



مطالعه توانایی باکتری های جدا شده از خاک های سرخ جزیره هرمز در تولید نانوذرات آهن

زینب پوررضا^۱، محمد مهدی متقی^{۲*}

^۱ کارشناس ارشد، گروه میکروپ شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان.
^۲ استادیار، گروه میکروپ شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان.

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات مغناطیسی آهن به طور گسترده برای کاربردهای بیولوژیکی، پزشکی و صنعت مورد مطالعه قرار گرفته اند. روش های سنتز شیمیایی و فیزیکی تولید نانوذرات منجر به آلودگی محیط زیست می گردد. در این میان، باکتری قادر به سنتز مقدار قابل توجهی نانوذرات آهن مطابق با اصول شیمی سبز هستند. این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی باکتری های تولید کننده نانوذرات آهن از خاک های جزیره هرمز صورت گرفت.

مواد و روش ها: این پژوهش به صورت مقطعی با نمونه گیری از خاک جزیره هرمز انجام شد. پس از تهیه رقت و کشت و خالص سازی در محیط پایه، از آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی به منظور شناسایی باکتری ها استفاده شد. خصوصیات نانو ذرات تولید شده توسط باکتری ها با استفاده از روش های طیف سنجی UV-Vis، کریستالوگرافی اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: با توجه به ویژگی های بیوشیمیایی و نیز توالی یابی و BLAST در تارنمای NCBI نمونه خاک جزیره هرمز حضور باکتری سودوموناس به اثبات رسید. آنالیز طیف سنجی UV-Vis، XRD وجود نانو ذرات آهن تولیدی توسط باکتری ها را اثبات کرد. همچنین تصاویر میکروسکوپ نگاره نیز اندازه نانو ذرات تولیدی را کمتر از ۵۰ نانومتر نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش کفایت سنتز زیستی نانوذرات آهن با استفاده از باکتری سودوموناس موجود در خاک جزیره هرمز، به عنوان یک روش ارزان و بدون نیاز به صرف انرژی زیاد را نشان داد. از این رو استفاده از این باکتری، به عنوان یک منبع زیستی مفید برای سنتز نانو ذرات آهن در مقیاس زیاد و ارزیابی پتانسیل کاربردی آن در پژوهش های تکمیلی پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: نانوذرات آهن، بیوسنتز، سودوموناس، جزیره هرمز.

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۶

مقدمه

نمک زندگی می کنند (۲). عده ای از ارگانیزم های موجود در طبیعت قادر به تولید مواد خاصی در داخل یا خارج سلول هستند. برای نمونه باکتری های مگنتوتاکتیک می توانند نانوذرات مغناطیسی تولید کنند. امروزه به نانوذرات به دلیل ویژگی های منحصر به فردی که توسط عناصر مربوطه مشاهده نمی شود، توجه خاصی شده است. از بین نانو ذرات، نانوذرات مغناطیسی آهن (مگنتیت) به دلیل خواص ویژه مغناطیسی و سازگاری با محیط زیست امروزه مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. از کاربردهای نانوذرات مغناطیسی

در میان منابع طبیعی، باکتری ها به طور وسیع برای سنتز نانو ذرات فلزی بررسی شده اند. (۱). باکتری ها فراوان ترین میکروارگانیزم ها بر روی زمین، با تنوع گسترده در اندازه، شکل و روش های مختلف کسب انرژی هستند که در انواع زیستگاه ها شامل محیط های خیلی خاص مانند دماهای بسیار بالا یا پائین، محیط های اسیدی، قلیایی و غلظت های سولفور و

* آدرس برای مکاتبه: کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، گروه میکروپ شناسی.
تلفن: ۰۹۱۳۳۴۱۰۰۲۶ پست الکترونیک: motaghi.mehdi@gmail.com

بیومینرالیزاسیون مگنتیت (Fe_3O_4) در ساختارهای درون سلولی متصل به سطح داخلی غشا سیتوپلاسمی خود کریستال‌های مگنتیت تولید می‌کنند (۱۵). باکتری‌های تولیدکننده نانوذرات مغناطیسی آهن زیستگاه‌های متنوع زیستی مانند دریاچه‌ها، تالاب‌ها، رودخانه‌ها، معادن آهن و خاک‌ها دارند (۱۶).

در میان روش‌های مختلف موجود در بیوسنتز نانو ذرات، استفاده از باکتری‌ها بیشتر مورد توجه بوده است. دانشمندان مختلفی سویه‌های گوناگون باکتری‌های تولیدکننده نانو ذرات را در نقاط مختلف جهان شناسایی کرده‌اند. از جمله می‌توان به سویه MS-1، سویه AMB-1 و سویه مگنتواسپیریلوم گریفیس‌والدینس (*Magnetospirillum gryphiswaldense*) اشاره نمود (۱۷-۱۹).

سنتز زیستی نانو ذرات توسط باکتری‌ها مختلف قبلاً مورد مطالعه قرار گرفته است. از روماند کشت باکتری باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis* 168) به منظور تولید نانو ذرات طلا استفاده شده است (۲۰). همچنین بهارد (Bharde) و همکاران (۲۰۰۵) تولید نانو ذرات آهن با اشکال شبه کروی و مکعبی با میانگین اندازه ۱۰-۴۰ و ۵۰-۱۵۰ نانومتر و به صورت خارج سلولی را با استفاده از اکتینوباکتر (*Actinobacter* sp.) گزارش کرده‌اند (۲۱). در همین زمینه تولید نانو ذرات آهن با اندازه کمتر از ۳۵ نانومتر از طریق کشت باکتری‌های بی‌هوازی ترموانروباکتر *Thermoanaerobacter ethanolicus* توسط روح (Roh) و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش شده است (۲۲).

