

سنتز برون سلولی سبز نانوذرات Fe_2O_3 توسط سویه باکتری بومی آبی آلکالیزنز NV06

مراحم آشنگرف و نسترن وکیلی سهرفورزانی

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 آبی به عنوان زیست کاتالیزگر برای تبدیل زیستی FeCl_3 به نانو ذرات Fe_2O_3 استفاده شد. در مجموع ۲۵ سویه باکتری آبی در محیط کشت تریپتیک سوی آگار غنی شده با ۱۰ میلی 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 فوری 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 اکسید آهن فریک با اندازه مطلوب از طریق استراتژی عصاره عاری از سلول در سرده *Alcaligenes* گزارش شد. امید است نتایج این پژوهش بتواند ظرفیت‌های بالقوه میکروبی‌های آبی به‌عنوان زیست کاتالیزگرهای ایمن، ساده و مؤثر در تولید نانوذرات Fe_2O_3 را معرفی نماید.

واژه‌های کلیدی. باکتری آبی، زیست کاتالیزگر، طیف سنجی، عصاره عاری از سلول، نانو اکسید آهن 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 Fe_2O_3 nanoparticles using iron precursor, FeCl_3 . A total of 25 aquatic bacterial strains were isolated in trypticase soy agar plus 10 mM FeCl_3 with selective enrichment technique. Among the bacterial strains evaluated, NV06 was the only strain able to synthesize Fe_2O_3 nanoparticles extracellularly. The strain NV06 was identified as *Alcaligenes* sp., on the basis of phenotypic and molecular characteristics. Extracellular synthesis of Fe_2O_3 nanoparticles by this strain was investigated under the optimal conditions. The biosynthesized Fe_2O_3 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 Fe_2O_3 nanoparticles with mean edge lengths of 80.2 nm and mean diameters of 25.5 nm, after being exposed to FeCl_3 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 Fe_2O_3 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 Fe_2O_3 nanoparticles.

