Research Article
Nova Biologica Reperta 9(3): 182-192 (2022)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.9.3.182

مقاله پژوهشی
یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۹، شماره ۳، صفحات ۱۸۲ الی ۱۹۲ (۱۴۰۱)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

سنتز برون سلولی سبز نانوذرات Fe_2O_3 توسط سویه باکتری بومی آبزی آلکالیژنز NV06

مراحم آشنگرف و نسترن وکیلی سهرفروزانی
گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
مسئول مکاتبات: مراحم آشنگرف، m.ashengroph@uok.ac.ir

چکیده. در پژوهش حاضر از باکتری‌های آبزی به عنوان زیست کاتالیزگر برای تبدیل زیستی $FeCl_3$ به نانو ذرات Fe_2O_3 استفاده شد. در مجموع ۲۵ سویه باکتری آبزی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار غنی شده با ۱۰میلی مولار $FeCl_3$ بر اساس تکنیک غنی‌سازی جداسازی شد. در بین سویه‌های باکتری‌های مورد آزمایش، تنها سویه NV06 قادر به سنتز برون سلولی نانوذرات Fe_2O_3 بود که در نهایت بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و مولکولی به‌عنوان *Alcaligenes* sp. strain NV06 مورد شناسایی قرار گرفت. سنتز برون سلولی نانوذرات آهن تولید شده توسط این سویه، تحت شرایط بهینه واکنش مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات سنتز شده توسط سویه باکتریایی NV06، به‌وسیله تجزیه و تحلیل‌های *طیف* سنجی UV-Vis، تجزیه و تحلیل‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی، آزمون طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس و طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز تعیین خصوصیت شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که نانوذرات میله‌ای اکسید آهن توسط عصاره عاری از سلول باکتری مذکور، در دمای بهینه ۲۸ درجه سانتیگراد، pH بهینه برابر ۶ و در غلظت ۱۰ میلی‌مولار $FeCl_3$، به مدت ۹۶ ساعت گرماگذاری در دور شیکر rpm ۱۵۰، با میانگین اندازه ابعاد طولی ۸۰/۲ نانومتر و میانگین قطری ۲۵/۵ نانومتر تولید می‌شوند. در این پژوهش، برای نخستین بار سنتز برون سلولی نانوذرات اکسیدآهن فریک با اندازه مطلوب از طریق استراتژی عصاره عاری از سلول در سرده *Alcaligenes* گزارش شد. امید است نتایج این پژوهش بتواند ظرفیت‌های بالقوه میکروب‌های آبزی به‌عنوان زیست کاتالیزگرهای ایمن، ساده و مؤثر در تولید نانوذرات Fe_2O_3 را معرفی نماید.

واژه‌های کلیدی. باکتری آبزی، زیست کاتالیزگر، طیف سنجی، عصاره عاری از سلول، نانو اکسیدآهن فریک

Green extracellular synthesis of the Fe_2O_3 nanoparticles by a native marine bacterium, *Alcaligenes* sp. strain NV06

Morahem Ashengroph & Nastaran Vakili Sohrforouzani
Department of Biological Science, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
Correspondent author: Morahem Ashengroph, m.ashengroph@uok.ac.ir

Abstract. This study investigated the potential of aquatic bacteria for their ability as a biocatalyst to synthesized Fe2O3 nanoparticles using iron precursor, FeCl3. A total of 25 aquatic bacterial strains were isolated in trypticase soy agar plus 10 mM FeCl3 with selective enrichment technique. Among the bacterial strains evaluated, NV06 was the only strain able to synthesize Fe2O3 nanoparticles extracellularly. The strain NV06 was identified as *Alcaligenes* sp., on the basis of phenotypic and molecular characteristics. Extracellular synthesis of Fe2O3 nanoparticles by this strain was investigated under the optimal conditions. The biosynthesized Fe2O3 nanoparticles were characterized using UV–visible spectrophotometry (UV-Vis), Scanning electron microscopy (SEM), Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The results showed that cell-free extract (CFE) of the bacterium strain can produce the rod-shaped Fe2O3 nanoparticles with mean edge lengths of 80.2 nm and mean diameters of 25.5 nm, after being exposed to FeCl3 solution (10 mM), at an optimum pH of 6 and an optimum temperature of 28 °C, after 96 hours of incubation at 150 rpm. This is the first report on the extracellular biosynthesis of Fe2O3 nanoparticles using the genus of *Alcaligenes* under the CFE strategy. It could be speculated that the results of the study can hopefully introduce the inherent capabilities of aquatic microbes as safe, simple, and effective biocatalysts in the production of Fe2O3 nanoparticles.

Key words. aquatic bacterium, biocatalyst, cell-free extract, ferric oxide nanoparticle, spectroscopy

Received 25.03.2021/ Revised 09.01.2022/ Accepted 31.01.2022/ Published 21.12.2022
دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۰۵/اصلاح: ۱۴۰۰/۱۰/۱۹/ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۱/انتشار: ۱۴۰۱/۰۹/۳۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]
[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]