همچنین محققان موفق به سنتز نانو ذرات اکسید آهن به صورت مجتمع با اندازه ذرات ۲۰-۴۰ نانومتر از باکتری *Shewanella loihua* شده‌اند (۱۶). در تحقیقی که بر روی سنتز زیستی نانو ذرات اکسید آهن توسط باسیلوس سوبتیلیس جدا شده از خاک ریزوسفر انجام گرفت مشخص گردید که این باکتری توانایی تولید نانو ذرات اکسید آهن را دارد (۲۳). هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده نانو ذرات آهن در خاک‌های جزیره هرمز بود.

مواد و روش‌ها

آهن می‌توان به رسانش دارو، درمان تومورهای سرطانی به روش افزایش دمای بدن (Hyperthermia)، فتوکاتالیست‌ها، خواص ضد میکروبی، حسگرهای زیستی و به عنوان عامل کنتراست در تصویربرداری MRI (Magnetic resonance imaging) اشاره نمود (۸-۳).

در بین نانو ذرات، نانو ذرات آهن اکسید (مگنتیت، Fe_3O_4) به عنوان مهم‌ترین دسته از ذرات مغناطیسی نه تنها به دلیل ویژگی‌های شایان توجهی مانند اندازه ایده‌آل و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مناسب وابسته به ریخت این ذرات، بلکه به دلیل زیست سازگاری بالا و ویژگی‌های سوپر پارامغناطیسی مورد توجه محققین است (۹ و ۱۰).

اندازه این ذرات تا زیر ۱۰ نانومتر نیز گزارش شده است. با توجه به ابعاد سلول‌ها (۱۰ تا ۱۰۰ میکرون)، ویروس‌ها (۲۰ تا ۴۰ نانومتر)، پروتئین‌ها (۵ تا ۵۰ نانومتر) و حتی ژن‌ها (پهنای ۲ نانومتر و طول ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر)، این ذرات امکان نفوذ و حتی نشانه‌گذاری انواع سلول‌ها و بافت را میسر می‌سازند. با توجه به کاربردهای وسیع نانوذرات مغناطیسی آهن در پزشکی و صنعت و همچنین الزامات زیست محیطی به ویژه به دلیل آلودگی‌های ناشی از روش‌های شیمیایی و فیزیکی تولید نانوذرات، روش‌های زیستی تولید نانو ذرات مورد پژوهش بیشتری قرار گرفته است (۱۱).

روش‌های مختلف تولید نانوذرات از نظر دستیابی به ذراتی با ترکیب و اندازه دانه معین و توزیع مناسب، مصرف انرژی و راحتی کار هنوز در حال بررسی و توسعه است، تا این که روش تولید نانوذرات با استفاده از روش‌های زیستی مطرح شد (۱۲). روش‌های زیستی شامل استفاده از باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و مخمرها می‌باشد. همچنین برخی از باکتری‌ها با ساختارهای ویژه‌ای که در غشای سیتوپلاسمی خود دارند، قادر به ذخیره‌سازی نانو ذرات هستند. استفاده از باکتری‌ها به عنوان منبع ارزان قیمت تولید نانوذرات آهن کاملاً مطابق با الگوی شیمی سبز می‌باشد (۱۲ و ۱۳).

در واقع برخی از باکتری‌ها قادر به تولید مقدار قابل توجهی از نانو ذرات آهن می‌باشند (۱۴). باکتری‌ها از طریق

دقیقه) شدند. سپس رسوبات باقی‌مانده با آب دیونیزه شسته شدند. رسوبات در دمای ۸۰ درجه سلیسیوس خشک شدند و برای آنالیز XRD و SEM استفاده گردیدند. یک نمونه فاقد محلول شفاف باکتریایی نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

د) شناسایی اولیه باکتری‌های تولید کننده نانو ذرات: در ابتدا خصوصیات ظاهری باکتری‌ها از لحاظ اندازه، شکل، رنگ، لبه، سطح و شفافیت مورد بررسی قرار گرفت. از رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی مانند هیدرولیز اوره، آزمون حرکت، تولید ایندول، متیل رد، تست VP برای شناسایی اولیه باکتری‌های تولید کننده نانو ذرات استفاده شد (۲۵).

ه) استخراج DNA: برای این منظور از روش استاندارد جداسازی DNA باکتری‌های گرم منفی استخراج گردید. در ابتدا باکتری‌ها در بافر TE حل شدند. به این مخلوط بافر SDS ۱٪، آنزیم Proteinase اضافه و به مدت ۱ تا ۳ ساعت در ۳۷ درجه سلیسیوس نگهداری شدند. پس از توقف گرمادهی، به مخلوط حاصل NaCl و محلول CTAB/NaCl اضافه و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه گرمادهی شدند. به مخلوط حاصل، مخلوط کلروفرم-ایزواکلیل الکل اضافه و به آرامی تکان داده شد تا دو فاز با هم ترکیب شدند. سپس مخلوط حاصل در دمای ۴ درجه سلیسیوس و در دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۲۰ تا ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به رومانده حاصل ایزوپروپانول سرد اضافه شد. محلول به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سلیسیوس نگهداری شد. سپس محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ گردید. به رسوب حاصل اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و مجدداً محلول در ۳۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در دمای آزمایشگاه خشک شد. برای تایید خلص سازی از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۰/۷ درصد استفاده شد (۲۶).