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

مقدمه

نانوذرات فلزی به دلیل اندازه، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی بی نظیر خود، بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. هنگامی که اندازه مواد در حد نانو کاهش می یابد، ذرات حاصل خصوصیات ویژه ای 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 روش های فیزیکی و شیمیایی مختلفی شامل ذوب مکانیکی، نانولیتوگرافی، فرسایش لیزر، اسپاترینگ (sputtering)، تجزیه حرارتی، سل ژل، رسوب بخار شیمیایی و پیرولیز برای سنتز نانوذرات فلزی استفاده شده است (Jeevanandam et al., 2016; Ealias & Saravanakumar, 2017). گرچه روش های سنتز فیزیکی و شیمیایی امیدوارکننده ای با مورفولوژی های مختلف نانوذرات برای کاربردهای مختلف نشان داده اند، اما همچنان گران قیمت و دارای مواد شیمیایی خطرناک هستند. این اشکالات منجر به ظهور روش های سنتز سبز بر اساس استفاده از مواد سازگار با محیط زیست مانند میکروارگانیسم ها و عصاره های گیاهی شده است (Jeevanandam et al., 2016). سنتز زیستی یک رویکرد سبز و سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذرات غیرسمی و غیرقابل تجزیه است. گرچه فرایندهای زیستی با مشکلاتی از قبیل دوره زمانی طولانی (به دلیل کشت میکروب ها)، توزیع اندازه و تبلور، مشکل در کنترل شکل و غیره همراه هستند، اما این روش ها به علت بی خطر و ارزان بودن، پایداری و سازگاری با محیط زیست برای تولید نانوذرات بسیار مناسب هستند (Dinali et al., 2017). طی سال های اخیر، پیشرفت فناوری نانو دانشمندان را ترغیب به سنتز نانومادی مانند فلزات، اکسیدهای فلزی، نیمه هادی ها و مواد ترکیبی کرده است. در بین نانوذرات فلزی، به طور خاص، نانوذرات اکسید آهن به دلیل ساختار و ویژگی های منحصر به فرد، فعالیت های کاتالیزوری بالا و واکنش پذیری ذاتی بالا علاقه زیادی را به استفاده در تصویربرداری، تحویل دارویی، تحویل ژنی، جداسازی مغناطیسی سلول های ایمنی، کاربردهای مهندسی بافت، پیشگیری از عفونت ایمپلنت ارتوپدی، حذف آرسنیک، اصلاح محیط زیست، تصفیه فاضلاب، انواع حسگرها و کاتالیز جلب کرده اند (Arias et al., 2018). در حال حاضر، مسیرهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی مختلفی برای سنتز نانوذرات اکسید آهن وجود دارد. مسیرهای سنتز شیمیایی می توانند از طریق هم رسوبی محلول های آبی آهن فرو و فریک، روش میکرومولسیون، سنتز هیدروترمال، رسوب الکتروشیمیایی و روش های 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 می شوند (Sharaf et al., 2019). همچنین، روش های زیستی به واسطه باکتری ها، قارچ ها، عصاره های جلبکی و گیاهی موجب تولید نانوذرات اکسید آهن می شوند. 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 روش های سنتز شیمیایی و فیزیکی ارجحیت بالاتری دارند (Sundaram et al., 2012). اگرچه از سویه های باکتری و قارچی مختلف مانند *Actinobacter* *Magnetospirillum* *Aquaspirillum magnetotacticum* *Geobacter* *Shewanella magnetotacticum* *Archaeoglobus fulgidus* *Thermoanaerobacter* *Alternaria alternat* *Aspergillus japonicus* *Pseudomonas aeruginosa* و *E. coli* *Aspergillus niger* به طور 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 میکروارگانیسم های آبی صورت گرفته است. میکروارگانیسم های ساکن در زیستگاه های آبی به دلیل توانایی های منحصر به فرد تحمل زندگی در محیط های افراطی مانند pH اسیدی، محیط نمکی افراطی، عناصر غذایی کم، مقدار زیاد فلز و غیره، به عنوان ثروت های طبیعت برای طیف گسترده ای از کاربردهای زیستی مورد استفاده قرار می گیرند (Soosani et al., 2021). زیست بوم های آبی، یکی از منابع بسیار غنی دارای فلور میکروبی مناسب برای بیوسنتز نانومواد هستند که راه های تازه ای را برای استفاده از میکروارگانیسم های 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 میکروارگانیسم های آبی در تولید زیستی نانومواد، پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی سویه های باکتری آبی 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 روش ها

نمونه برداری، غنی سازی و جداسازی سویه های باکتری آبی
نمونه های آب سطحی از سارال دیواندره، استان کردستان، غرب ایران در ظرف های استریل جمع آوری شد. نمونه های آب

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 تشیکل 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 آبی 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 برگه 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 پارافیل 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 برات و آگار انجام شد. رشد بر روی منابع کربوهیدراتی شامل گلوکز، فروکتوز، مانوز و آرابینوز در محیط آبگوشتی فنل رد برات انجام شد. استخراج DNA ژنومی سویه باکتری NV06 به روش فنل-کلروفرم انجام شد (Murray & Thompson, 1980). از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به کمک پرایمرهای همگانی ژن برای تکثیر ژن 16S rDNA انجام شد. برای این منظور، از پرایمرهای همگانی ژن 16S rDNA ($5'-\text{AGAGTTTGATCCTGGCTCAG}-3'$) و ($5'-\text{ACGGCTACCTTGTACGACTT}-3'$) Rp2 استفاده شد (Weisburg et al., 1991). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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

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 فالتکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل انتقال داده شد و در ۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ 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 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (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 آبی 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 برات 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 برات 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 سانتیفریوژ 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 ۱۵۰ rpm قرار داده شد. پس از طی دوره گرماگذاری، توده زیستی باکتری با استفاده از سانتیفریوژ 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 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ با غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتیگراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm

UV-vis) و بررسی طیف‌های جذبی اسپکتروفتومتری (NV06 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 سانتیفریوژ 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 آبی 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 آبی با قابلیت تحمل پذیری کلرید آهن 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 آبی (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 برای رشد داده شدند و پس از تهیه عصاره عاری از سلول این سویه‌ها که در بخش مواد و روش‌ها 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