مقدمه

نانوذرات فلزی به دلیل اندازه، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بی‌نظیر خود، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. هنگامی که اندازه مواد در حد نانو کاهش می‌یابد، ذرات حاصل خصوصیات ویژه‌ای از جمله خواص مکانیکی، مغناطیسی، حرارتی، نوری، الکترونیک، بار و انرژی سطحی، نسبت سطح به حجم و پایداری فیزیولوژیک از خود بروز می دهند (Pat-Espadas & Cervantes, 2018; Abo-zeid & Williams, 2019). تاکنون روش‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی شامل ذوب مکانیکی، نانولیتوگرافی، فرسایش لیزر، اسپاترینگ (sputtering)، تجزیه حرارتی، سل‌ژل، رسوب بخار شیمیایی و *پیرولیزیز* برای سنتز نانوذرات فلزی استفاده شده است (Jeevanandam et al., 2016; Ealias & Saravanakumar, 2017). گرچه روش‌های سنتز فیزیکی و شیمیایی نتایج امیدوارکننده‌ای با مورفولوژی‌های مختلف نانوذرات برای کاربردهای مختلف نشان داده‌اند، اما همچنان گران قیمت و دارای مواد شیمیایی خطرناک هستند. این اشکالات منجر به ظهور روش‌های سنتز سبز بر اساس استفاده از مواد سازگار با محیط زیست مانند میکروارگانیسم ها و عصاره‌های گیاهی شده است (Jeevanandam et al., 2016). سنتز زیستی یک رویکرد سبز و سازگار با محیط‌زیست برای سنتز نانوذرات غیرسمی و غیرقابل تجزیه است. گرچه فرایندهای زیستی با مشکلاتی از قبیل دوره زمانی طولانی (به‌دلیل کشت میکروب‌ها)، توزیع اندازه و تبلور، مشکل در کنترل شکل و غیره همراه هستند، اما این روش‌ها به علت بی‌خطر و ارزان بودن، پایداری و سازگاری با محیط زیست برای تولید نانوذرات بسیار مناسب هستند (Dinali et al., 2017). طی‌سال‌های اخیر، پیشرفت فناوری نانو دانشمندان را ترغیب به سنتز نانومواد مانند فلزات، اکسیدهای فلزی، نیمه هادی‌ها و مواد ترکیبی کرده است. در بین نانوذرات فلزی، به طور خاص، نانوذراتاکسیدآهن به دلیل ساختار و ویژگی‌های منحصربه‌فرد، فعالیت‌های کاتالیزوری بالا و واکنش‌پذیری ذاتی بالا علاقه زیادی را به استفاده در تصویربرداری، تحویل دارویی، تحویل ژنی، جداسازی مغناطیسی سلول‌های ایمنی، کاربردهای مهندسی بافت، پیشگیری از عفونت ایمپلنت ارتوپدی، حذف آرسنیک، اصلاح محیط زیست، تصفیه فاضلاب، انواع حسگرها و کاتالیز جلب کرده‌اند (Arias et al., 2018). درحال‌حاضر، مسیرهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی مختلفی برای سنتز نانوذرات اکسید آهن وجود دارد. مسیرهای سنتز شیمیایی می‌توانند از طریق هم‌رسوبی محلول‌های آبی آهن فرو و فریک، روش میکروامولسیون، سنتز هیدروترمال، رسوب الکتروشیمیایی و روش‌های سونوشیمی انجام شوند. مسیرهای سنتز فیزیکی از طریق ذرات معلق در هوا، رسوب فاز گازی، تجزیه پرتوهای ناشی از لیزر و استخراج توپ پودری نانوذرات را انجام می‌شوند (Sharaf et al., 2019). همچنین، روش‌های زیستی به واسطه باکتری‌ها، قارچ‌ها، عصاره‌های جلبکی و گیاهی موجب تولید نانوذرات اکسید آهن می‌شوند. فناوری نانو سبز، بویژه سنتز میکروبی نانوذرات مغناطیسی به دلیل کم هزینه بودن، کنترل خوب بر روی خواص مغناطیسی و حرارتی ذرات، کنترل اندازه ذرات از ۱۰ تا ۱۰۰ نانومتر و اشباع مغناطیسی بالاتر آن در مقایسه با روش‌های سنتز شیمیایی و فیزیکی ارجحیت بالاتری دارند (Sundaram et al., 2012). اگرچه از سویه‌های باکتری و قارچی مختلف مانند *Actinobacter*، *Aquaspirillum magnetotacticum*، *Magnetospirillum magnetotacticum*، *Shewanella*، *Geobacter*، *Thermoanaerobacter*، *Archaeoglobus fulgidus*، *Aspergillus japonicus*، *Alternaria alternat*، *Aspergillus niger*، *E. coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به‌طور موفقیت آمیزی برای سنتز زیستی نانوذرات اکسید آهن استفاده شده است (Bharde et al., 2008; Revati & Pandey, 2011; Bhargava et al., 2013; Abdeen et al., 2016; Crespo et al., 2017)، با این حال مطالعات محدودی در ارتباط با سنتز نانوذرات اکسید آهن توسط میکروارگانیسم‌های آبزی صورت گرفته است. میکروارگانیسم‌های ساکن در زیستگاه‌های آبزی به دلیل توانایی‌های منحصر به فرد تحمل زندگی در محیط‌های افراطی مانند pH اسیدی، محیط نمکی افراطی، عناصر غذایی کم، مقدار زیاد فلز و غیره، به عنوان ثروت‌های طبیعت برای طیف گسترده‌ای از کاربردهای زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Soosani et al., 2021). زیست‌بوم‌های آبی، یکی از منابع بسیار غنی دارای فلور میکروبی مناسب برای بیوسنتز نانومواد هستند که راه‌های تازه‌ای را برای استفاده از میکروارگانیسم‌های آبی در تولید نانوذرات پیش رو قرار داده است (Baker et al., 2013; Ashengroph & Sahami-Soltani, 2018). با توجه به مزایای ذکر شده در مورد استفاده از میکروارگانیسم‌های آبزی در تولید زیستی نانومواد، پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتری آبزی با قابلیت سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید آهن (مگنتیت) تحت استراتژی سلول در حال استراحت و بررسی برخی پارامترهای موثر از جمله دما، pH و زمان انکوباسیون بر روی سنتز نانوذرات نانوذرات مگنتیت انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، غنی سازی و جداسازی سویه‌های باکتری آبزی

نمونه‌های آب سطحی از سارال دیواندره، استان کردستان، غرب ایران در ظرف‌های استریل جمع‌آوری شد. نمونه‌های آب

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]
[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]

جمع‌آوری شده در ظرف‌های استریل ریخته شد و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای یخچال تا هنگام استفاده نگهداری شدند. ۵ میلی لیتر از نمونه‌های آب جمع‌آوری شده به لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل انتقال داده شد و در ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی را دور ریخته و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از مایع تحتانی به محیط‌های کشت استریل تریپتیک سوی آگار (TSA) غنی شده با ۱۰ میلی مولار $FeCl_3.6H_2O$ (با خلوص بالای ۹۹ درصد و خریداری شده از شرکت سیگما-آلدریچ) افزوده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه‌گذاری شدند. جدایه‌های خالص باکتری با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی مشخص شدند. سویه‌های باکتری غنی شده به‌عنوان بیوکاتالیست جهت آزمایشات مربوط به سنتز زیستی نانوذرات Fe_2O_3 استفاده شد (Ashengroph & Hosseini, 2021).

سنتز برون سلولی نانوذرات Fe_2O_3 توسط سویه‌های باکتری آبزی جداسازی شده تحت استراتژی عصاره عاری از سلول (Cell free extract=CFE)

سویه‌های باکتری در ارلن‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مدور (۱۵۰ دور در دقیقه)، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه‌گذاری شد. سپس ۱ درصد از سوسپانسیون باکتری‌های تهیه شده (با غلظت معادل نیم مک فارلند cell/ml 10^8) را در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر مدور (۱۵۰ دور در دقیقه)، به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. برای جدا کردن توده زیستی باکتری از سانتریفیوژ یخچالی با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. پس از سه بار شستشو با آب دوبار تقطیر استریل، ۱۵ گرم از توده زیستی مذکور در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استریل بود، ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتوردار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دور شیکر ۱۵۰rpm قرار داده شد. پس از طی دوره گرماگذاری، توده زیستی باکتری با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و از عصاره عاری از توده زیستی باکتری (CFE) به‌عنوان بیوکاتالیست برای تبدیل زیستی $FeCl_3$ به نانو اکسید آهن Fe_2O_3 استفاده شد. برای این منظور به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از CFE باکتری، محلول استوک $FeCl_3.6H_2O$ با غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتیگراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm انکوبه گذاری شد. به‌طور همزمان از محلول $FeCl_3$ (بدون تلقیح عصاره عاری از کشت باکتری) و عصاره عاری از سلول (بدون حضور$FeCl_3$) به‌عنوان محیط‌های کنترل منفی استفاده شد (Ashengroph et al., 2020). ویژگی نانو ذرات Fe_2O_3 تشکیل شده در واکنش، مورد تجزیه و تحلیل چشمی از طریق بررسی تغییر رنگ مخلوط واکنش زیست تبدیلی و اسپکتروفتومتری مرئی ماورای بنفش (مدل Specord 210، شرکت Analytikjena، کشور آلمان) قرار داده شد (Chauhan & Upadhyay, 2019).

