقش مهمی در فرایند کاهش نانوذرات را به عهده دارند (۱۰).

نانوذرات نقره، متداول‌ترین نانوذرات مغناطیسی استفاده شده در زمینه‌های مختلف‌اند و می‌توانند در بسیاری از محصولات صنعتی و پزشکی از جمله پانسمان‌ها، ابزارهای جراحی و ماسک‌ها، مواد شوینده و محصولات مراقبتی یافت شوند. با توجه به معایبی مانند هزینه بالا و تولید محصولات جانبی سمی، روش‌های سنتز سبز برای تولید نانوذرات توسعه یافته‌اند؛ به همین دلیل است که تحقیقات سنتز سازگار با محیط زیست برای کشف ارگانسیم‌های جدید با ظرفیت هیدرولیتیک برای سنتز نانوذرات به سرعت گسترش یافته‌اند. در میان موجودات مختلف، سیانوباکتری‌ها، مسیر ساده‌ای را برای تولید نانوذرات نقره مدنظر فراهم می‌کنند. مطالعات فراوانی در زمینه تولید زیستی نانوذرات به کمک



شکل ۱- نمونه سیانوباکتری *Nostoc sp.* تلقیح شده در محیط کشت (A مایع و B) جامد BG-11₀ در اتاقک رشد با دمای 28 ± 2 درجه سانتی گراد و روشنایی ممتد فلورسنت

ب- شناسایی مولکولی سویه‌های سیانوباکتریایی

براساس توالی 16S rRNA

استخراج DNA: استخراج DNA به روش دستی CTAB انجام و برای تعیین کیفیت DNA از روش کیفی به کمک لود کردن روی ژل الکتروفورز و روش کمی به کمک دستگاه نانودراپ (Thermo spectrophotometer Scientific) استفاده شد.

تکثیر توالی ژن 16S rRNA: به منظور تکثیر توالی ژن 16S rRNA، از پرایمرهای 5'- 27FI: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (۱۵) و 3'- 23S30Ra:

CTTCGCCTCTGTGTGCCTAGGT (۱۶)

استفاده شد. برنامه PCR برای تکثیر ژن 16S rRNA، در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد؛ در نهایت، محصول PCR روی ژل آگارز، لود و ساینر باند به دست آمده با مارکر مقایسه شد.

پ- آنالیزهای بیوانفورماتیک و رسم درخت

فیلوژنتیک: توالی‌های به دست آمده با کمک نرم افزار BioEdit، هم‌ردیف‌سازی شدند. توالی اجماع به دست آمده در سایت NCBI، Blast N، شد و با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک ژن، مقایسه و درصد تشابه آنها با سایر ژن‌های ثبت شده بررسی شد. صد سویه‌ای که بیشترین شباهت را با ژن مدنظر داشتند، به کمک سایت MAFFT VERGEN7 هم‌ردیف‌سازی شدند و در نهایت پس از انتخاب بهترین مدل، رسم درخت فیلوژنتیک به کمک برنامه آنالیز Iq tree web server انجام شد. علاوه بر آن، از سویه *Gloeobacter*

violaceus VP3-01 (FR798924) به عنوان ریشه

استفاده شد.

ت- بیوستنز نانوذرات نقره

روش استفاده از بیومس تر: در این روش، کشت‌های ۱۵ روزه سیانوباکتری‌ها که در اواسط فاز لگاریتمی به سر می‌برند، به منظور استخراج DNA استفاده شدند. گفتنی است سویه‌های سیانوباکتری با توجه به سویه و محیط کشت، روزهای مختلفی را در فازهای مختلف رشد می‌گذرانند؛ در سویه مطالعه شده با توجه به اینکه مدام کشت‌ها با اضافه کردن محیط جدید در فاز لگاریتمی نگه داشته می‌شدند، ۵ تا ۷ روز را در فاز تأخیری می‌گذرانند، بلافاصله با تکثیر سریع وارد سویه لگاریتمی می‌شود و اگر با محیط کشت جدید تلقیح نشود بعد از ۱۵ روز وارد فاز ایستایی می‌شود.

به منظور استخراج DNA، کشت‌های ۱۵ روزه با سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه در ۲۰ درجه سانتی گراد جدا شدند و سوپرناتانت دور ریخته شد و بیومس، سه مرتبه با آب مقطر (دیونیزه) شسته و هر بار سانتریفیوژ شد. سه گرم بیومس تر در فلاسک‌های ۵۰۰ میلی لیتر با ۱۰۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره به طور جداگانه با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی مولار در pH=۷ تلقیح و در ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۱۴، ۱۷).

روش جوشاندن: در روش جوشاندن، کشت‌های

سیانوباکتری، در ۲۵۰۰ rpm در ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا بیومس جلبکی حاصل شود. بعد از سانتریفیوژ، بیومس حاصل بعد از ۳ بار شستشو در آون ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شد. یک گرم وزن خشک در ۱۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر، برای ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی گراد

(۱۴). از آنالیز FT-IR برای تعیین ساختار نانوذرات نقره و همچنین بررسی گروه های عملکردی استفاده شد. برای این منظور، از روش تهیه قرص پتاسیم برماید (KBr) با مخلوط نانوذرات استفاده شد (۱۹). برای بررسی پراکندگی نور دینامیک، نمونه با جذب ویژه نانوذرات نقره بدون ته نشینی و دارای پایداری کلئیدی، برگزیده و سنجش پراکندگی نور دینامیک انجام شد (۲۰).

ج- فعالیت آنتی باکتریال نانوذرات نقره (ارزیابی

سنجش حساسیت ضد میکروبی (AST))^۱: ارزیابی ویژگی های ضد میکروبی با روش انتشار دیسک براساس روش نوروزی و همکاران انجام گرفت (۲۱). این روش بر دیدن هاله بدون رشد در پیرامون دیسک های دارای خاصیت ضد میکروبی استوار است. در این پژوهش سویه های باکتریایی *E. coli* ATCC 25922 و *S. aureus* ATCC 25923 و *P. aeruginosa* ATCC 27853 سنجش شدند. سویه های خالص میکروبی به گونه لیوفیلز شده، بسترهای کشت آماده مولر هیتون آگار، TSB و همچنین محلول استاندارد نیم مک فارلند از شرکت زیست رویش خریداری شدند. دیسک های آنتی بیوتیک و دیسک های خام نیز از شرکت پادتن طب فراهم شدند. سویه های لیوفیلز بر پایه آیین نامه شرکت زیست رویش برای بازیابی شدن در بسترهای کشت مایع TSB نهاده شدند و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی گراد جای گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت با استفاده از لوپ، از بسترهای کشت مایع TSB به روی بسترهای کشت های بلاد آگار کشت شدند و برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه سانتی گراد جای گرفتند. تعداد اندکی از کلنی های ناب از پلیت های آگار خوندار، برداشت و در لوله های تمیز و سترون سرم

در ارلن (بن ماری جوش) جوشانده شد. بعد از جوشیدن، مخلوط حاصل، سرد و در ۱۰۰۰۰ rpm برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت، جمع آوری و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. عصاره های فاقد سلول (سوپرناتانت) سویه های سیانوباکتری برای سنتز نانوذرات نقره استفاده شدند. سپس ۲ میلی لیتر از عصاره، درون ۱۰ میلی لیتر محلول نیترات نقره ۱ میلی مولار درون ارلن های ۱۰۰ میلی لیتر ریخته شد. مخلوط واکنش در ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده و تکان دادن به طور مداوم انجام شد. محلول بی رنگ به تدریج به زرد مایل به قهوه ای و سپس بعد از چرخش مداوم بعد از ۴۵ دقیقه به آرامی به قهوه ای تیره تبدیل شد. نانوذرات نقره سنتز شده، به کمک سانتریفیوژ در ۱۵۰۰۰ rpm و ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد جمع آوری شدند. بیومس به دست آمده با آب مقطر دو مرتبه شستشو داده و از اتانول ۹۰ درصد برای حذف ناخالصی ها استفاده شد. بعد از شستشو و سانتریفیوژ خشک شد تا در نهایت، پودر نانوذره نقره خالص به دست آمد. در واقع به دلیل استفاده از اتانل ۹۰ درصد، بعد از مدتی ماندن در جریان هوا، خشک خواهد شد؛ در نهایت، طیف سنجی در فواصل زمانی ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بین ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر با استفاده از طیف سنجی نوری انجام شد (۱۸).