دیونیزه سترون انجام شد. چرخه حرارتی به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد شروع و در ادامه بصورت ۳۰ چرخه حرارتی شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۲ درجه به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 توالی‌های 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 ۱۲۰ ساعت 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 آبی

تاثیر فاکتورهای مختلف بر روی سنتز برون سلولی نانوذرات Fe_2O_3 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 pHهای بالاتر از ۶ نرخ تبدیل زیستی FeCl_3 به نانوذرات Fe_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

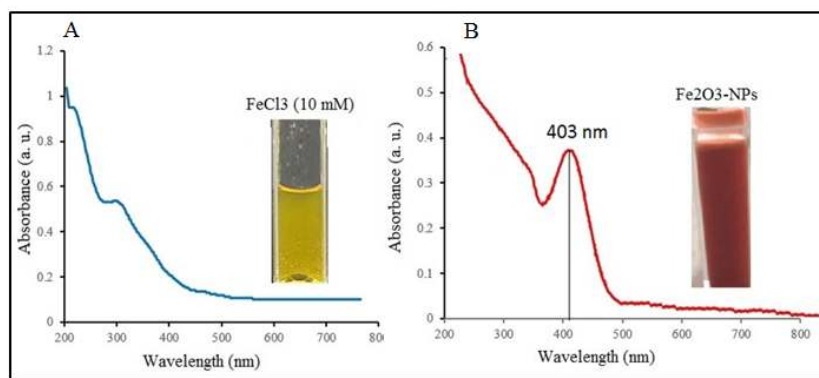
نانوذرات Fe_2O_3 سنتزی بوسیله عصاره عاری از سلول باکتری *Alcaligenes* sp. strain NV06 تحت شرایط بهینه، پس از استخراج و خشک کردن توسط دستگاه فریز درایر، جهت تعیین شکل ظاهری و دامنه پراکنش ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی FESEM مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۷). بررسی ساختار سطحی نانوذرات تولیدی توسط میکروسکوپ 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.

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

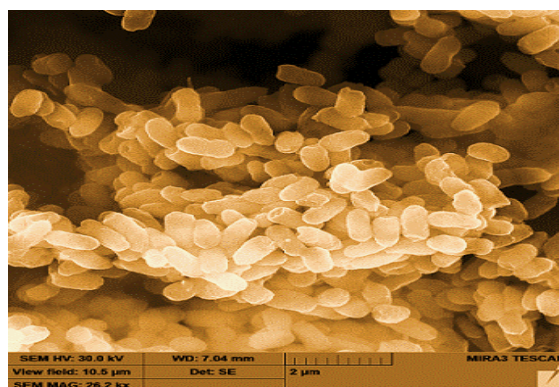
سویه باکتری آبی NV06 که براساس تجزیه و تحلیل‌های چشمی و طیف سنجی جذبی قابلیت تبدیل زیستی FeCl_3 را به نانوذرات Fe_2O_3 را دارا بود، انتخاب و براساس ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و ملکولی مورد شناسایی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، سویه باکتری مذکور از نظر واکنش گرم بصورت گرم منفی 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 سیتрат 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 شباهت 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.