تعیین هویت ریخت شناسی و ملکولی سویه باکتری آبزی NV06

بررسی اولیه ریخت شناسی سویه باکتری NV06 با استفاده از رنگ آمیزی گرم و مشاهده مورفولوژی به کمک میکروسکوپ نوری انجام داد. از مشاهدات میکروسکوپ الکترونی روبشی برای تایید ریخت‌شناسی سلول باکتری استفاده شد. سپس خصوصیات فیزیولوژیکی و تست‌های بیوشیمیایی مختلف طبق دستورالعمل برگی سنجیده شد (Bergey & Holt, 1994). برای انجام آزمون کاتالاز از *آب اکسیژنه* ۳ درصد (حجمی/حجمی) استفاده شد. برای انجام تست اکسیداز از دیسک اکسیداز حاوی تترامتیل پارافنیل دی آمین دی هیدروکلراید استفاده شد. از محیط کشت نیمه جامد SIM برای بررسی حرکت باکتری، تولید سولفید هیدروژن و تست اندول (بررسی حضور آنزیم تریپتوفاناز) استفاده شد. توانایی استفاده از نشاسته (تولید آمیلاز) در محیط کشت نشاسته آگار، توانایی استفاده از اوره (تولید اوره آز) در محیط کشت اوره آگار و همچنین توانایی ذوب ژلاتین (آنزیم ژلاتیناز) در محیط ژلاتین انجام شد. رشد در دماهای مختلف در محیط کشت تریپتیک سوی براث و آگار انجام شد. رشد بر روی منابع کربوهیدراتی شامل گلوکز، فروکتوز، مانوز و آرابینوز در محیط آبگوشتی فنل رد براث انجام شد. استخراج DNA ژنومی سویه باکتری NV06 به روش فنل-کلروفرم انجام شد (Murray & Thompson, 1980). از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک پرایمرهای همگانی ژن برای تکثیر ژن 16S rDNA انجام شد. برای این منظور، از پرایمرهای همگانی ژن 16S rDNA Fd1 (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و Rp2 (5′-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′) استفاده شد (Weisburg et al., 1991). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر با حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، یک میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت اولیه ۲۵ میکرومولار)، یک میکرولیتر DNA الگو (با غلظت ۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]
[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]

دیونیزه سترون انجام شد. چرخه حرارتی به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای۹۵ درجه سانتی‌گراد شروع و در ادامه بصورت ۳۰ چرخه حرارتی شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به‌مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۲ درجه به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به‌مدت دو دقیقه و در نهایت یک سیکل پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Bereswill et al., 1995). پس از تخلیص محصول PCR توسط کیت تخلیص DNA، محصول نهایی جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. توالی‌های به‌دست آمده پس از ویرایش توسط نرم افزار BioEdit با توالی-های موجود در بانک اطلاعات ژن (NCBI) با استفاده از ابزار جستجوی بلاست مقایسه گردید. برای رسم درخت فیلوژنیک، توالی ژن 16S rDNA سویه باکتری مورد نظر با توالی‌های 16S rDNA سایر باکتری‌های مشابه موجود در بانک ژن از طریق الگوریتم BLASTN مقایسه شد. تجزیه و تحلیل و رسم درخت فیلوژنیک به روش الحاق همسایگان (Neighbor Joining) با استفاده از نرم افزار MEGA ورژن 7.0 و تجزیه و تحلیل بوت استرپ ۱۰۰۰ با هدف تخمین قابل اطمینان وابستگی سویه‌ها انجام شد (Kumar et al., 2016).

بهینه سازی سنتز برون سلولی نانوذرات Fe_2O_3 توسط سویه باکتری NV06 تحت استراتژی CFE

با هدف بهبود سنتز برون سلولی نانوذرات سنتزی Fe_2O_3 توسط عصاره عاری از سلول سویه باکتری NV06 تاثیر فاکتورهای مختلف شامل اثر دماهای مختلف (۲۴، ۲۸، ۳۲، ۳۶ و ۴۰ درجه سانتیگراد)، اثر pH های مختلف (۵، ۶، ۷ و ۸) و در نهایت با هدف تعیین بهترین زمان واکنش زیست تبدیلی، اثرات دوره انکوباسیون شامل ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ساعت بر روی سنتز خارج سلولی نانوذرات Fe_2O_3 در محیط زیست تبدیلی تحت شرایط دمای بهینه و pH بهینه به‌دست آمده از مراحل قبل بررسی شد (Chauhan & Upadhyay, 2019). جذب نمونه‌ها در محدوده مربوط به پیک جذبی نانوذرات خارج سلولی Fe_2O_3 و با روش اسپکتروفتومتری گرفته شد و مورد مقایسه قرار گرفت. همه آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت.

تعیین خصوصیت طیف سنجی و میکروسکوپی نانوذرات تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی تحت شرایط بهینه شده

تایید اولیه سنتز خارج سلولی نانوذرات Fe_2O_3 تحت استراتژی CFE، از طریق مشاهدات چشمی (تغییر رنگ محلول واکنش $FeCl_3$ پس از تیمار با عصاره عاری از سلول سویه باکتری آبزی NV06) و بررسی طیف‌های جذبی اسپکتروفتومتری (UV-vis spectrophotometer Specord 210, Germany) انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی مجهز به طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (*Field emission* scanning electron microscopy; TESCAN Mira 3-LMu, Czech Republic) با هدف بررسی شکل، اندازه و تجزیه و تحلیل‌های عنصری انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy; *Bruker Vector 22 FT–IR* Spectrometer) به منظور تعیین گروه‌های عاملی دخیل در سنتز و پایداری نانوذرات سنتزی استفاده شد. به منظور جداسازی و رسوب نانوذرات تشکیل شده از سانتریفیوژ با دور بالا (سرعت ۱۵۰۰۰ دور به یک ساعت) استفاده شد. نانوذرات رسوبی حاصل در دستگاه فریز درایر به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و سپس تجزیه و تحلیل‌های طیف سنجی و میکروسکوپی ذکر شده بر روی آنها صورت گرفت (Bolbanabad et al., 2020).

نتایج

جداسازی سویه‌های باکتری آبزی با قابلیت سنتز خارج سلولی نانوذرات Fe_2O_3

پس از جمع‌آوری نمونه‌های آب سطحی از سارال دیواندره، از تکنیک غنی سازی کشت برای جداسازی سویه‌های باکتری آبزی با قابلیت تحمل پذیری کلریدآهن هگزاهیدرات استفاده شد. در این راستا، محیط کشت تریپتیک سوی آگار غنی شده با ۱۰ میلی مولار $FeCl_3$ به عنوان محیط غنی کننده استفاده شد. در مجموع ۲۵ سویه باکتری آبزی (متفاوت از نظر ریخت شناسی) جداسازی شد. بعد از چندبار کشت دادن متوالی و به‌دست آوردن کلنی تک، از خالص‌سازی سویه‌ها اطمینان حاصل شد. سویه‌های باکتری غربال‌گری شده در محیط کشت تریپتیک سوی براث رشد داده شدند و پس از تهیه عصاره عاری از سلول این سویه‌ها که در بخش مواد و روش ها توضیح داده شده است، از این استراتژی برای سنتز برون سلولی نانوذرات Fe_2O_3 استفاده شد. براساس نتایج به‌دست آمده تنها عصاره عاری از سویه باکتری NV06 قادر به سنتز برون سلولی نانوذرات Fe_2O_3 بود که با استفاده از مشاهدات چشمی و طیف سنجی جذبی مشخص شد. براساس مشاهدات چشمی $FeCl_3$ تیمار نشده با عصاره عاری از سلول (محیط کنترل) دارای رنگ زرد است، این در حالی است که در نمونه تیمار شده با عصاره عاری از سلول سویه باکتری NV06 رنگ محلول واکنش به سبب تشکیل نانوذرات Fe_2O_3 به رنگ قرمز آجری تیره تغییر رنگ داده است. بررسی نمونه‌ها با

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]
[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]

اسپکتروفتومتری یک پیک جذبی را در طول موج ۴۰۳ نانومتر نشان داد که براساس منابع معتبر بیشینه پیک جذبی نانوذرات Fe_2O_3 در طول موج های ۴۰۲ و ۴۱۵ نانومتر است (Jagathesan & Rajiv, 2018). در محیط کنترل هیچ پیک جذبی مرتبط با رزنانس پلاسمون سطحی نانوذرات Fe_2O_3 مشاهده نشده است (شکل ۱).