ث- بررسی ویژگی های نانوذرات نقره تولید شده:

برای تأیید حضور نانوذرات نقره، از آنالیزهای SEM، FT-IR و DLS استفاده شد. ابتدا نانوذرات به دست آمده برای تصویربرداری با دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی، با دستگاه اولتراسونیک، پردازش و در نهایت با بهره گیری از نرم افزار Image J واکاوی شدند و میانگین اندازه نانوذرات موجود در شکل ها به دست آمد و جدول فراوانی نانوذرات نیز با نرم افزار Excel تهیه شدند

نتایج

الف- نتایج حاصل از شناسایی مولکولی سویه

مطالعه شده: درخت فیلوژنتیک، روابط فیلوژنتیک بین سویه مطالعه شده و سویه‌های مشابه را براساس توالی ژن *16S rRNA* نشان داده است. سویه مطالعه‌شده با رنگ قرمز مشخص شده است. نمونه *Gloeobacter violaceus* VP3-01 (FR798924) به‌عنوان ریشه انتخاب شده است. اعداد کنار هر گره انشعابی نشان‌دهنده فراوانی حاصل از آنالیز Bootstrap حاصل از ۱۰۰۰ تکرار است. با توجه به درخت فیلوژنتیک رسم‌شده، هر شاخه روابط بین آرایه‌ها از نظر نسل یا جد (نیاکان) را معین می‌کند. طول شاخه بیان‌کننده میزان تفاوت‌ها نسبت به نیای مشترک است (شکل ۲). درخت رسم‌شده با روش Iq tree web server نشان داد سویه *Nostoc* sp. با قرابت فیلوژنتیکی ۹۷/۵ درصد همراه با سایر سویه‌های *Nostoc* درون یک کلاذ قرار گرفته است (شکل ۲).

ب) نتایج ارزیابی سنتز نانوذرات نقره توسط بیومس

تقر: نتایج حاصل از طیف‌سنجی نشان دادند در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار نیترات نقره، در زمان صفر پیک در ناحیه ۴۲۰ نانومتر ایجاد شد که نشان‌دهنده سنتز نانوذرات نقره درست در همان زمان تلقیح با سلول‌های سیانوباکتریایی است؛ اما در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت تغییر رنگی مشاهده نشد (شکل ۳). عدم تغییر رنگ نشان‌دهنده عدم پایداری نانوذرات نقره در طول زمان است. علاوه بر آن، نتایج نشان دادند در ارلن‌های فاقد عصاره سیانوباکتری که به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شده بودند، هیچ تغییر رنگی مشاهده نشد.

پ) نتایج ارزیابی تولید نانوذرات نقره با روش

جوشاندن: در سنتز نانوذرات نقره از طریق روش

فیزیولوژیک پراکنده شدند. تیرگی این محلول‌های دارای باکتری‌های ناب با استاندارد نیم مک‌فارلند سنجش و با آن برابر شدند. پس از آماده‌شدن محلول‌های باکتریایی با غلظت نیم مک‌فارلند با سوآپ‌های استریل از محلول نیم مک‌فارلند، برداشت و به گونه کشت چمنی روی بسترهای مولر هیتون آگار کشت داده شدند.

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 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 سیروفلوکساسین ۵ میکروگرم برای آزمون با سویه‌های *E. coli* و *aeruginosa Pseudomonas* و دیسک آمپی‌سیلین ۱۰ میکروگرم برای آزمون با سویه *Staphylococcus aureus* به کار رفتند.