و) واکنش زنجیره ای پلی‌مرز (PCR): پس از رشد کلنی‌های مختلف، یکی از باکتری‌های رشد یافته در کمتر از ۲۴ ساعت به منظور شناسایی انتخاب گردید. شناسایی با استفاده از روش توالی یابی ناحیه *16S rDNA* انجام شد. به منظور تکثیر ژن

الف) نمونه برداری: نمونه های خاک از مناطق مختلف جزیره هرمز (موقعیت جغرافیایی با طول ۲۷ درجه و ۴ دقیقه شمالی و عرض ۵۶ درجه و ۲۸ دقیقه شرقی) از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی متری در سال ۱۳۹۴ برداشت شد. سپس نمونه های برداشت شده به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در یخچال در دمای ۴ درجه سلیسیوس نگهداری شدند (۲۴).

ب) کشت باکتری‌ها: از خاک مورد مطالعه رقت متوالی تهیه شد و تا رقت 10^{-5} رقیق گردید. ۲ میلی لیتر از آن در سطح محیط کشت تریپتیک سوی آگار TSA (مرک، آلمان) استریل و تلقیح گردید و پس از ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. کلنی‌ها بر اساس اختلافات ظاهری شامل رنگدانه، اندازه، تحدب، سرعت رشد، حاشیه کلنی شناسایی شدند. سپس از تک کلنی‌های رشد یافته به منظور کشت بر روی پلیت‌های جدید استفاده گردید. برای خلص‌سازی باکتری‌ها، از روش کشت متوالی بر روی محیط TSA استفاده شد.

ج) تولید نانو ذرات توسط باکتری: از باکتری‌های جداسازی شده در محیط تریپتیک آگار به طور جداگانه یک لوپ به ارلن‌های استریل حاوی محیط کشت مایع لوری برتانی (مرک، آلمان) تلقیح شد. سپس به مدت ۳۶ ساعت بر روی شیکر انکوباتور با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سلیسیوس قرار گرفت. در انتها توده سلولی و محلول شفاف رویی پس از سانتریفیوژ (۵۰۰۰ دور بر دقیقه) به مدت ۱۰ دقیقه، از هم جدا شدند. در ادامه توده سلولی با آب مقطر استریل ۳ بار شستشو داده شد. توده سلولی به دست آمده به همراه رومانده برای آنالیزهای بعدی، به منظور تولید احتمالی نانو ذرات آهن استفاده شدند. مقدار ۵ میلی‌لیتر از رومانده به طور جداگانه به ۱۰۰ میلی لیتر محلول $FeCl_2$ و $FeCl_3$ (Merck Company, German) اضافه گردید تا رنگ مخلوط از زرد به قهوه‌ای متمایل به قرمز تغییر یابد. پس از ۵ دقیقه ۲۰ میلی لیتر سود سوزآور به مخلوط اضافه گردید و مخلوط به سیاه تغییر رنگ داد. در انتها نمونه‌ها سانتریفیوژ (۱۲۰۰ دور بر

۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه فیکس و سپس با لایه تازکی از طلا روکش شد و توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی رویشی (MIRA3, TESCAN, Czech Republic) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین آنالیز عنصری نانو ذرات تولید شده توسط دستگاه EDX (MIRA3, TESCAN, Czech Republic) صورت گرفت (۳۰).

یافته‌ها

رنگ آمیزی گرم از نمونه های خاک نشان داد که باکتری های مورد نظر گرم منفی و میله‌ای می‌باشند. نتایج آزمون های بیوشیمیایی نشان داد که سویه جداسازی شده دارای تست حرکت و ایندول مثبت و تست متیل رد و VP منفی می‌باشد. که به مشخصات باکتری سودوموناس نزدیک می‌باشد. برای تشخیص بهتر جدایه تولید کننده نانو ذرات آهن از روش مولکولی نیز استفاده شد. پس از تعیین توالی محصولات PCR، این توالی بازسازی، اصلاح و وارد نرم افزار کروماس شد. سپس پاسخ پرایمرهای پیشرو و پیرو بررسی و توالی ژنی کامل گونه به صورت دو رشته DNA بازسازی گردید. پس از بلاست این گونه در پایگاه اینترنتی NCBI و مقایسه با گونه‌های ثبت شده در این پایگاه، گونه مورد نظر با شباهت ۹۹ درصد به گونه سودوموناس (*Pseudomonas sp.*) تعلق داشت.

تولید نانو ذرات آهن توسط باکتری سودوموناس با استفاده از طیف‌سنج UV-Vis به اثبات رسید. در طیف حاصل، پیک جذب در طول موج ۵۵۰-۵۰۰ نانومتر مربوط به رزونانس پلاسمون سطحی نانوذرات آهن می‌باشد. نمودار ۱ طیف مربوط به نانو ذرات آهن حاصل از باکتری سودوموناس را نشان می‌دهد. قوی ترین پیک جذبی نمونه در اطراف ۵۵۰ نانومتر مشاهده گردید. همچنین افزایش مقدار جذب در یک طول موج خاص، بیانگر افزایش مقدار نانو ذرات تولید شده می‌باشد.