تعیین هویت سویه باکتری منتخب NV06

سویه باکتری آبزی NV06 که براساس تجزیه و تحلیل‌های چشمی و طیف سنجی جذبی قابلیت تبدیل زیستی $FeCl_3$ را به نانوذرات Fe_2O_3 را دارا بود، انتخاب و براساس ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و ملکولی مورد شناسایی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، سویه باکتری مذکور از نظر واکنش گرم بصورت گرم منفی و از نظر مورفولوژی بصورت اشکال میله‌ای شکل با میانگین ابعاد ۰/۵۵ تا ۱ میکرون از نظر طول و ۰/۲۵ تا ۰/۶ میکرون از نظر عرض است (شکل ۲).

در ادامه و با انجام تست‌های بیوشیمیایی مشخص شد که سویه باکتری مذکور از نظر تست‌های اکسیداز، کاتالاز، مصرف سیترات و استات مثبت و از نظر تست‌های احیای نیترات، تست اندول، تست تولید سولفید هیدروژن، فعالیت بتاگالاکتوزیدازی، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز اوره و ذوب ژلاتین منفی بود. سویه باکتری مذکور قابلیت رشد در دماهای ۴ تا ۳۵ درجه سانتیگراد را دارا بود. براساس نتایج آزمون های ریخت شناسی و بیوشیمیایی و بر طبق کتاب‌های مرجع و مقالات منتشره در این ارتباط (Van Trappen et al., 2005)، سویه باکتری NV06 به طور موقت به عنوان سویه‌ای متعلق به سرده آلکالیژنس (*Alcaligenes*) تشخیص داده شد. در ادامه و با هدف تعیین هویت دقیق سویه باکتری منتخب، ژن 16S rDNA از طریق پرایمرهای همگانی fd1 و rp2 با روش PCR تکثیر گردید. نتایج حاصل از بلاست در سایت NCBI نشان داد که سویه باکتری مذکور دارای شباهت ۹۹/۷ درصدی با گونه باکتری *Alcaligenes aquatilis* LMG 22996 (شماره دسترسی در بانک ژنی JX986974) است. درخت فیلوژنتیک سویه باکتری NV06 به روش الحاق همسایگان رسم شد که وابستگی جدایه باکتری را در بین گونه های مختلف سرده آلکالیژنس نشان داد (شکل ۳). براساس نتایج به‌دست آمده، سویه باکتری NV06 متعلق به سرده آلکالیژنس و از نظر قرابت ژنتیکی بیشترین مشابهت را با *Alcaligenes aquatilis* دارد. در نهایت سویه باکتری مذکور تحت نام *Alcaligenes* sp. strain NV06 در بانک اطلاعات ژنی با شماره دسترسی MT920647 ثبت شد.

تاثیر فاکتورهای مختلف بر روی سنتز برون سلولی نانوذرات Fe2O3 توسط عصاره عاری از سلول باکتری *Alcaligenes* sp. strain NV06

اثر دماهای مختلف بر روی سنتز نانوذرات Fe_2O_3 تحت استراتژی عصاره عاری از سلول مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده بیشینه جذب نانوذرات Fe_2O_3 در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در غلظت ۱۰ میلی مولار $FeCl_3$ تحت pH برابر ۷ و دور شیکر ۱۵۰ rpm بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری حاصل شد. در دماهای بالاتر از ۲۸ درجه سانتی‌گراد نرخ تبدیل زیستی پیش ساز $FeCl_3$ به نانوذرات Fe_2O_3 کاهش یافته است. به عبارت دیگر دمای بهینه برای تولید نانوذرات مذکور، دمای ۲۸ درجه سانتیگراد است (شکل ۴).

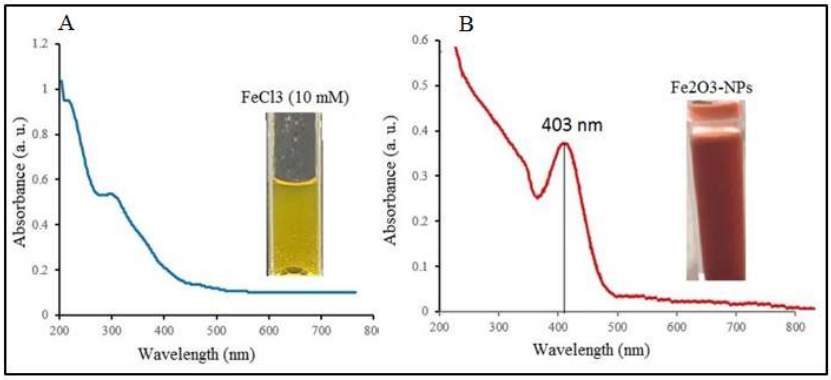
نتایج حاصل از تاثیر pHهای مختلف بر روی سنتز خارج سلولینانوذرات Fe_2O_3 در شکل (۵) نشان داده شده است. براساس نتایج به‌دست آمده بیشترین سنتز نانوذرات Fe_2O_3 تحت دمای بهینه ۲۸ درجه سانتیگراد و در غلظت ۱۰ میلی مولار $FeCl_3$ در pH برابر ۶ به‌دست آمد. در pH های بالاتر از ۶ نرخ تبدیل زیستی $FeCl_3$ به نانوFe_2O_3 کاهش یافته است. به عبارت دیگر بیشترین راندمان سنتز نانوذرات مذکور در pH برابر ۶ به‌دست آمده است.

با هدف بهبود تبدیل زیستی $FeCl_3$ به نانوذرات Fe_2O_3 تحت شرایط بهینه به‌دست آمده در مراحل قبل واکنش (دمای بهینه ۲۸ درجه سانتیگراد و pH بهینه برابر ۶)، اثر زمان انکوباسیون (۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت) مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۶). براساس نتایج به‌دست آمده، سنتز نانوذرات Fe_2O_3 پس از ۲۴ ساعت واکنش در حضور عصاره عاری از سلول آغاز و پس از ۹۶ ساعت به حداکثر مقدار خود رسیده است. به عبارت دیگر بیشترین طیف جذبی نانوذرات تشکیل شده در واکنش زیست تبدیلی پس از ۹۶ ساعت مشاهده شده است. در فاصله زمانی بین ۹۶ تا ۱۲۰ ساعت یک کاهش تدریجی در طیف جذبی نانوذرات Fe_2O_3 مشاهده شد.