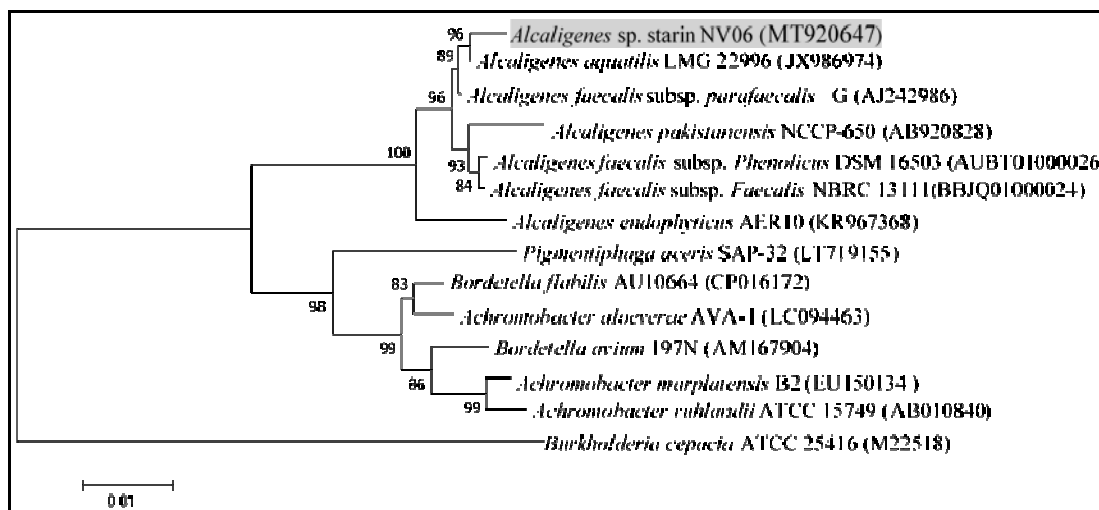
شکل ۱- مشاهدات چشمی و تجزیه و تحلیل‌های اسپکتروفتومتری محلول FeCl₃ در غلظت ۱۰ میلی مولار تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتیگراد و دور شیکر ۱۵۰ rpm پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در محیط کنترل (A: تیمار نشده با عصاره عاری از سلول) و واکنش زیست تبدیلی (B: تیمار شده عصاره عاری از سلول).

Figure 1. Visual observation and UV-vis spectra of the FeCl₃ 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 °C on a shaker at 150 rpm.



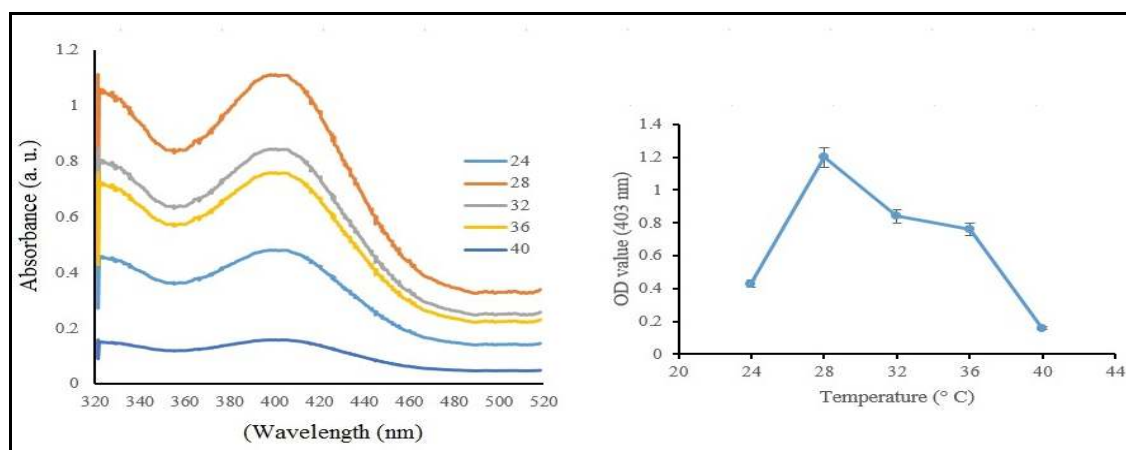
شکل ۲- تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM سویه باکتری *Alcaligenes* sp. NV06.