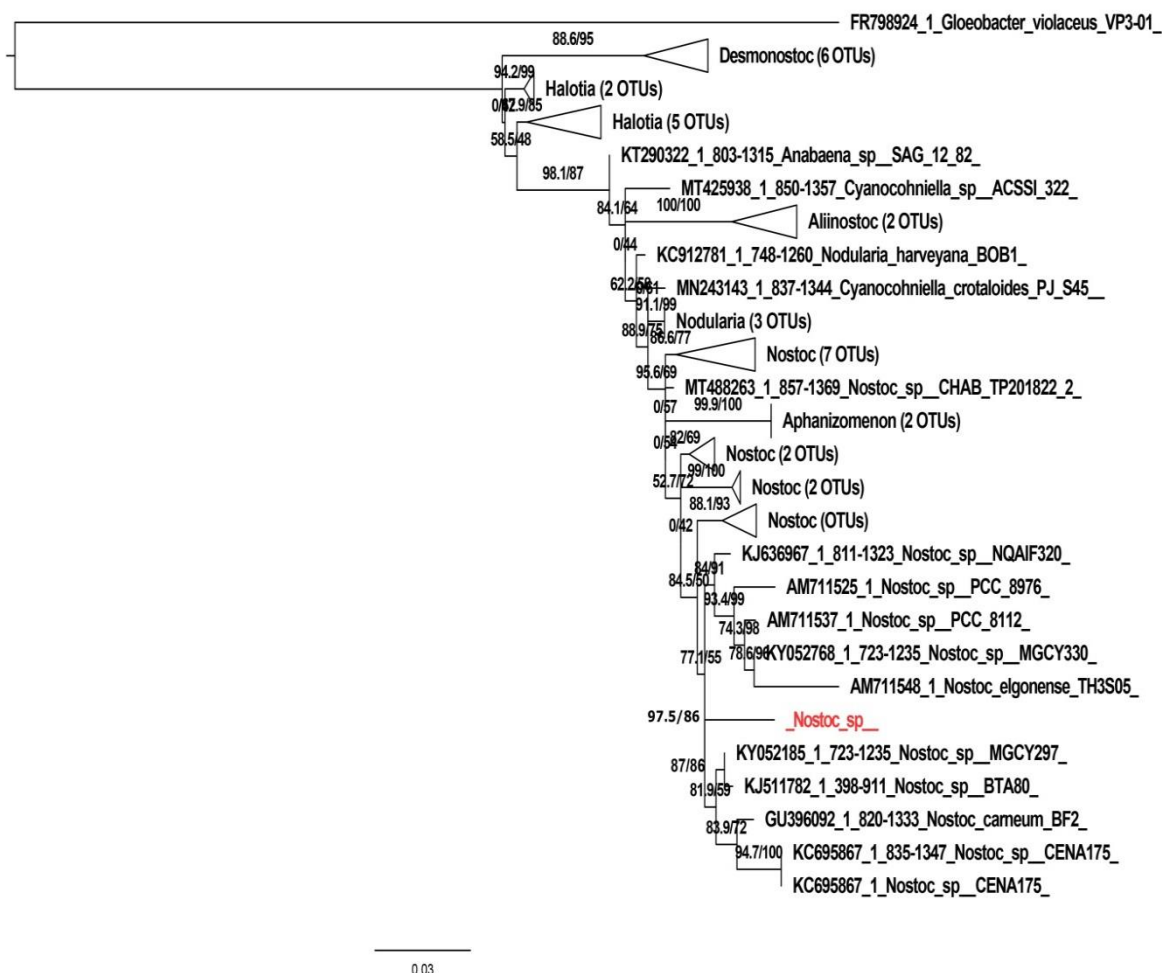
ح- روش‌های آماری: واکاوی داده‌های آماری

به‌دست آمده از هر آزمایش با نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۴) و Excel انجام شد. همه داده‌ها از سه بار تکرار آزمون به دست آمده‌اند. معنی‌دار بودن تفاوت‌ها بین موارد اندازه‌گیری شده با آنالیز واریانس یک‌طرفه با حدود اطمینان ۹۵ درصد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون ANOVA و tukey در مدت زمان ۴۸ ساعت برای ۳ سویه باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* و سویه باکتری گرم منفی *Escherichia coli* و *aeruginosa Pseudomonas* انجام شد و یافته‌های مربوط به مقایسه‌ها به صورت نمودار با برنامه Excel نشان داده شدند.

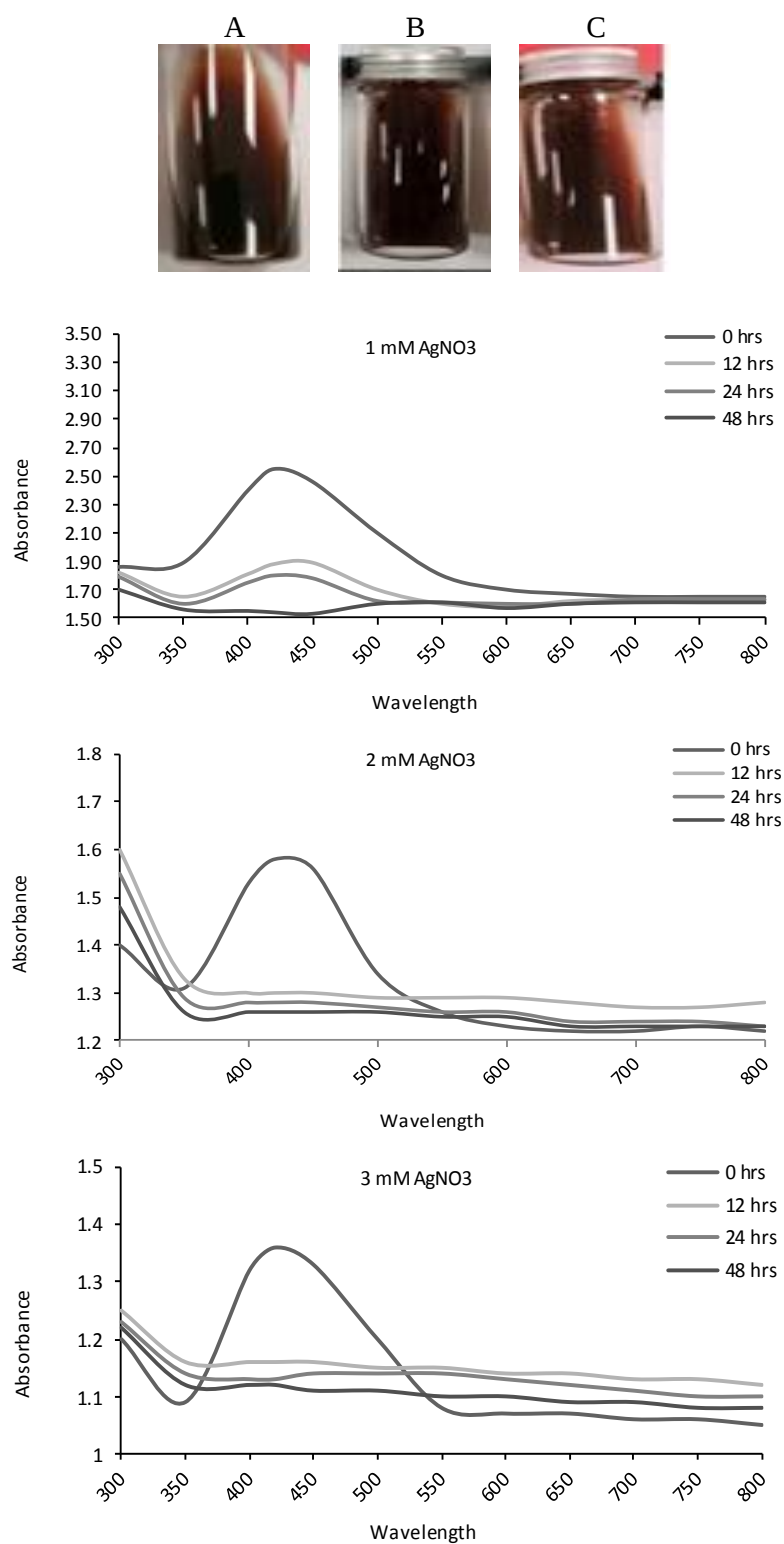
در زمان صفر سنتز شده بود به منظور طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز (FTIR) استفاده شد. آنالیز داده های مربوط به تولید نانوذره نقره در شکل ۵ نشان داده شده است. پروتئین به عنوان عامل تثبیت کننده نانوذرات نقره را احاطه کرده است. طیف به دست آمده حضور گروه های عاملی مختلف را برای نانوذرات نقره سنتز شده مشخص کرد که نقش مهمی در احیای یون های نقره به نانوذرات نقره و پایداری نانوذرات حاصل دارند (شکل ۵ و ۶).

جوشاندن، با غلظت ۱ میلی مولار نیترات نقره در زمان صفر، تغییر رنگ به قهوه ای تیره دیده شد که نشان دهنده سنتز نانوذرات نقره در این زمان بود؛ اما در زمان های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، عدم تغییر رنگ در این غلظت، نشان دهنده ناپایداری نانوذرات نقره سنتز شده بود (شکل ۴).

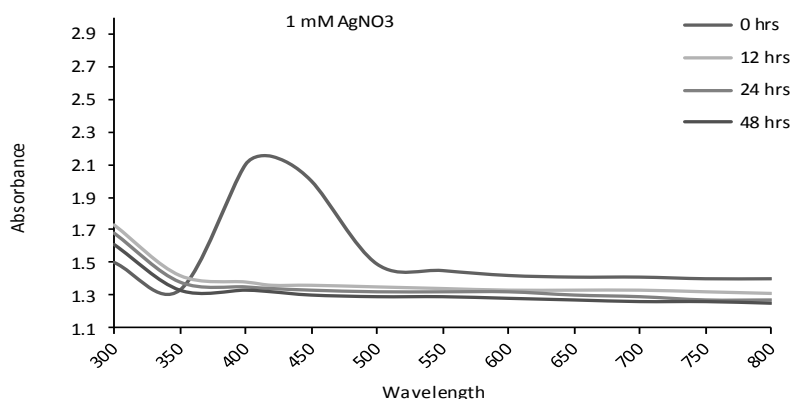
ت) نتایج حاصل از طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز (FTIR): در این روش از نانوذره ای که با روش بیومس تر در غلظت ۱ میلی مولار نیترت نقره



شکل ۲- روابط فیلوژنتیک بین سویه مطالعه شده و سویه های مشابه براساس توالی ژن *16S rRNA*. سویه مطالعه شده با رنگ قرمز نشان داده شده است. نمونه (FR798924) *Gloeobacter violaceus* VP3-01 به عنوان ریشه انتخاب شده است. سویه *Nostoc sp.* با قرابت فیلوژنتیکی ۹۷/۵ درصد همراه با سایر سویه های *Nostoc* درون یک کلاد قرار گرفته است.