آزمون‌های میکروسکوپی و طیف سنجی نانوذرات Fe_2O_3 سنتز شده از طریق استراتژی عصاره عاری از سلول

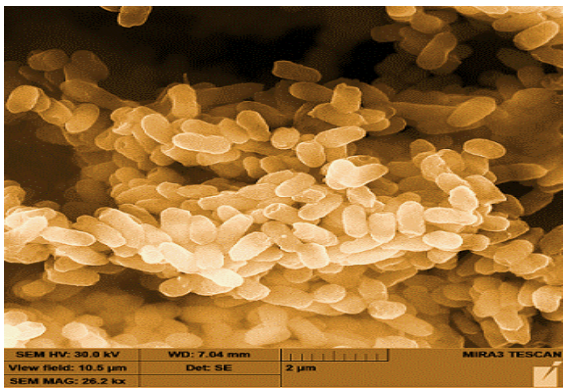
نانوذرات Fe_2O_3 سنتزی بوسیله عصاره عاری از سلول باکتری *Alcaligenes* sp. strain NV06 تحت شرایط بهینه، پس از استخراج و خشک کردن توسط دستگاه فریز درایر، جهت تعیین شکل ظاهری و دامنه پراکنش ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی FESEM مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۷). بررسی ساختار سطحی نانوذرات تولیدی توسط میکروسکوپ الکترونی FESEM، سنتز نانوذرات Fe_2O_3 میله ای شکل با میانگین ابعاد طولی ۸۰/۲ نانومتر و میانگین قطری ۲۵/۵ نانومتر را نشان داد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]
[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]



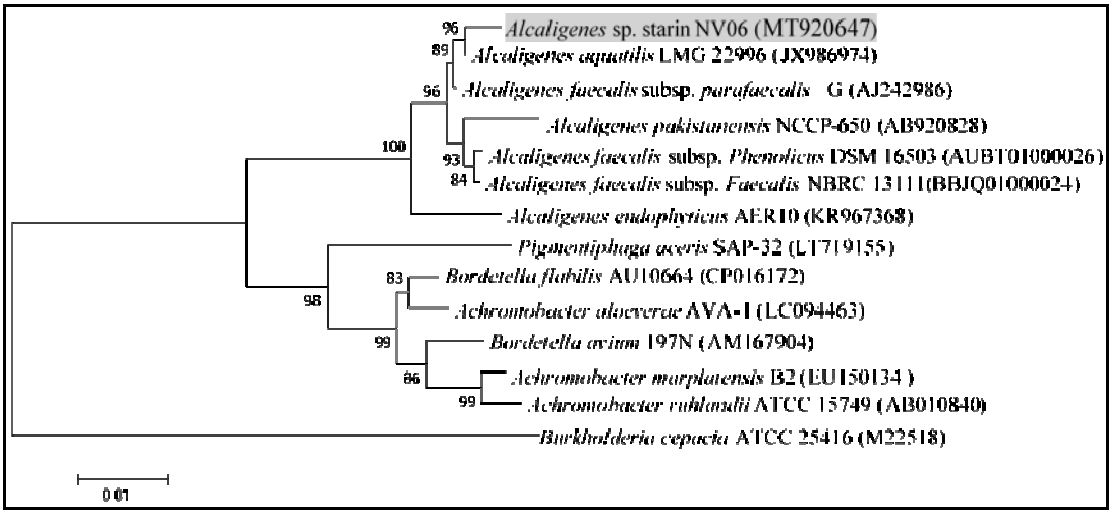
شکل ۱- مشاهدات چشمی و تجزیه و تحلیل‌های اسپکتروفتومتری محلول $FeCl_3$ در غلظت ۱۰ میلی مولار تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتیگراد و دور شیکر ۱۵۰rpm پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در محیط کنترل (**A**: تیمار نشده با عصاره عاری از سلول) و واکنش زیست تبدیلی (**B**: تیمار شده عصاره عاری از سلول).

Figure 1. Visual observation and UV-vis spectra of the $FeCl_3$ solution (10 mM) in the control sample (**A**: untreated with CFE) and bioconversion reaction (**B**: treated with CFE) of after 48 h incubation at 25 ºC on a shaker at 150 rpm.



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM سویه باکتری *Alcaligenes* sp. NV06.

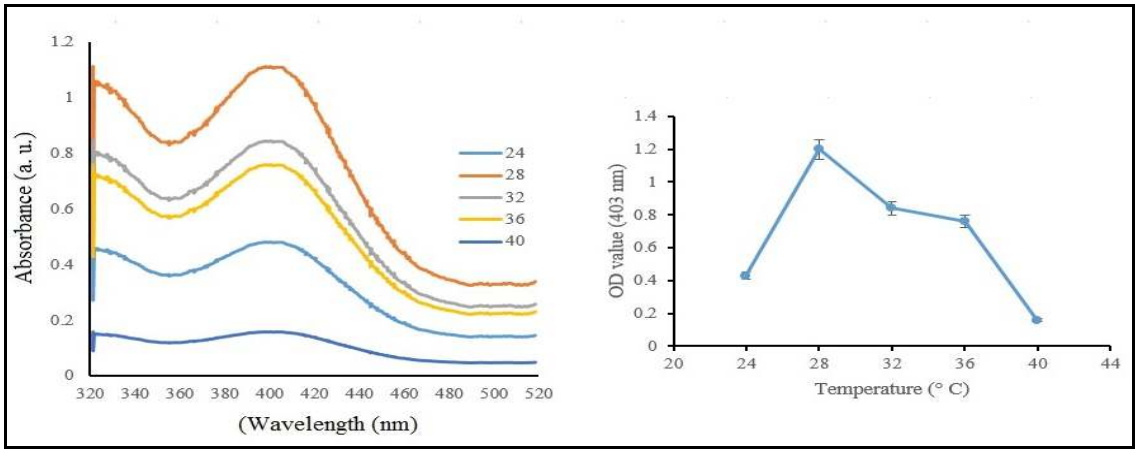
Figure 2. SEM micrograph of the *Alcaligenes* sp. strain NV06.



شکل ۳- درخت فیلوژنی رسم شده براساس توالی ژنی 16S rRNA که وابستگی سویه باکتری NV06 را با سویه‌های باکتری متعلق به گونه‌های مختلف متعلق به سرده آلکالیژنس را نشان می دهد. شماره دسترسی در بانک ژن متعلق به گونه‌های انتخاب شده در داخل پرانتز آورده شده است.