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



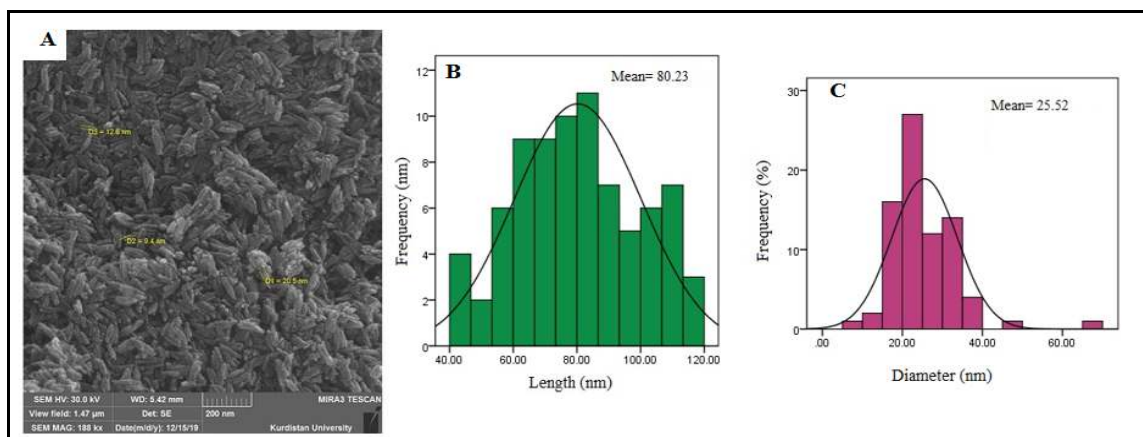
شکل ۳- درخت فیلوژنی رسم شده براساس توالی ژنی 16S rRNA که وابستگی سویه باکتری NV06 را با سویه‌های باکتری متعلق به گونه‌های مختلف متعلق به سرده آکالیژنس را نشان می‌دهد. شماره دسترسی در بانک ژن متعلق به گونه‌های انتخاب شده در داخل پرانتز آورده شده است.

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.



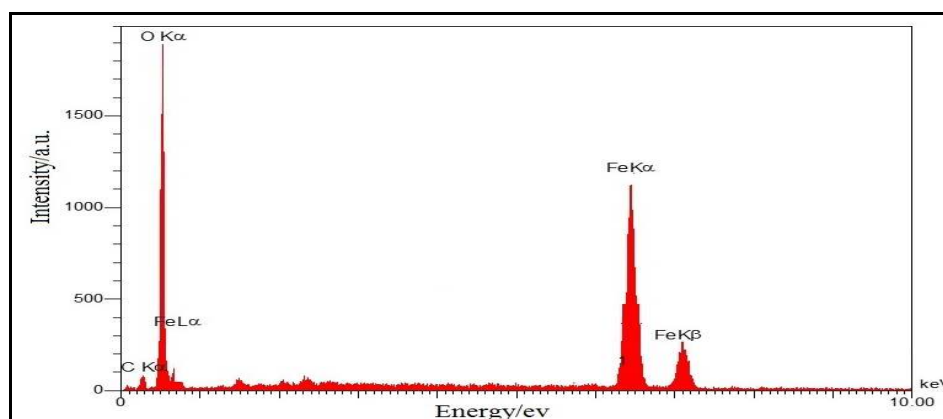
شکل ۴- طیف های جذبی اسپکتروفتومتری مرتبط با اثر دماهای مختلف بر روی سنتز خارج سلولی نانوذرات Fe_2O_3 در واکنش حاوی عصاره عاری از سلول *Alcaligenes* sp. strain NV06 تیمار شده با FeCl_3 در غلظت ۱۰ میلی مولار. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و با ± 1 معرف انحراف معیار است.

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.