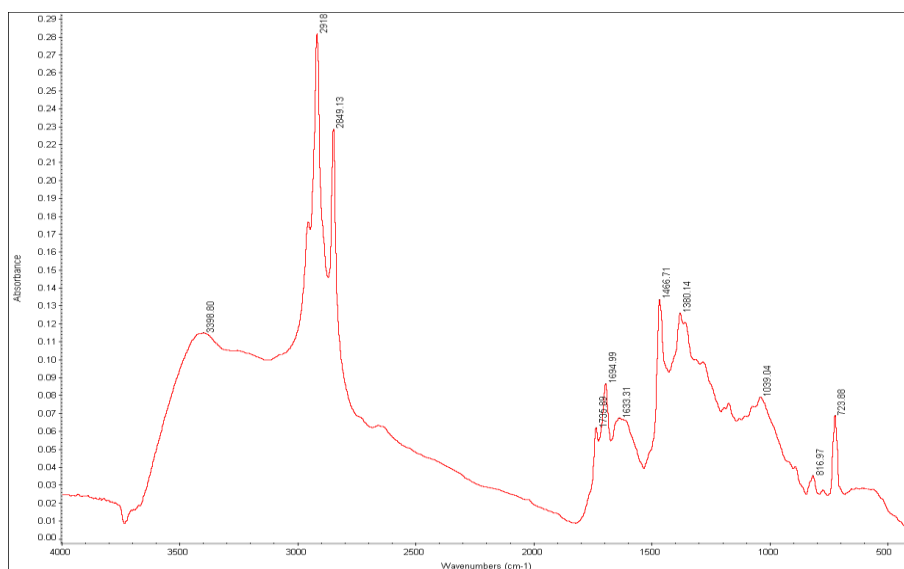
شکل ۳- تغییر رنگ قهوه‌ای تیره؛ (A) غلظت ۱ میلی مولار (B) ۲ میلی مولار و (C) ۳ میلی مولار نیترات نقره در حضور بیومس تر در زمان صفر. نمودار طیف سنجی UV-Vis غلظت ۱، ۲ و ۳ میلی مولار نیترات نقره تولیدی توسط بیومس تر در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت. نمودار نشان‌دهنده بیشترین جذب در ۴۲۰ نانومتر در زمان صفر است.



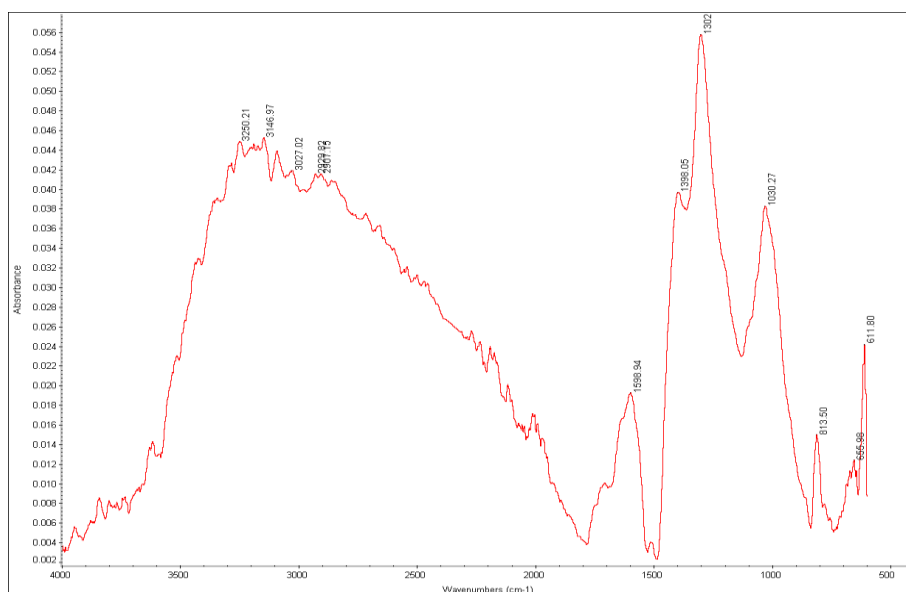
شکل ۴- تغییر رنگ قهوه‌ای تیره غلظت ۱ میلی مولار نیترات نقره در روش جوشاندن به همراه نمودار طیف سنجی نانوذرات نقره تولیدی با روش جوشاندن در غلظت ۱ میلی مولار در زمان‌های ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داده شده است. نمودار نشان دهنده پیک جذبی در ۴۲۰ نانومتر در زمان صفر است.

سانتی متر نشان دهنده حلقه آروماتیک اند. در ناحیه ۱۰۳۹ پیک مربوط به C-N کششی به صورت یک پیک متوسط دیده می شود. همچنین جذب مشاهده شده در ناحیه ۱۶۹۴ پیک مربوط به C=N و گروه آمیدی است. جذب های مربوط به ارتعاش کششی گروه NH و OH در ناحیه ۳۱۴۶ بر سانتی متر و ۳۲۵۰ بر سانتی متر نشان داده شده اند.

طیف IR دو پیام برای ارتعاش کششی پیوند ($C_{sp^3}-H$) آلکان در ناحیه ۲۹۱۸ بر سانتی متر و ۲۸۴۹ بر سانتی متر و یک پیام دیگر برای ($C_{sp^2}-H$) آلکن در ۳۰۲۷ بر سانتی متر نشان می دهد. پیک هایی متوسط در ناحیه حدود ۱۳۸۰ مربوط به CH_3 و CH_2 خمشی است. همچنین دو جذب در ناحیه ۱۴۶۶ بر سانتی متر و ۱۶۳۳ بر



شکل ۵- تجزیه و تحلیل طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز از نوع TABLET 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.

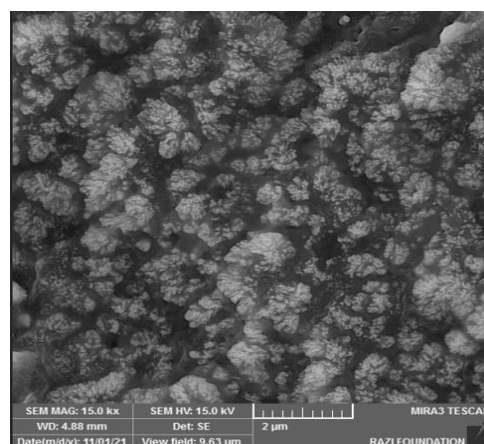


شکل ۶- تجزیه و تحلیل طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز از نوع ATR مربوط به نانوذرات نقره تولیدی به روش بیومس تر در غلظت ۱ میلی‌مولار در زمان ۴۸ ساعت. گروه‌های عاملی مشخص شده توسط پیک‌ها، وجود پوشش پروتئینی برای کاهش یون‌های نقره را نشان می‌دهند.