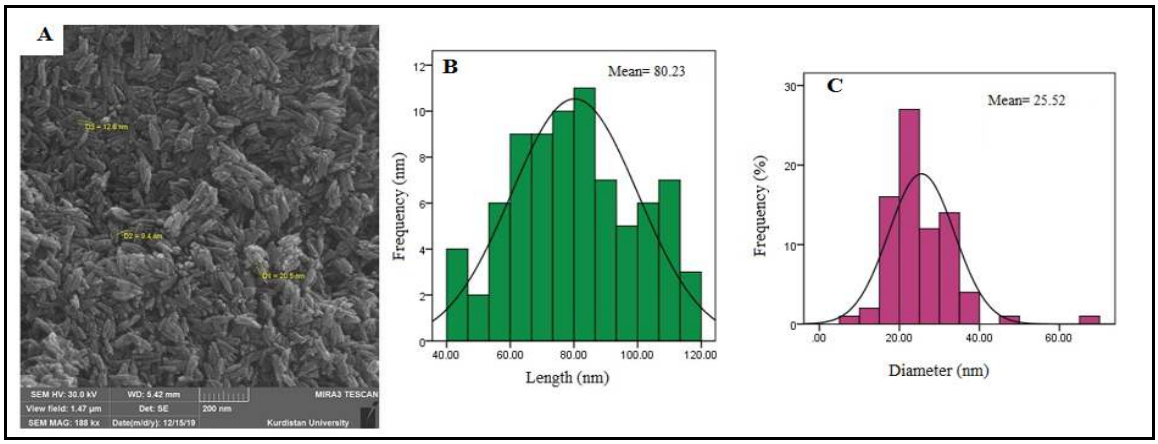
Figure 3. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of the bacterium strain NV06 within the genus *Alcaligenes*. GeneBank accession numbers are indicated in parentheses.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]
[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]



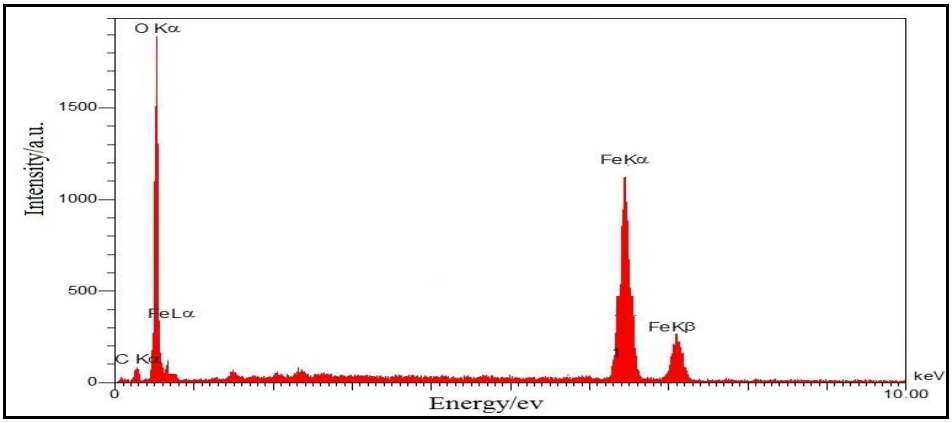
شکل ۴- طیف های جذبی اسپکتروفتومتری مرتبط با اثر دماهای مختلف بر روی سنتز خارج سلولی نانوذرات Fe_2O_3 در واکنش حاوی عصاره عاری از سلول *Alcaligenes* sp. strain NV06 تیمار شده با $FeCl_3$ در غلظت ۱۰ میلی مولار. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار ±۱ معرف انحراف معیار است.

Figure 4. UV-visible absorption spectra of extracellular Fe_2O_3 nanoparticles synthesized at varying temperatures under CFE of *Alcaligenes* sp. strain NV06 treated with $FeCl_3$ (10 mM). Results represent the means of three separate experiments, and bars ±1 indicate standard deviation.



شکل ۷- A. تصاویر حاصل از FESEM. **B** و **C**. هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات برون سلولی مگنتیت تولیدی تحت استراتژی عصاره عاری از سلول.

Figure 7. **A.** FESEM images. **B** and **C**. histogram of particle size distribution of magnetite nanoparticles synthesized by cell-free extract strategy.

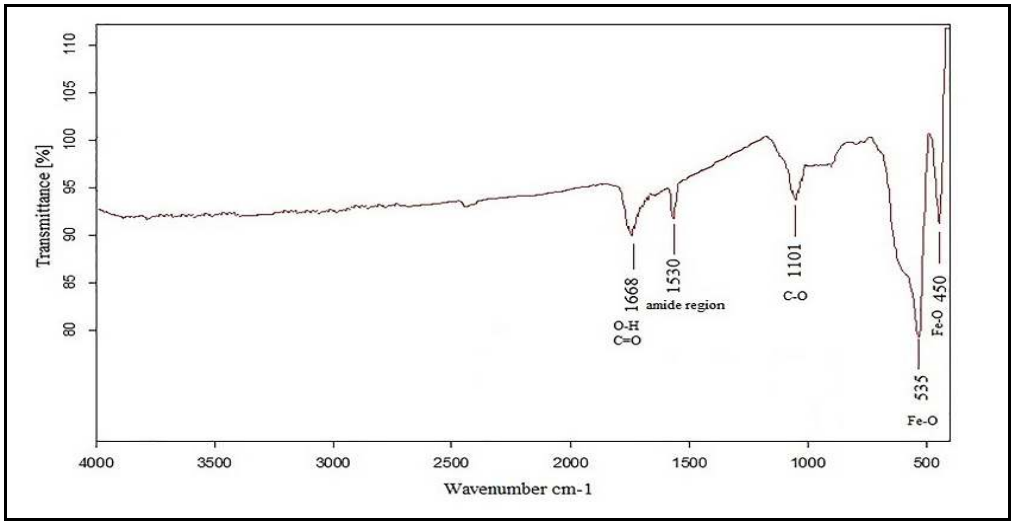


شکل ۸- طیف EDX نانوذرات برون سلولی Fe_2O_3 تولیدی بوسیله عصاره عاری از سلول باکتری *Alcaligenes* sp. strain NV06.

Figure 8. Energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) of extracellular magnetite nanoparticles synthesized by CFE of *Alcaligenes* sp. strain NV06.

.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]
[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]



شکل ۹- نتایج FTIR نانوذرات Fe_2O_3 سنتز شده بوسیله عصاره عاری از سلول باکتری *Alcaligenes* sp. strain NV06.

Figure 9. FTIR (Fourier-transform Infrared Spectroscopy) of F_2O_3 nanoparticles synthesized by CFE of *Alcaligenes* sp. strain NV06.

در ادامه به منظور تحلیل ساختاری و عنصری نانوذرات سنتزی، آزمون به طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDX) انجام گرفت (شکل ۸). نتایج حضور پیک‌های مربوط به عناصر آهن و اکسیژن موجود در نانوذرات Fe_2O_3 را نشان داد.

در ادامه و با هدف بررسی گروه‌های عاملی پوشاننده (Capping agent) دخیل در سنتز و پایداری نانوذرات Fe_2O_3 سنتزی، طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) انجام شد (شکل ۹). بر طبق مشخصه‌یابی طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، پیک‌هایی در محدوده‌های cm^{-1} ۱۶۶۸، ۱۵۳۰، ۱۱۰۱، ۵۳۵ و ۴۵۰ نمایان شده است. پیک‌های مربوط به ترتیب متعلق به گروه‌های هیدروکسیل یا کربونیل (OH- و C=O)، گروه‌های آمیدی (N-C=O)، گروه‌های C-O کششی و تشکیل باندهای Fe-O مربوط به نانوذرات Fe2O3 است. به عبارت دیگر گروه‌های مختلف کربوکسیلی، کربونیلی یا آمیدی موجود در عصاره عاری از سلول باکتری به عنوان عوامل پوشاننده در سنتز نانوذرات مذکور نقش داشته‌اند (Rajeshwari et al., 2014).