در شکل ۱ الگوی پراش XRD ساختار کریستالی نانو ذرات آهن را نشان می‌دهد. همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود پیک‌های شاخص مغناطیسی در زوایای ۱۸/۲۷۰، ۳۰/۰۳۵، ۳۵/۴۲۳، ۴۳/۰۵۳، ۵۳/۳۹۲، ۵۶/۹۴۴ و ۶۲/۵۱۶ مشاهده

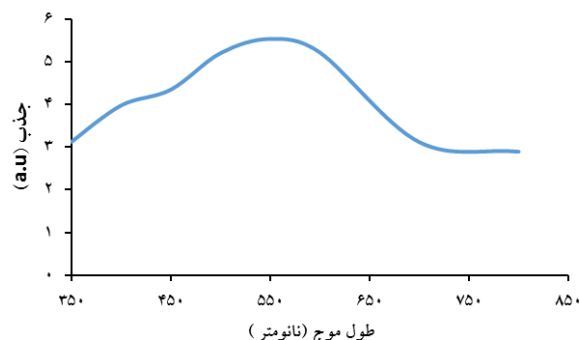
16S rDNA باکتری و دستیابی به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز از پرایمرهای '27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و '1492R: 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3' استفاده گردید (۲۷ و ۲۸). واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۲ میکرولیتر آب مقطر، ۵ میکرولیتر بافر 10x، ۵ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۱۰ میکرومول)، ۱ میکرولیتر dNTP Mix (غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۱۰ میکرولیتر Taq DNA Polymerase ۰/۵ میکرولیتر آنزیم (غلظت ۵ واحد) انجام گردید. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Block assembly T48, Germany) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و در ادامه ۲۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ انجام شد. محصولات به PCR به ژل آگاروز ۱/۵ درصد واحد اتیدیوم برآید منتقل و الکتروفورز گردیدند. در نهایت محصول PCR جهت تخلیص و تعیین توالی به همراه پرایمرهای پیشرو به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شدند با استفاده از BLAST نزدیک ترین سکانس‌های مشابه به باکتری مشخص و جنس و گونه شناسایی گردید.

(ز آماده سازی نمونه برای شناسایی نانو ذرات: نانو ذرات تولید شده با استفاده از دستگاه طیف سنجی ماورا بنفش-مرئی جذبی (MB Series FT-IR, Bomem, USA) در محدوده ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر بررسی شد. به منظور تهیه نمونه برای آنالیز XRD از نانو ذرات تولید شده توسط باکتری‌ها برداشت شد و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (۷۰۰۰ rpm) شد. سپس رسوب به دست آمده بر روی پلیت شیشه‌ای ریخته شد و درون فور با دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. سپس نمونه آماده شده با استفاده از دستگاه XRD (MPD-3000, GNR, Italy) مورد آنالیز قرار گرفت (۲۹). از نانو ذرات تولید شده، مقداری برداشته و روی گرید مخصوص میکروسکوپ SEM قرار داده شد و در آن در دمای

تولیدی کمتر از ۵۰ نانومتر می باشند. شکل ۳ نتایج آزمون EDX را نشان می دهد. با استفاده از الگوی انرژی پرتو ایکس عناصر کربن، اکسیژن، سدیم، کلر و آهن شناسایی شده اند. کربن موجود در نتایج EDX مربوط به بستر مانت هادی (ذرات کربن به عنوان هدایتگر جریان الکتریکی) می باشد. میزان آهن شناسایی شده در این ذره نزدیک به ۱۵ درصد وزنی در نانوذرات آهن تولید شده توسط باکتری می باشد. به طور کلی نتایج حاصل همه آنالیزها نشان دهنده تشکیل ساختار کریستالی نانو ذرات آهن می باشد.

بحث

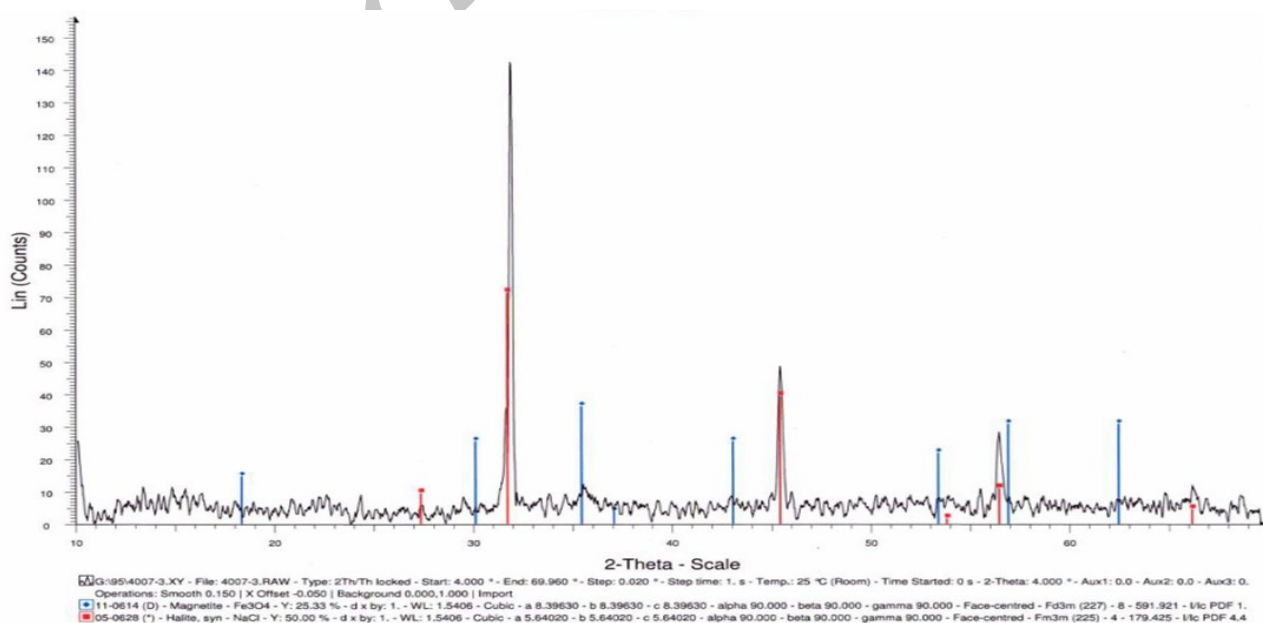
امروزه، تهیه نانو ذرات زیستی با توجه به کاربرد آنها در پزشکی و علوم زیستی رو به افزایش است. از سوی دیگر، افزایش آگاهی نسبت به شیمی سبز و فرآیندهای زیستی، استفاده از روش های سازگار با محیط زیست برای تولید نانوذرات زیستی ضروری می باشد. هرچند روش های گوناگون زیستی برای تهیه نانو ذرات آهن شناخته شده است، اما استفاده از میکروارگانیسم ها به ویژه باکتری ها روز به روز رو به افزایش است. مطالعه حاضر به منظور جداسازی و شناسایی باکتری های تولید