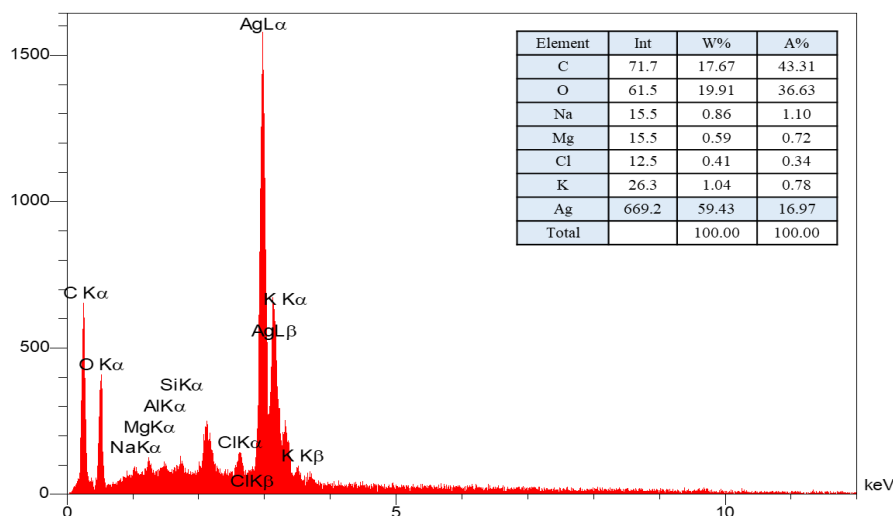
ج) طیف‌سنجی پراکندگی انرژی (اشعه ایکس) (EDS): نتایج حاصل از طیف‌سنجی پراکندگی انرژی، وجود ذرات نقره را به میزان بیشتری با ردیابی عناصر مختلفی مانند منیزیم، سدیم، پتاسیم، کلسیم و کلرید نشان دادند. در این تجزیه و تحلیل توسط طیف‌سنجی پراکندگی انرژی (اشعه ایکس) نانوذرات نقره سنتز شده به روش بیومس تر سویه سیانوباکتری *Nostoc sp.* در غلظت ۱ میلی‌مولار نیترات نقره در زمان ۴۸ ساعت، وجود سیگنال عنصری نقره تأیید شد (شکل ۸).

چ) آنالیز پراکندگی نور دینامیکی (DLS): قطر هیدرودینامیکی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از بیومس تر در غلظت ۱ میلی‌مولار در زمان ۴۸ ساعت با دستگاه پراکندگی نور دینامیکی (DLS) مدل Sympatec Helos H2396 اندازه‌گیری شد. نتایج مشخص کردند نانوذرات نقره سنتز شده اندازه‌ای در حدود ۰/۹ تا ۸۷ نانومتر دارند و میانگین اندازه نانوذرات نقره ۱۶/۱ نانومتر بود (شکل ۹).

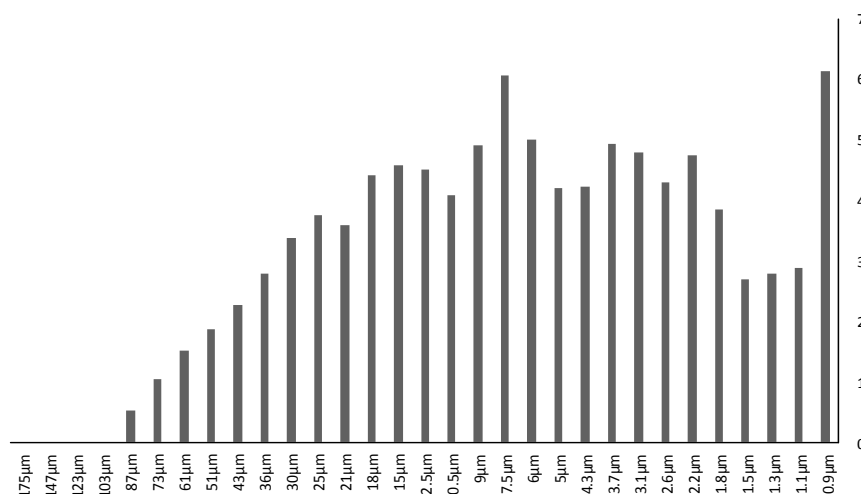
ث) بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): با توجه به تصویر میکروسکوپ الکترونی، مشخص شد با افزودن بیومس تر به نیترات نقره با غلظت ۱ میلی‌مولار، رسوب نانوذرات نقره در سطوح سلولی ایجاد شد (شکل ۷) و نانوذرات نقره کروی کوچک با اندازه‌های ۲۸ تا ۵۰ نانومتر در سطوح سلولی رسوب کردند.



شکل ۷- تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM. اندازه نانوذرات به روش بیومس تر در غلظت ۱ میلی‌مولار در زمان صفر، ۲۸ تا ۵۰ نانومتر بود و نانوذرات کروی شکل بودند.



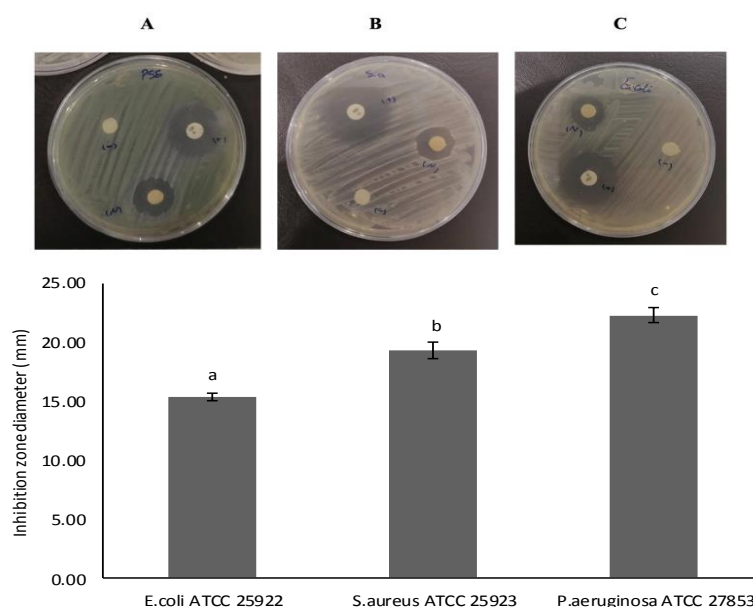
شکل ۸- طیف سنجی پراکندگی انرژی (اشعه ایکس) (EDS) نانوذرات نقره سنتز شده در روش بیومس تر سویه سیانوباکتری *Nostoc sp.* با غلظت ۱ میلی مولار نیترات نقره در زمان ۴۸ ساعت



شکل ۹. تجزیه و تحلیل پراکندگی نور پویا (DLS) نانوذرات نقره سنتز شده در روش بیومس تر سویه سیانوباکتری *Nostoc sp.* با غلظت ۱ میلی مولار نیترات نقره در زمان صفر

وجود دارد. میانگین هاله عدم رشد بعد از ۳ تکرار و بررسی های آماری برای *S. aureus*، *E. coli* و *p. aeruginosa* به ترتیب برابر ۱۵/۳۳، ۱۹/۳۳ و ۲۲/۳۳ میلی متر بود (شکل ۱۰. A-C).

ح) نتایج فعالیت آنتی باکتریال نانوذرات نقره (ارزیابی سنجش حساسیت ضد میکروبی (AST)): نتایج حاصل از آزمون واریانس یک طرفه و آزمون Tukey نشان دادند تفاوت معناداری در قطر ممانعت از رشد بین باکتری های *S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa*



شکل ۱۰- تست آنتی‌بیوگرام. در این پژوهش سویه‌های باکتری *E.coli* ATCC 25922، *S.aureus* ATCC 25923 و *P.aeruginosa* ATCC 27853 سنجش شدند. پلیت‌های A تا C به ترتیب نشان‌دهنده (A) سودوموناس آئروژینوزا، (B) استافیلوکوکوس اورئوس و (C) اشریشیا کلی، به همراه ۳ تکرار N= دیسک حاوی نانوذرات نقره، + نشان‌دهنده کنترل مثبت و - نشان‌دهنده دیسک بدون آنتی‌بیوتیک هستند. دیاگرام نشان‌دهنده واکاوی داده‌های آزمون میکروبی است. تفاوت حروف روی ستون‌ها (a,b,c) نشان‌دهنده تفاوت معنادار در قطر ممانعت از رشد باکتری‌های مطالعه‌شده توسط نانوذره تولیدشده است.