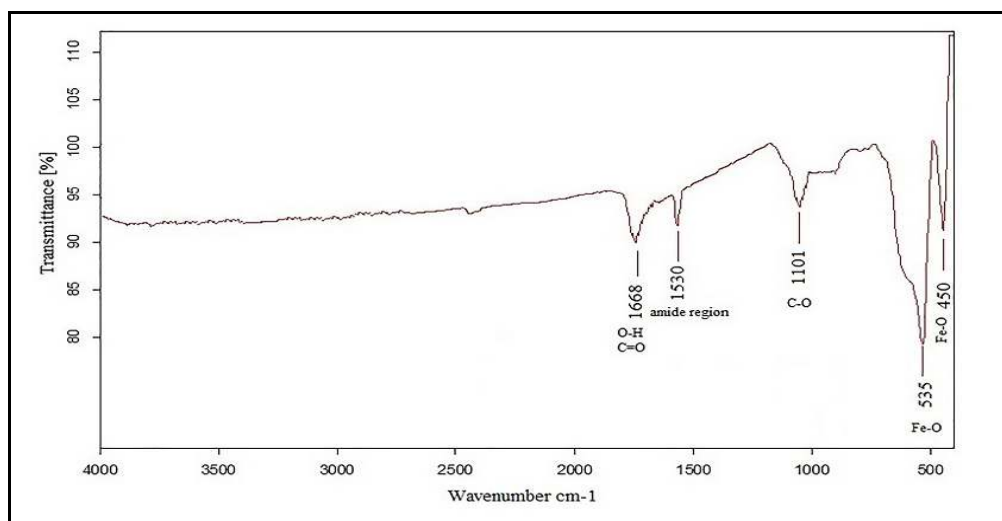
شکل ۷- A. تصاویر حاصل از FESEM. B و C. هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات برون سلولی مگنتیت تولیدی تحت استراتژی عصاره عاری از سلول.

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.



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 Fe_2O_3 nanoparticles synthesized by CFE of *Alcaligenes* sp. strain NV06.

باکتری‌ها، قارچ‌ها و عصاره‌های گیاهی گزارش شده است. محققین پس از آن که *Actinobacter* را در معرض FeCl_3 به مدت ۷۲-۴۸ 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 تنهایی ۵-۷ 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 اکسید آهن 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 نعنائیان، 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 (Balamurugan 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* و *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* نیز گزارش کردند (Mohamed

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 1668 cm^{-1} ، 1530 cm^{-1} ، 1101 cm^{-1} و 535 cm^{-1} 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 Fe_2O_3 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

طریق ترشح خارج سلولی آنزیم‌های موجود در سویه NV06 و یا ترشح متابولیت‌های ثانویه حادث می‌شود. از دستاوردهای حاصل از این پژوهش می‌توان 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 آبی 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 اجرا شده است که بدینوسیله، نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

REFERENCES

- Abdeen, M., Sabry, S., Ghazlan, H., El-Gendy, A.A. & Carpenter, E.E. 2016. Microbial-physical synthesis of Fe and Fe₃O₄ 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.

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 اکسید آهن فریک توسط باکتری‌های آبی جداسازی شده پرداخته شد. میکروارگانیسم‌های آبی مانند باکتری‌ها، سیانوباکتری‌ها، اکتینوباکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی هستند که در محیط‌های آبی مانند دریاها و اقیانوس‌ها زندگی می‌کنند. این موجودات، به عنوان 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 آبی، 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 اکسید آهن فریک (Fe₂O₃) 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 آبی آلکالیژنس، با پتانسیل بیوسنتز نانوذرات آهن، از آب‌های سطحی شهرستان دیواندره استان کردستان ایران جداسازی و طی چندین آزمایش شناسایی شد. توانایی‌های ویژه باکتری‌های آبی، 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 اکسید آهن فریک است. به‌طور کلی سنتز خارج سلولی نانوذرات اکسید آهن فریک تولید شده، از

- Baker, S., Harini, B.P., Rakshith, D. & Satish, S. 2013. Marine microbes: invisible nanofactories. *Journal of Pharmacy Research* 6: 383-388.
- Balamurugan, M.G., Mohanraj, S., Kodhaiyolli, S. & Pugalenth, 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., Pérez, 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. & Venkatesh, 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. & Ismael, 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.

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 Fe₂O₃ nanoparticles by a native marine bacterium, *Alcaligenes* sp. strain NV06. Nova Biologica Reperta 9: 182-192. (In Persian).

آشنگروف، م. و وکیلی سهر فروزانی، ن. ۱۴۰۱. سنتز برون سلولی سبز نانوذرات Fe₂O₃ توسط سویه باکتری بومی آبزی آلکالیژنز NV06. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۹: ۱۸۲-۱۹۲.