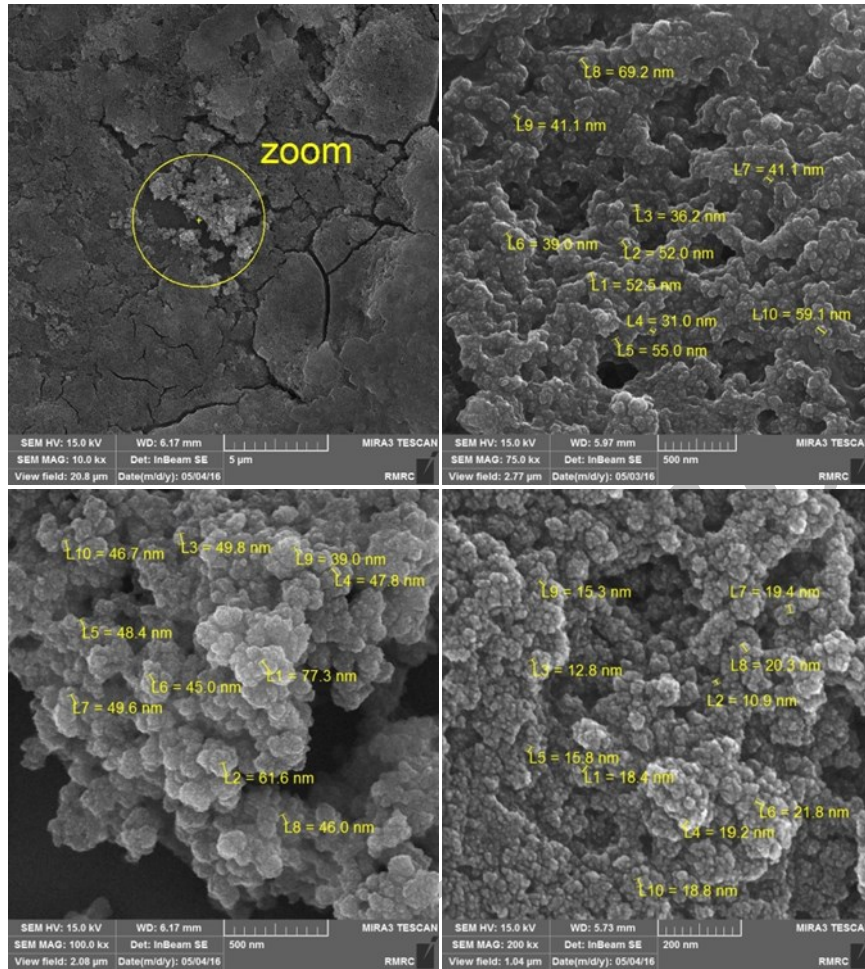
نمودار ۱: جذب UV-Vis نانوذرات تولیدی توسط باکتری سودوموناس

می شوند که منطبق با صفحه های (۱۱۱)، (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱) و (۴۴۰) مغناطیسی هستند.