بحث و نتیجه‌گیری

سیانوباکتری نوستوک به علت داشتن رنگدانه‌های فتوسنتزی فیکوسیانین^۳ و فیکواریترین^۴ و آنزیم‌های اکسید و ردوکتازی قوی می‌تواند به‌عنوان یک میکروارگانیسم مناسب برای تولید نانوذرات استفاده شود. در این پژوهش سنتز نانوذرات نقره به صورت خارج سلولی با روش زیستی انجام گرفت. در روش خارج سلولی، یون‌های فلزی، روی سطح سلول‌ها به دام می‌افتند؛ به همین دلیل در مقایسه با تولید داخل سلولی، به استخراج نانوذرات تولیدشده از درون سلول نیاز نیست و این سبب شده است روش مطالعه شده در این پژوهش نسبت به روش تولید داخل سلولی نانوذرات نقره مقرون به‌صرفه‌تر باشد (۲۲). در این پژوهش تغییر رنگ محلول حاوی نیترات نقره به قهوه‌ای تیره به دلیل ارتعاشات پلاسمون سطحی در نانوذرات نقره است و

این تغییر رنگ به‌طور واضح از نشانه‌های اولیه تشکیل نانوذرات نقره است که با نتایج مطالعات کومار و همکاران مطابقت دارد (۲۳). در حقیقت، الکترون‌های آزاد در نانوذرات نقره با جذب نور مرئی برانگیخته می‌شوند و به یک تراز انرژی بالاتر می‌روند؛ اما به‌علت ناپایداری الکترون در حالت برانگیخته دوباره به تراز انرژی پایه برمی‌گردند و به همین دلیل فوتون از خود ساطع می‌کند. از آنجایی که برانگیختگی الکترون‌های آزاد وقتی در معرض نور قرار می‌گیرند به شکل رزونانسی است، نوری که ساطع می‌کنند در محدوده مرئی و به رنگ خاصی دیده می‌شود (۲۴)؛ مثلاً نانوذرات طلا، نور قرمز مایل به بنفش و نانوذرات نقره، نور قهوه‌ای ساطع می‌کنند (۲۵). این پدیده کمک می‌کند از لحاظ ماکروسکوپی به تشکیل نانوذرات پی

برده شود. باکتری هایی که قادر به احیای یون نقره هستند، رنگ محلول نقره را به صورتی، قهوه ای، زرد، ارغوانی و خاکستری تغییر می دهند. علت به وجود آمدن رنگ های مختلف، ناشی از شرکت عوامل زیستی متفاوت از باکتری ها برای احیای یون های نقره به نانوذرات نقره است که به تولید نانوذرات با اشکال و ابعاد مختلف منجر می شود و در نهایت، رنگ های مختلفی از نانوذرات ایجاد می شوند (۲۶). در پژوهش حاضر تغییر رنگ مشاهده شده به قهوه ای تیره در اثر برهمکنش بیومس و محلول نترات نقره با نتایج حاصل از پژوهش جیوان و همکاران در سال ۲۰۱۲، بارابادی و هناری در سال ۲۰۱۴ و فقری زوناس و همکاران در سال ۲۰۱۱ مشابهت داشت و نخستین نشانه های تولید نانوذرات نقره محسوب می شود (۲۵، ۲۷، ۲۸).

در زمینه تولید نانوذرات فلزی با استفاده از میکروارگانیسم ها طی چندین سال مطالعاتی صورت گرفته است؛ در همه این تحقیقات نانوذرات بعد از تولید، تعیین ویژگی شده و هریک از ویژگی های نانوذرات با دستگاه هایی بررسی شده اند. در پژوهش حاضر، نانوذرات نقره بعد از تولید، با استفاده از آنالیزهای دستگاهی بررسی شدند. یکی از ساده ترین روش ها برای تعیین ویژگی نانوذرات و نخستین گام در تأیید تولید نانوذرات فلزی، استفاده از طیف سنجی UV-vis است. پیک جذبی نانوذرات سنتز شده در پژوهش حاضر با پیک جذب نانوذرات سنتز شده در مطالعات سینگ و همکاران در سال ۲۰۱۴ (۲۹، ۳۰) و آل طیب و همکاران در سال ۱۳۹۶ (۳۱) مشابهت داشت. مهدیه و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز توانستند نانوذرات نقره را با سیانوباکتری *Spirulina Platensis* سنتز کنند (۳۲). همچنین، در مطالعه حسین و همکاران در سال ۲۰۱۵،

عصاره سیانوباکتری های آبی برای سنتز نانوذرات نقره جدا شد و با پژوهش حاضر تقریباً همخوانی داشت (۲۰). در مطالعه احمد و همکاران در سال ۲۰۱۵، بیوسنتز نانوذرات نقره توسط *Spirulina platensis* و *Nostoc sp.* بررسی شد. در این تحقیق نتایج حاصل از طیف سنجی UV-Visible، رزونانس پلاسمون سطح را در ۴۰۲ نانومتر نشان داد که با نتایج پژوهش حاضر مغایرت داشت (۱۷).

از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) برای تأیید تولید نانوذرات نقره استفاده شد. کنترل اندازه و ساختار نانوذرات تولید شده، مربوط به برهمکنش بین ترکیبات زیستی مانند پلی ساکاریدها، پروتئین، پلی فنی ها و اتم های فلزی می تواند باشد (۳۳). پژوهش حاضر با نتایج آنالیز SEM نانوذرات نقره تولید شده توسط راجشکومار و همکارانش در سال ۲۰۱۳ مشابهت دارد (۳۴). حمیدا و همکاران در سال ۲۰۲۰ دریافتند *Desertifilum IPPAS* *sp. B-1220* می تواند نانوذرات نقره ای کروی با اندازه های ۴/۵ تا ۲۶ نانومتر تولید کند که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مغایرت داشت (۳۵).

در این پژوهش، آنالیز پراکندگی نور دینامیک (DLS) برای تعیین قطر هیدرودینامیک انجام گرفت. اختلاف اندازه نانوذرات آبدار در سنجش پراکندگی نور دینامیک و نانوذرات بدون پوشش در تصاویر میکروسکوپ الکترونی به این معنی است که نانوذرات نقره سنتز شده در این مطالعه، یک پوشش آبدار و پروتئینی داشته اند. پروتئین ها با متصل شدن به نانوذرات نقره و ایجاد یک تاج پروتئینی از توده ای شدن و این آگلومریزه شدن نانوذرات جلوگیری می کنند و این پدیده نیز بر پایداری نانوذرات نقره می افزاید (۳۶). ناهمسان بودن اندازه نانوذرات در پراکندگی نور

دینامیک و میکروسکوپ الکترونی روبشی، یک روند به هنجار و همیشگی است؛ زیرا همان طور که پیش از این نیز بررسی شد، سنجش پراکندگی نور دینامیک براساس اندازه‌گیری قطر هیدرودینامیک و ساختار چندلایه است که نانوذرات نقره، مانند هسته‌ای در کانون و درون پوششی از تاجی آبدار و بیشتر پروتئینی قرار گرفته‌اند؛ بنابراین یافته‌های به‌دست آمده از سنجش‌های پراکندگی نور دینامیک از نظر ساختاری و شیمی سطحی با اندازه بنیادین و بدون پوشش نانوذره، یکسان نیست (۳۷). این در حالی است که میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانوذرات بدون پوشش و بدون تاج تصویربرداری می‌کند و اندازه دقیق و اصلی نانوذرات را نشان داده است. متفاوت بودن اندازه‌های به‌دست آمده از آنالیزهای پراکندگی نور دینامیک و شکل‌های فراهم‌شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی در مطالعات دیگر سیانوباکتریایی نیز مشاهده می‌شود.