بحث

نانوذرات به دلیل کاربردهای گسترده آن‌ها در زمینه‌های علوم پزشکی، دستگاه‌های الکترونیکی، کاتالیزورها و غیره، در جامعه علمی بسیار مورد توجه هستند. تولید زیستی نانوذرات در محدوده یک تا صد نانومتر و تحت تأثیر پارامترهای مختلفی از جمله دما، pH محلول، ساختار مورفولوژیکی واکنش‌دهنده‌ها، زمان واکنش و غیره قرار دارد (Singh et al., 2018). بیوسنتز نانوذرات اکسید آهن در اندازه‌ها و شکل‌های مختلف با استفاده از باکتری‌ها، قارچ‌ها و عصاره‌های گیاهی گزارش شده است. محققین پس از آن‌که *Actinobacter* را در معرض $FeCl_3$ به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در انکوباتور قرار دادند، موفق به تولید نانوذراتی از آهن شدند که تمایل داشتند به صورت خوشه‌ای کنار هم قرار بگیرند. نانوذراتی که اندازه هر کدام به تنهایی۵-۷ نانومتر بود (Bharde et al., 2008). محققین دیگر، طی یک سنتز سبز تک مرحله‌ای از نانوذرات آهن با استفاده از پلی‌فنول‌های چای *Camellia sinensis*، بدون استفاده از سورفاکتانت یا پلیمرها به‌عنوان عوامل احیاءکننده یا پوشاننده، موفق به تولید نانوذرات آهن به شکل کروی و در اندازه ۱۵-۵ نانومتر شدند (Hoag et al., 2009). محققین دیگر توانستند سنتز برون سلولی نانوذرات اکسیدآهن را با استفاده از سویه قارچی *Aspergillus japonicus* انجام دهند. ذرات تولید شده توسط آن‌ها مکعبی شکل با ابعاد ۷۰- ۶۰ نانومتر بود (Bhargava et al., 2013). برخی محققین با استفاده از عصاره برگ ریحان مقدس *Ocimum sanctum*، از تیره نعناعیان، نانوذراتی تولید کردند که با مطالعات SEM به صورت تجمع یافته نشان داده شدند و در مطالعات TEM، اندازه این نانوذرات زیر ۲۰ نانومتر بود (Balamurughan et al., 2014). همچنین، برخی محققین با استفاده از قارچ *Alternaria alternat* نانوذراتی به شکل مکعب‌هایی با اندازه ۵/۴ تا ۱۲/۱ نانومتر تولید کردند که برای این نانوذرات آهن، خواص ضدباکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مانند *Bacillus Subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* نیز گزارش کردند (Mohamed

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]
[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]

et al., 2015). سنتز نانوذرات فلزی توسط میکروارگانیسم‌ها می‌تواند هم به صورت داخل سلولی و هم به شکل خارج سلولی انجام شود. سنتز درون سلولی به صورت انتقال یون‌ها به داخل سلول میکروبی و خارج سلولی به صورت به دام انداختن یون‌های فلزی روی سطح سلول است. سنتز برون سلولی نانوذرات فلزی در مقایسه با سنتز داخل سلولی، آسان‌تر و مقرون به صرفه‌تر است (Ashengroph & Sahami-Soltani, 2018; Ashengroph et al., 2020). به دلیل کاربرد و اهمیت نانوذرات خارج سلولی و کارایی گسترده آن‌ها در زمینه‌های مختلف، در پژوهش حاضر، به آزمایش و بررسی توانایی بیوسنتز نانوذرات اکسیدآهن فریک توسط باکتری‌های آبزی جداسازی شده پرداخته شد. میکروارگانیسم‌های آبزی مانند باکتری‌ها، سیانوباکترها، اکتینوباکترها، مخمرها و قارچها سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی هستند که در محیط‌های آبی مانند دریاها و اقیانوس‌ها زندگی می‌کنند. این موجودات، به‌عنوان فاکتورهای زیستی بالقوه برای تولید داخل سلولی و خارج سلولی نانوذرات محسوب می‌شوند. از طرفی نکته حائز اهمیت در بیوسنتز نانوذرات با استفاده از میکروارگانیسم‌های آبزی، ایمن و بی‌خطر بودن آن‌هاست، چراکه برای انسان غیر بیماری‌زا هستند. همچنین اکوسیستم‌های آبی یک منبع عالی برای استخراج میکروارگانیسم‌های متحمل فلز هستند. زیرا فلزات مختلفی از طریق فعالیت‌های آتشفشانی، فرسایش سنگ‌ها، فعالیت‌های انسانی مانند راه‌اندازی صنایع، معادن، کشاورزی، فاضلاب‌های شهری و غیره به سیستم‌های آبی وارد می‌شوند و باکتری‌ها به تدریج خود را برای زندگی در این شرایط تطبیق می‌دهند (Manivasagan et al., 2016). در پژوهش حاضر، بیوسنتز موفقیت آمیز نانوذرات اکسیدآهن فریک (Fe_2O_3) با استفاده از یک روش سازگار با محیط زیست، اقتصادی، سریع و مبتنی بر رویکرد شیمی سبز ارائه شده است. سویه NV06 از سرده باکتری آبزی آلکالیژنس، با پتانسیل بیوسنتز نانوذرات آهن، از آب‌های سطحی شهرستان دیواندره استان کردستان ایران جداسازی و طی چندین آزمایش شناسایی شد. توانایی‌های ویژه باکتری‌های آبزی، در تحمل محیط‌های افراطی، منجر به ایجاد مکانیسم‌هایی برای مقابله با شرایطی مانند حضور در محیط‌هایی با غلظت بالای یون‌های آهن، در این موجودات شده است. این مکانیسم‌های مقاومتی که برای حفظ حیات باکتری‌های ضروری است، در نهایت منجر به تولید نانوذرات مورد نظر می‌شود. شواهد به‌دست آمده در این پژوهش، حاکی از توانایی سویه مذکور در تولید خارج سلولی نانوذرات اکسیدآهن فریک است. به‌طور کلی سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید آهن فریک تولید شده، از طریق ترشح خارج سلولی آنزیم‌های موجود در سویه NV06 و یا ترشح متابولیت‌های ثانویه حادث می‌شود. از دستاوردهای حاصل از این پژوهش می توان به معرفی سویه باکتری NV06 متعلق به سرده آلکالیژنس در سنتز برون سلولی نانوذرات اکسید آهن فریک (مگنتیت) تحت استراتژی عصاره عاری از سلول و بررسی فاکتورهای موثر در بیوسنتز نانوذرات مگنتیت با هدف دست‌یابی به نانوذرات همگن‌تر و همچنین افزایش راندمان تولید اشاره نمود. امید است این پژوهش ضمن کمک به گسترش استفاده از سنتز میکروبی در تولید نانوذرات آهن، منبع قابل اطمینانی برای استفاده از ظرفیت‌های بالقوه سویه‌های باکتری‌های آبزی بومی استان کردستان و به طور خاص سویه NV06، به عنوان زیست کاتالیزگرهای ایمن، ساده و مؤثر در تولید نانوذرات آهن در مقیاس‌های بزرگتر از مقیاس آزمایشگاهی باشد.

سپاسگزاری

این مقاله پژوهشی با حمایت مالی دانشگاه کردستان اجراشده است که بدینوسیله، نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

REFERENCES

Abdeen, M., Sabry, S., Ghozlan, H., El-Gendy, A.A. & Carpenter, E.E. 2016. Microbial-physical synthesis of Fe and Fe_3O_4 magnetic nanoparticles using *Aspergillus niger* YESM1 and supercritical condition of ethanol. Journal of Nanomaterials 2016: 1-7.