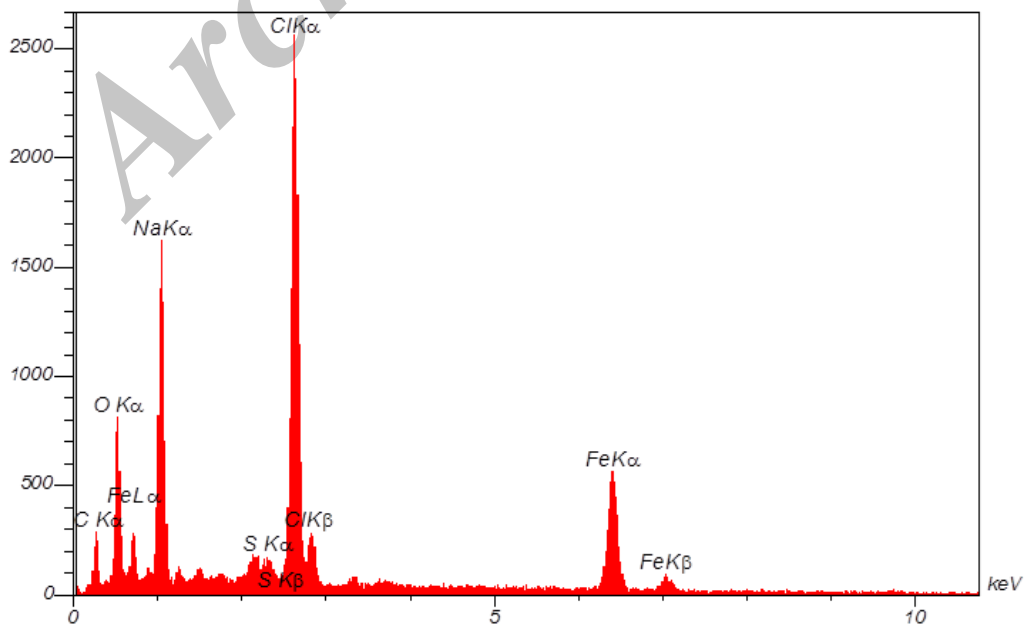
این امر بیانگر شکل پذیری نانو ذرات اکسید آهن توسط باکتری مورد نظر می باشند. به منظور بررسی و مطالعه اندازه، شکل و ریخت نانو ذرات ساخته شده از دستگاه SEM استفاده گردید. در شکل ۲ تصاویر SEM از نانو ذرات تولید شده در چهار بزرگنمایی ۱۰ kx، ۷۵ kx، ۱۰۰ kx و ۲۰۰ kx آورده شده است. همانطور که مشاهده می شود نحوه توزیع، شکل هندسی و ابعاد ذرات در تصاویر به خوبی مشخص هستند. نانو ذرات از یکنواختی در توزیع اندازه و شکل برخوردار می باشند. این ذرات عمدتاً کروی شکل بوده و متوسط اندازه ذرات نانو ذرات



شکل ۱: الگوی پراش اشعه ایکس نانوذرات تولیدی توسط باکتری سودوموناس جداسازی شده خاک سرخ جزیره هرمز.



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) از نانو ذرات تولید شده توسط باکتری سودوموناس جداسازی شده از خاک سرخ جزیره هرمز در چهار بزرگنمایی.



شکل ۳: آزمون EDX نانو ذرات تولید شده توسط باکتری سودوموناس جداسازی شده از خاک سرخ جزیره هرمز.

کننده نانو ذرات آهن صورت گرفت.

با توجه به این که نانو ذرات آهن جذب نوری ۵۰۰ تا ۵۵۰ نانومتر دارند، همانطور که در نمودار ۱ نشان داده است مشخصه باند جذب تشدید پلاسمون سطحی در ۵۵۰ نانومتر برای نانو ذرات آهن صورت گرفته است. بنابراین وجود پیک در محدوده ۵۰۰-۵۵۰ نانومتر با استفاده دستگاه طیف سنج فرابنفش، گامی در جهت ثابت کردن تولید نانو ذرات آهن توسط باکتری سودوموناس می‌باشد. همچنین در شکل ۱ الگوهای پراش اشعه ایکس نشان داده شده است. این الگوها در پیک‌های شاخص بیانگر تولید نانو ذرات اکسید آهن توسط باکتری مورد نظر می‌باشند. پس می‌توان نتیجه گرفت که نانو ذرات آهن Fe_3O_4 به طور موفقیت‌آمیزی توسط باکتری تولید شده است.

بر اساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) در شکل ۲ بیشتر نانو ذرات آهن تولید شده تقریباً کروی هستند و توزیع اندازه نسبتاً باریکی دارند. به طوری که تقریباً تمامی ذرات کوچکتر از ۵۰ نانومتر هستند. آوادیس یانس (Avadisians) و همکاران در سال ۲۰۱۲ باکتری‌های مگنتوتاکیک تولید کننده نانو ذرات آهن را از خاک معدن آهن زنجان جداسازی کردند. همچنین با کمک کریستالوگراف‌های اشعه X (XRD) نوع نانو ذرات سنتز شده توسط باکتری را Fe_3O_4 گزارش نمودند (۳۰). فراهانی (Farahani) و همکاران در سال ۲۰۱۵ باکتری‌های مغناطیسی تولید کننده نانو ذرات آهن را در مناطق مختلف ایران شناسایی و جداسازی کردند (۳۳). همچنین در مطالعه حاضر، آنالیز عنصری EDX وجود آهن در نانو ذرات تولیدی را تایید نمود. بنابراین باکتری سودوموناس جداسازی و شناسایی شده از خاک جزیره هرمز قادر به تولید نانو ذرات آهن می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سنتز نانو ذرات آهن با استفاده از باکتری‌های موجود در خاک بدون نیاز به صرف انرژی زیاد و مواد گران قیمت می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که باکتری سودوموناس به عنوان یک عامل زنده می‌تواند در تولید نانو ذرات به ویژه در مصارف پزشکی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

در این مطالعه باکتری مورد نظر پس از خالص سازی و با روش مولکولی به عنوان گونه سودوموناس شناخته شد. اوزا (Oza) و همکاران در سال ۲۰۱۲ یک گونه از باکتری سودوموناس که توانایی تولید نانو ذرات اکسید آهن را داشت جداسازی نمودند (۱۳). همچنین میرهندی (Mirhendi) و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که باکتری سودوموناس استوتزری (*Pseudomonas stutzeri*) قادر به تولید نانو ذرات مگنتیت اکسید روی می‌باشند (۳۱).