سینگ و همکاران ناهمسان بودن اندازه نانوذرات نقره سنتز شده با سیانوباکتری‌ها در آنالیزهای پراکندگی نور دینامیک در برابر اندازه حاصل از میکروسکوپ الکترونی را به پوشیده شدن نانوذرات و پیچیده شدن آنها درون پوششی از مولکول‌های زیستی نسبت دادند (۳۰). میانگین قطر هیدرودینامیک نانوذرات نقره تولیدی در مطالعه سیانوباکتریایی روی چو هوری و همکاران در سال ۲۰۱۶، ۱۴۹ نانومتر بود؛ اما اندازه نانوذرات در تصویرهای میکروسکوپ نیروی اتمی از ۲۰ تا ۵۰ نانومتر و در شکل‌های میکروسکوپ الکترونی عبوری از ۵ تا ۵۰ نانومتر گزارش شد (۳۸). کومار و همکاران نیز در سال ۲۰۱۶، اندازه و پراکنش کمتر نانوذرات سنتز شده با سیانوباکتری‌ها را به بنیان سنجش پراکندگی نور دینامیک پیوسته دانستند. آنها بیان کردند سنجش

پراکندگی نور دینامیک علاوه بر نانوذره، مولکول‌های زیستی پوشاننده نانوذره را سنجش کرده و بنابراین اندازه بزرگ‌تری را فراهم کرده است (۳۹).

طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز ابزار مهمی برای شناسایی گروه‌های عاملی و برهمکنش‌های بین مولکول‌ها است. در مطالعات دیگر نیز نتایجی همچون نتایج این پژوهش ذکر شده است؛ برای مثال، ال کاساس و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند گروه عاملی هیدروکسیل از پلی‌فنل‌ها و گروه کربونیل از پروتئین‌های عصاره *Corallina officinalis* می‌توانند در تشکیل و تثبیت نانوذرات طلا کمک کنند (۴۰). حمیدا و همکاران در سال ۲۰۲۰ برای نخستین بار *Desertifilum IPPAS B-1220* را برای ساخت نانوذرات نقره بررسی کردند. داده‌های طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز پیک‌های IR مختلف را در ۱۰۴۲/۳۵، ۱۶۲۶/۰۵، ۲۳۵۳/۲۳، ۳۴۵۳/۷۲ و

۶۰۱/۸۱ بر سانتی‌متر برای نانوذرات نقره را نشان دادند. با توجه به طیف غالب طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز، محققان گزارش کردند بیومولکول‌های اصلی مسئول فرایندهای کاهش زیستی و تثبیت پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها هستند. همچنین، آنها دریافتند *Desertifilum IPPAS B-1220* sp. می‌تواند نانوذرات نقره‌ای کروی با اندازه‌های ۴/۵ تا ۲۶ نانومتر تولید کند (۳۵). نتایج آنالیز طیف‌سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز در این مطالعه نیز با نتایج مطالعات جیوان و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطابقت داشتند و تمامی این مطالعات بیان‌شده حضور پروتئین‌ها را به عنوان عوامل پایدارکننده نانوذرات نقره سنتز شده تأیید می‌کنند (۲۷).

از گذشته تاکنون، از فلزات به‌عنوان عوامل

نتایج مربوط به آنالیزهای طیف سنجی UV-Vis، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف سنجی تبدیل رامان و فوریه به مادون قرمز (FTIR) و پراکندگی نور دینامیک (DLS) در تحقیق حاضر، تولید موفق نانوذرات نقره را با استفاده از بیومس تر سیانوباکتری *Nostoc sp.* در غلظت ۱ میلی مولار نیترات نقره در زمان صفر به صورت یک روش ایمن و زیستی سریع، سازگار با محیط زیست، کم هزینه و منطبق با اصول شیمی سبز نشان می دهد و با توجه به اثبات فعالیت ضد میکروبی این نانوذره، از آن در زمینه های مختلف برای پیشگیری از آلودگی و انتشار عوامل عفونت می توان استفاده کرد. استفاده از سیانوباکتری ها می تواند به عنوان یک روش بالقوه در تولید نانوذرات نقره با خواص و کارایی منحصر به فرد برای کاربردهای مختلف در پزشکی، صنایع و غیره به شمار آید.

References

- (1) Priyadarshini S., Gopinath V., Priyadarshini NM., MubarakAli D., Velusamy P. Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2013; 102: 232-7.
- (2) Husseiny MI., Abd El-Aziz M., Badr Y., Mahmoud MA. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2007; 67 (3-4): 1003-6.
- (3) Nowruz B., Haghighat S., Fahimi H., Mohammadi E. *Nostoc* cyanobacteria species: A new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research* 2018; 9 (1): 5-12.
- (4) Victory KJ. Isolation and characterisation of antimicrobial compounds synthesised by *Microcystis sp* 2009.

ضد باکتریایی استفاده شده است. مطالعات لین و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان دادند یون های نقره آزاد شده از نانوذرات نقره به عوامل با بار منفی دیواره سلولی باکتری متصل شده اند و باعث پاره شدن و به هم ریختن ساختمان پروتئین و در نهایت مرگ سلولی می شوند (۴۱). سوندی و سالوپک در سال ۲۰۰۴، تجمع نانوذرات نقره در دیواره سلولی باکتری ها و نفوذ به درون سلول را علت مرگ باکتری دانستند. آنها همچنین اندازه و شکل نانوذرات نقره را در خاصیت باکتری کشی آن مؤثر می دانند. به این صورت که نانوذرات نقره با ابعاد کوچک تر و کروی شکل اثرات میکروب کشی بیشتری دارند (۲۶).

کاهش اندازه نانوذرات نقره باعث افزایش یون نقره از سطح می شود و خاصیت ضد باکتریایی بیشتری را فراهم می کند. علاوه بر اندازه نانوذرات، شکل آنها مؤثر است و نانوذرات با شکل کروی توانایی بیشتری در درگیری با باکتری و انهدام باکتری دارند (۴۲). نانوذرات نقره تولید شده در پژوهش حاضر کروی بودند و مطالعات نشان داده اند شکل نانوذرات نقره بر خاصیت ضد باکتریایی آن مؤثر است؛ به این صورت که بهترین شکل نانوذرات نقره برای جلوگیری از رشد باکتری به ترتیب نانوذرات گوشه دار و بی شکل، نانوذرات کروی و نانوذرات میله ای شکل هستند؛ زیرا به ترتیب توانایی درگیری بیشتری با باکتری ها دارند (۴۳). در مطالعه حاضر، خاصیت ضد باکتریایی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از بیومس تر سیانوباکتری *Nostoc sp.* آب شیرین روی ۳ مورد باکتری هاله عدم رشد مشخصی را نشان داد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج بسیاری از مطالعات همخوانی داشتند که نمونه هایی از این مطالعات در ادامه این مطابقت را نشان داده اند.