Abo-zeid, Y. & Williams, G.R. 2019. The potential anti-infective applications of metal oxide nanoparticles: A systematic review. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology 12: 1-36.

Arias, L., Pessan, J., Vieira, A., Lima, T., Delbem, A. & Monteiro, D. 2018. Iron oxide nanoparticles for biomedical applications: A perspective on synthesis, drugs, antimicrobial activity, and toxicity. Antibiotics 7: 1-32.

Ashengroph, M. & Sahami-Soltani, M. 2018. Antimicrobial effects of extracellular copper sulfide nanoparticles synthesized from *Bacillus licheniformis*. Journal of Microbial World 11: 243-257.

Ashengroph, M., Khaledi, A. & Bolbanabad, E.M. 2020. Extracellular biosynthesis of cadmium sulphide quantum dot using cell-free extract of *Pseudomonas chlororaphis* CHR05 and its antibacterial activity. Process Biochemistry 89: 63-70.

Ashengroph, M. & Hosseini, S.R. 2021. A newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SRB04 for the synthesis of selenium nanoparticles with potential antibacterial properties. International Microbiology 24: 103-114.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]
[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]

Baker, S., Harini, B.P., Rakshith, D. & Satish, S. 2013. Marine microbes: invisible nanofactories. Journal of Pharmacy Research 6: 383-388.

Balamurughan, M.G., Mohanraj, S., Kodhaiyolii, S. & Pugalenthi, V. 2014. *Ocimum sanctum* leaf extract mediated green synthesis of iron oxide nanoparticles: spectroscopic and microscopic studies. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences 4: 201-204.

Bereswill, S., Bugert, P., Bruchmüller, I. & Geider, K. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. Applied and Environmental Microbiology 61: 2636-2642.

Bharde, A.A., Parikh, R.Y., Baidakova, M., Jouen, S., Hannoyer, B., Enoki, T., Prasad, B.L., Shouche, Y.S., Ogale, S. & Sastry, M. 2008. Bacteria-mediated precursor-dependent biosynthesis of superparamagnetic iron oxide and iron sulfide nanoparticles. Langmuir 24: 5787-5794.

Bhargava, A., Jain, N., Barathi, M., Akhtar, M.S., Yun, Y.S. & Panwar, J. 2013. Synthesis, characterization and mechanistic insights of mycogenic iron oxide nanoparticles. Nanotechnology for Sustainable Development 15: 337-348.

Bolbanabad, E.M., Ashengroph, M. & Darvishi, F. 2020. Development and evaluation of different strategies for the clean synthesis of silver nanoparticles using *Yarrowia lipolytica* and their antibacterial activity. Process Biochemistry 94: 319-328.

Chauhan, S. & Upadhyay, L.S.B. 2019. Biosynthesis of iron oxide nanoparticles using plant derivatives of *Lawsonia inermis* (Henna) and its surface modification for biomedical application. Nanotechnology for Environmental Engineering 4: 1-10.

Crespo, K.A., Baronetti, J.L., Quinteros, M.A., Páez, P.L. & Paraje, M.G. 2017. Intra- and extracellular biosynthesis and characterization of iron nanoparticles from prokaryotic microorganisms with anticoagulant activity. Pharmaceutical Research 34: 591-598.

Dinali, R., Ebrahiminezhad, A., Manley-Harris, M., Ghasemi, Y. & Berenjian, A. 2017. Iron oxide nanoparticles in modern microbiology and biotechnology. Critical Reviews in Microbiology 43: 493-507.

Ealias, A.M. & Saravanakumar, M.P. 2017. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 263: 032019.

Hoag, G.E., Collins, J.B., Holcomb, J.L., Hoag, J.R., Nadagouda, M.N. & Varma, R.S. 2009. Degradation of bromothymol blue by 'greener'nano-scale zero-valent iron synthesized using tea polyphenols. Journal of Materials Chemistry 19: 8671-8677.

Jagathesan, G. & Rajiv. P. 2018. Biosynthesis and characterization of iron oxide nanoparticles using *Eichhornia crassipes* leaf extract and assessing their antibacterial activity. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 13: 90-94.

Jeevanandam, J.. Chan, Y.S. & Danquah, M.K. 2016. Biosynthesis of metal and metal oxide nanoparticles. ChemBioEng Reviews 3: 55-67.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874.

Manivasagan, P., Nam, S.Y. & Oh, J. 2016. Marine microorganisms as potential biofactories for synthesis of metallic nanoparticles. Critical Reviews in Microbiology 42: 1007-1019.

Mohamed, Y.M., Azzam, A.M., Amin, B.H. & Safwat, N.A. 2015. Mycosynthesis of iron nanoparticles by *Alternaria alternata* and its antibacterial activity. African Journal of Biotechnology 14: 1234-1241.

Murray, M.G. & Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4326.

Pat-Espadas, A.M. & Cervantes, F.J. 2018. Microbial recovery of metallic nanoparticles from industrial wastes and their environmental applications. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 93: 3091-3112.

Rajeshwari, S., Pattanathu, K.S.M., Rahman, Rajiv, P., Narendhran, S. & Venckatesh, R. 2014. Biosynthesis and characterization of *Acalypha indica* mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity. Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Bimolecular Spectroscopy 129: 255-258.

Revati, K. & Pandey, B.D. 2011. Microbial synthesis of iron-based nanomaterials-A review. Bulletin of Materials Science 34: 191-198.

Sharaf, S.M., Abbas, H.S. & Ismaeil, T.A. 2019. Characterization of spirugenic iron oxide nanoparticles and their antibacterial activity against multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. Egyptian Journal of Phycology 20: 1-28.

Singh, J., Dutta, T., Kim, K.H., Rawat, M., Samddar, P. & Kumar, P. 2018. Green synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. Journal of Nanobiotechnology 16: 1-24.

Soosani, N., Ashengroph, M. & Chehri, Kh. 2021. Extracellular green synthesis of zinc oxide nanoparticle by using the cell-free extract *Rhodotorula pacifica* NS02 and investigation of their antimicrobial activities. Nova Biologica Reperta 8: 195-205. (In Persian)

Sundaram, P.A., Augustine, R. & Kannan, M. 2012. Extracellular biosynthesis of iron oxide nanoparticles by *Bacillus subtilis* strains isolated from *rhizosphere soil*. Biotechnology and Bioprocess Engineering 17: 835-840.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]
[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]

Van Trappen, S., Tan, T.L., Samyn, E. & Vandamme, P. 2005. *Alcaligenes aquatilis* sp. nov., a novel bacterium from sediments of the Weser Estuary, Germany, and a salt marsh on Shem Creek in Charleston Harbor, USA. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 2571-2575.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173: 697-703.

*****

How to cite this article:

Ashengroph, M. & Vakili Sohrforouzani, N. 2022. Green extracellular synthesis of the Fe_2O_3 nanoparticles by a native marine bacterium, *Alcaligenes* sp. strain NV06. Nova Biologica Reperta 9: 182-192. (In Persian).

آشنگرف، م. و وکیلی سهرفروزانی، ن. ۱۴۰۱. سنتز برون سلولی سبز نانوذرات Fe_2O_3 توسط سویه باکتری بومی آبزی آلکالیژنز NV06. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۹: ۱۹۲-۱۸۲.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1401.9.3.3.3]

[DOI: 10.52547/nbr.9.3.182]