باکتری شناسایی شده از خاک جزیره هرمز گرم منفی بود که با یافته‌های پیشین در مورد باکتری‌های مگنتوتاکیک کاملاً مطابقت دارد. باکتری‌های تولید کننده نانو ذرات آهن شناسایی شده توسط بزیلینسکی (Bazyliniski) و همکاران در سال ۲۰۰۴ همگی گرم منفی بودند (۳۲). همچنین این یافته‌ها با نتایج مطالعه آوادیس یانس (Avadisians) و همکاران در سال ۲۰۱۲ و فراهانی (Farahani) و همکاران در سال ۲۰۱۵ مطابقت دارد که همگی گرم منفی بودند (۳۰ و ۳۳).

بزیلینسکی (Bazyliniski) و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که نانو ذرات آهن سنتزی توسط این باکتری‌ها درون سلولی بوده و به شکل مگنتوزوم مشاهده شدند (۳۲). نمودار ۱ پیک طیف جذبی نانو ذرات آهن تولید شده توسط باکتری را نشان می‌دهد. در اثر احیای یون‌های آهن و تولید نانو ذرات، نمونه‌ها از زرد کم‌رنگ به رنگ قهوه‌ای متمایل به قرمز و در انتها به سیاه تبدیل شد که با منابع هم خوانی داشت و نشان دهنده تولید سوسپانسیون کلوئیدی نانو ذرات آهن بود. به منظوراتبات وجود نانو ذرات آهن در نمونه‌ها، طیف UV-Vis از آنها تهیه شد.

یکی از جالب‌ترین ویژگی‌های نانو ذرات آهن تغییر خواص نوری آنها می‌باشد که متناسب با شکل و اندازه نانو ذرات تغییر می‌کند. در نانو ذرات آهن تشدید پلاسمون سطحی مسئول خواص نوری منحصر به فرد آنها می‌باشد که تحت تاثیر عواملی مانند اندازه نانو ذرات، شکل، فاصله آنها از یکدیگر و میزان ضریب شکست محیط پیرامون تغییر می‌کند (۳۴).

تشکر و قدردانی

اسلامی واحد کرمان به دلیل همکاری شایسته در انجام پژوهش

نویسندگان این مقاله از معاون محترم پژوهشی دانشگاه آزاد کمال امتنان را دارند.

References

1. Iravani S. Bacteria in nanoparticle synthesis: current status and future prospects. Int Sch Res Notices. 2014; 2014:1-18.
2. Quester K, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. Micron. 2013; 54-55:1-27.
3. Yan L, Zhang S, Chen P, Liu H, Yin H, Li H. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. Microbiol Res 2012; 167(9): 507-519.
4. Park J, Kadasala NR, Abouelmagd SA, Castanares MA, Collins DS, Wei A, Yeo Y. Polymer-iron oxide composite nanoparticles for EPR-independent drug delivery. Biomaterials. 2016; 101: 285-295.
5. Kandasamy G, Maity D. Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. Int J Pharm. 2015; 496(2): 191-218.
6. Wang Z, Qiao R, Tang N, Lu Z, Wang H, Zhang Z, Xue X, Huang Z, Zhang S, Zhang G, Li Y. Active targeting theranostic iron oxide nanoparticles for MRI and magnetic resonance-guided focused ultrasound ablation of lung cancer. Biomaterials. 2017; 127: 25-35.
7. Ahmad B, Hafeez N, Bashir S, Rauf A, Mujeeb ur R. Phytofabricated gold nanoparticles and their biomedical applications. Biomed Pharmacother. 2017; 89: 414-425.
8. Revathy T, Jayasri MA, Suthindhiran K. Chapter 3 - Antimicrobial magnetosomes for topical antimicrobial therapy A2 - Grumezescu, Alexandru Mihai. Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: William Andrew Publishing; 2016. p. 67-101.
9. Karimi Z, Abbasi S, Shokrollahi H, Yousefi G, Fahham M, Karimi L, Firuzi O. Pegylated and amphiphilic Chitosan coated manganese ferrite nanoparticles for pH-sensitive delivery of methotrexate: Synthesis and characterization. Mater Sci Eng: C. 2017; 71:504-511.
10. Shaterabadi Z, Nabiyouni G, Soleymani M. High impact of in situ dextran coating on biocompatibility, stability and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. Mater Sci Eng C. 2017; 75:947-956.
11. Asmathunisha N, Kathiresan K. A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. Colloids Surf B Biointerfaces. 2013; 103: 283-287.
12. Mahvi AH, Rahmani Boldaji M, Dobaradaran S. Evaluating the performance of iron nano-particle resin in removing fluoride from water. Water Wastewater. 2011; 21: 33-37. [In Persian]
13. Oza G, Pandey S, Shah R, Sharon M. Extracellular fabrication of silver nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa* and its antimicrobial assay. Adv Appl Sci Res. 2012; 3(3): 1776-1783.

14. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci.* 2010; 156(1): 1-13.
15. Konishi Y, Ohno K, Saitoh N, Nomura T, Nagamine S. Microbial synthesis of gold nanoparticles by metal reducing bacterium. *Trans Mater Res Soc Jpn.* 2004; 29: 2341-2343.
16. Love Lonnie J, Yearly LW, Moon JW, Phelps J, Rondinone AJ. Characterization of bio-synthesized magnetic nanoparticles. *Advanced Intelligent Mechatronics Proceedings*, Monterey, CA, United States, 2005.
17. Schleifer KH, Schüler D, Spring S, Weizenegger M, Amann R, Ludwig W, Köhler M. The genus *Magnetospirillum* gen. nov. Description of *Magnetospirillum gryphiswaldense* sp. nov. and transfer of *Aquaspirillum magnetotacticum* to *Magnetospirillum magnetotacticum* comb. nov. *Syst Appl Microbiol.* 1991; 14(4): 379-385.
18. Blakemore R. Magnetotactic bacteria. *Science.* 1975; 190: 377-379.
19. Matsunaga T, Sakaguchi T, Tadakoro F. Magnetite formation by a magnetic bacterium capable of growing aerobically. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1991; 35(5): 651-655.
20. 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): 2780-2787.
21. Bharde A, Wani A, Shouche Y, Joy PA, Prasad BLV, Sastry M. Bacterial aerobic synthesis of nanocrystalline magnetite. *J Am Chem Soc.* 2005; 127(26): 9326-9327.
22. Roh Y, Vali H, Phelps TJ, Moon JW. Extracellular synthesis of magnetite and metal-substituted magnetite nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; 6(11): 3517-3520.
23. Watson JHP, Ellwood DC, Soper AK, Charnock J. Nanosized strongly-magnetic bacterially-produced iron sulfide materials. *J Magn Magn Mater.* 1999; 203(1-3): 69-72.
24. Liu Y, Gao M, Dai S, Peng K, R. J. Characterization of magnetotactic bacteria and their magnetosomes isolated from Tieshan iron ore in Hubei Province of China. *Mat Sci Eng.* 2006; 26(4): 597-601.
25. Garrity G, Staley JT, Boone DR, De Vos P, Goodfellow M, Rainey FA, Schleifer K-H, Brenner DJ, Krieg NR. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria*. Springer Science & Business Media; 2006.
26. Nakagawa T, Shimada M, Mukai H, Asada K, Kato I, Fujino K, Sato T. Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR. *Appl Envir Microbiol.* 1994; 60(2): 637-640.
27. Gallego V, García MT, Ventosa A. *Methylobacterium adhaesivum* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from drinking water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56(2): 339-342.
28. Molina MC, González N, Bautista LF, Sanz R, Simarro R, Sánchez I, Sanz JL. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation.* 2009; 20(6): 789-800.
29. Zhou W, He W, Zhang X, Yan S, Sun X, Tian X, Han X. Biosynthesis of iron phosphate nanopowders. *Powder Technol.* 2009; 194(1): 106-108.

30. Avadisians S, Salouti M, SoltanDalal MM, Bakhtiari R. Isolation of iron nanoparticle-producing magnetotactic bacteria from Arjin ore in Zanzan Province, Iran. J Sch Pub Health Inst Pub Health Res. 2012; 10(1):33-42. [In Persian]
31. Mirhendi M., Emtiazi G, Roghanian R. Antibacterial activities of nano magnetite ZnO produced in aerobic and anaerobic condition by *Pseudomonas stutzeri*. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(10): e10254.
32. Bazylinski DA, Frankel RB. Magnetosome formation in prokaryotes. Nat Rev Micro. 2004; 2 (3): 217-230.
33. Farahani S, Akhavan Sepahi A, matin LF. Isolation of magnetotactic bacteria from different regions of Iran and identification of iron nanoparticles synthesized within their. Biotechnol Tarbiat Modares Uni. 2015; 6: 1-10. [In Persian]
34. Yin H, Langford R, Burrell R. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of ACTICOAT antimicrobial barrier dressing. J Burn Care Res. 1999; 20(3): 195-200.

Archive of SID



Study ability of the bacteria isolated from the red soils of the Hormuz island in the production of iron nanoparticles

Zinab Pourreza¹, Mohammad Mehdi Motaghi²

¹M.Sc., Department of Microbiology, Kerman branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

²Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Iron magnetic nanoparticles have been widely studied for biological, medical as well as industrial applications. The physical and chemical synthesis methods currently used to produce nanoparticles cause environmental contamination. Certain bacteria are capable of synthesizing significant amounts of iron nanoparticles, quite in conformity with the principles of green chemistry. The objective of this study was to isolate and identify iron nanoparticle-producing bacteria from soils of Hormuz Island, Iran.

Materials & Methods: This cross-sectional study was carried out with soil sampling from the Hormuz Island. Following serial dilution, culturing and purification in a combined solid agar culture medium, biochemical and molecular tests were used to identify bacteria. The properties of nanoparticles produced by bacteria were studied using UV-Vis spectroscopy, X-ray crystallography (XRD) and scanning electron microscope (SEM).

Results: The presence of *Pseudomonas* sp. was confirmed using biochemical characteristics, sequencing, and blasting the obtained sequences in NCBI database in the Hormuz Island soil. UV-Vis spectrometry and XRD graphs proved the presence of iron nanoparticles produced by bacteria. Furthermore, SEM images showed the size of nanoparticles as less than 50 nm.

Conclusion: The results of this study highlighted the adequacy of *Pseudomonas* isolated from the Hormuz Island soil in iron nanoparticle bio-synthesis as a cost-effective method, without any need for high energy expenditure. Therefore, the use of this bacterium as a useful biological source for large scale synthesis of iron nanoparticles is recommended through further studies.

Keywords: Iron nanoparticle, Biosynthesis, *Pseudomonas*, Hormuz island.

Correspondence to: Mohammad Mehdi Motaghi

Tel: +98 9133410026

E-mail: motaghi.mehdi@gmail.com

Journal of Microbial World 2017, 10(2): 123-133.