- (5) Norouzi B. A review of the industrial application of microalgae and cyanobacteria in the removal of heavy metals and the synthesis of nanoparticles. *Journal of Environmental Geology* 2021; 15 (54): 49-62.
- (6) Rajabpour N., Nowruzi B., Ghobeh M. Investigation of the toxicity, antioxidant and antimicrobial activities of some cyanobacterial strains isolated from different habitats. *Acta Biologica Slovenica* 2019; 62 (2): 3-14.
- (7) Xie J., Lee JY., Wang DI., Ting YP. Identification of active biomolecules in the high-yield synthesis of single-crystalline gold nanoplates in algal solutions. *Small* 2007; 3 (4): 672-82.
- (8) Nowruzi B., Fahimi H., Lorenzi AS. editors. Recovery of pure C-phycoerythrin from a limestone drought tolerant cyanobacterium *Nostoc* sp. and evaluation of its biological activity. *Anales de Biología; 2020: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia*.
- (9) Nowruzi B., Sarvari G., Blanco S. *Applications of cyanobacteria in biomedicine*. Elsevier; 2020. 441-53.
- (10) Reddy AS., Chen CY., Chen CC., Jean JS., Chen HR., Tseng MJ., Fan CW., Wang JC. Biological synthesis of gold and silver nanoparticles mediated by the bacteria *Bacillus subtilis*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2010; 10 (10): 6567-74.
- (11) Rai M., Yadav A., Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Journal of Biotechnology Advances* 2009; 27 (1): 76-83.
- (12) Mukherjee P., Ahmad A., Mandal D., Senapati S., Sainkar SR., Khan MI., Parishcha R., Ajaykumar PV., Alam M., Kumar R., Sastry M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Letters* 2001; 1 (10): 515-9.
- (13) Ingle A., Gade A., Pierrat S., Sonnichsen C., Rai M. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. *Journal of Current Nanoscience* 2008; 4 (2): 141-4.
- (14) Patel V., Berthold D., Puranik P., Gantar M. Screening of cyanobacteria and microalgae for their ability to synthesize silver nanoparticles with antibacterial activity. *Journal of Biotechnology Reports* 2015; 5: 112-9.
- (15) Neilan BA., Jacobs D., Blackall LL., Hawkins PR., Cox PT., Goodman AE. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1997; 47 (3): 693-7.
- (16) Lepère C., Wilmotte A., Meyer B. Molecular diversity of microcystis strains (cyanophyceae, chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Journal of Systematics and Geography of Plants* 2000; 275-83.
- (17) Ahmed E., Hafez A., Ismail F., Elsonbaty M., Abbas H., Eldin RS. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Spirulina platensis* and *Nostoc* sp. *Global Advanced Research Journal of Microbiology* 2015; 4 (4): 36-49.
- (18) 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.
- (19) Richert L., Golubic S., Guédès RL., Ratiskol J., Payri C., Guezennec J. Characterization of exopolysaccharides produced by cyanobacteria isolated from Polynesian microbial mats. *Journal of Current Microbiology* 2005; 51 (6): 379-84.
- (20) 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.
- (21) Nowruzi B., Blanco S., Nejdassattari 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). *International Journal on Algae* 2018; 20 (4).

- (22) Mohseniazar M., Barin M., Zarredar H., Alizadeh S., Shanehbandi D. Potential of microalgae and lactobacilli in biosynthesis of silver nanoparticles. *BioImpacts: BI* 2011; 1 (3): 149.
- (23) Kumar P., Senthamil Selvi S., Govindaraju M. Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candida* spp. *Journal of Applied Nanoscience* 2013; 3 (6): 495-500.
- (24) Honary S., Barabadi H., Gharaei-Fathabad E., Naghibi F. Green synthesis of silver nanoparticles induced by the fungus *Penicillium citrinum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2013; 12 (1): 7-11.
- (25) Honary S., Gharaei-Fathabad E., Barabadi H., Naghibi F. Fungus-mediated synthesis of gold nanoparticles: A novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2013; 13 (2): 1427-30.
- (26) Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004; 275 (1): 177-82.
- (27) Jeevan P., Ramya K., Rena AE. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Biotechnology* 2012; 11: 72-6.
- (28) Zonooz NF., Salouti M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using cell filtrate of *Streptomyces* sp. ERI-3. *Scientia Iranica* 2011; 18 (6): 1631-5.
- (29) Singh G., Babele PK., Shahi SK., Sinha RP., Tyagi MB., Kumar A. Green synthesis of silver nanoparticles using cell extracts of *Anabaena doliolum* and screening of its antibacterial and antitumor activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2014; 24 (10): 1354-67.
- (30) Singh G., Babele PK., Shahi SK., Sinha RP., Tyagi MB., Kumar A. Green synthesis of silver nanoparticles using cell extracts of *Anabaena doliolum* and screening of its antibacterial and antitumor activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2014; 24 (10): 1354-67.
- (31) Al-Tayyib P., Qadam P., Mohammadi P. Synthesis of silver nanoparticles by cyanobacteria. *Fifth National Congress of Biology and Natural Sciences of Iran*. undefined; 2017.
- (32) Mahdiah M., Zolanvari A., Azimee A. Green biosynthesis of silver nanoparticles by *Spirulina platensis*. *Scientia Iranica* 2012; 19 (3): 926-9.
- (33) Shao Y., Jin Y., Dong S. Synthesis of gold nanoplates by aspartate reduction of gold chloride. *Journal of Chemical Communications* 2004; 10 (9): 1104-5.
- (34) Rajeshkumar S., Malarkodi C., Paulkumar K., Vanaja M., Gnanajobitha G., Annadurai G. Intracellular and extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by using marine bacteria *Vibrio alginolyticus*. *Nanosci Nanotechnol* 2013; 3 (1): 21-5.
- (35) Hamida RS., Ali MA., Redhwan A., Bin-Meferij MM. Cyanobacteria—a promising platform in green nanotechnology: A review on nanoparticles fabrication and their prospective applications. *International Journal of Nanomedicine* 2020; 15: 6033.
- (36) Gebauer JS., Malissek M., Simon S., Knauer SK., Maskos M., Stauber RH., Peukert W., Treuel L. Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure. *Langmuir* 2012; 28 (25): 9673-9.
- (37) Bhattacharjee S. DLS and zeta potential—what they are and what they are not?. *Journal of Controlled Release* 2016; 235: 337-51.
- (38) Roychoudhury P., Gopal PK., Paul S., Pal R. Cyanobacteria assisted biosynthesis of silver nanoparticles- a potential antileukemic agent. *Journal of Applied Phycology* 2016; 28 (6): 3387-94.
- (39) Kumar B., Cumbal L., Debut A. Phycosynthesis of silver nanoparticles using *Calothrix* algae through ultrasonic method. *Proceedings of the XI Congreso de Ciencia Y Tecnologia ESPE Sangolqui, Ecuador*; 2016.
- (40) El-Kassas HY., El-Sheekh MM.

- Cytotoxic activity of biosynthesized gold nanoparticles with an extract of the red seaweed *Corallina officinalis* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014; 15 (10): 4311-7.
- (41) Lin D., Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Journal of Environmental Pollution* 2007; 150 (2): 243-50.
- (42) Pal S., Tak YK., Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73 (6): 1712-20.
- (43) Li Q., Mahendra S., Lyon DY., Brunet L., Liga MV., Li D., Alvarez PJ. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Journal of Water Research* 2008; 42 (18): 4591-602.

¹- Antimicrobial Suceptibility Test

²- Antimicrobial Suceptibility Test

³- Phycocyanin

⁴- Phycoerythrin