

Biological Journal of Microorganisms

Year 12, No.45, Spring 2023

Received: 2022-01-09

Accepted: 2022-04-12

(Research Paper)

Screening and Molecular Identification of Native Streptomyces Producing Manganese Oxide Nanoparticles from Qom Manganese Mine Soil

Atiyeh Sadat Hosseini Anvari

Department of Microbiology, Faculty Science, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran, hosseini.anvari0082@gmail.com

Seyyed Soheil Aghaei,*

Department of Microbiology, Faculty Science, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran, soheilaghae@yahoo.com

Mohammad Reza Zand Monfared

Department of Microbiology, Faculty Science, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran, zand.monfared@gmail.com

Abstract

Introduction: Manganese oxide nanoparticles are used as strategic materials in various industries such as battery manufacturing, water and wastewater treatment, pharmaceutical industries, etc. because of economic reasons and have special physical and chemical properties. The production of manganese oxide nanoparticles is one of the secondary metabolites in bacteria. Considering that the manganese and narcissus mine in Qom province is one of the most important sources of manganese for manganese-oxidizing microorganisms, this project was done for the first time on mine soli.

Materials and Methods: In this study, 100 soil samples were collected from different areas of the manganese mine and inoculated in the selective enrichment medium K and heated on a rotary shaker. The strains obtained from the culture in a manganese-containing medium were evaluated by the benzidine test to evaluate the oxidation ability of manganese and properties of

* Corresponding author

2322-5181/ © 2023 The Authors. Published by University of Isfahan

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



[10.22108/BJM.2022.132179.1442](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.132179.1442)



manganese oxide nanoparticles including morphology, size, and chemical structure using confirmation techniques such as UV-VIS, FTIR, XRD, FESEM, TEM. Using the FESEM histogram, the size of nanoparticles in the range of 10 nm was determined and the selected strain was molecularly identified.

Results: For the first time, native actinobacteria strain with the ability to oxidize manganese and nanoparticle production extracellularly was isolated from the Venarj manganese mine soil of Qom and was biochemically and molecularly identified. The strain was registered in the NCBI with the name *Streptomyces xantholiticus* HA98 and identification code OM669940.

Discussion and Conclusion: Based on the importance of manganese oxide nanoparticles in medical, industrial, and pharmaceutical industries and that the Venarj manganese mine soil of Qom is an important source for manganese-oxidizing microorganisms, the present study was conducted for the first time in Iran on this mine soil so that the microorganism with the above properties could be identified and used in various industries

Key words: Isolation, Molecular Identification, Manganese Oxidizing Bacteria, Manganese Oxide Nanoparticles, Manganese Mine Qom Province.



زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها

سال دوازدهم، شماره ۴۵، بهار ۱۴۰۲، صفحه ۶۳ - ۵۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۳

مقاله پژوهشی

غربالگری و شناسایی مولکولی استرپتومیسست بومی تولیدکننده نانوذرات اکسید منگنز از خاک معدن منگنز قم

عطیه سادات حسینی انواری: دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، hosseini.anvari0082@gmail.com
سید سهیل آقایی*: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، soheilghaee@yahoo.com
محمد رضا زند منفرد: مربی گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، zand.monfared@gmail.com

چکیده

مقدمه: نانوذرات اکسید منگنز به دلایل اقتصادی و داشتن خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاص، به‌عنوان ماده استراتژیک در صنایع مختلف مانند باتری‌سازی، تصفیه آب و فاضلاب، صنایع دارویی و غیره کاربرد دارد. تولید نانوذرات اکسید منگنز جزء متابولیت‌های ثانویه در باکتری‌ها است و با توجه به اینکه معدن منگنز و نارچ استان قم، یکی از مهم‌ترین منابع تأمین‌کننده منگنز برای میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده منگنز است، این پروژه برای نخستین بار روی خاک‌های این معدن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۰ نمونه خاک از مناطق مختلف معدن منگنز جمع‌آوری و در محیط غنی‌کننده انتخابی K تلقیح و در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شد. سوبه‌های به‌دست آمده از کشت در محیط حاوی منگنز توسط آزمایش بنزدین برای ارزیابی توانایی اکسیداسیون منگنز بررسی شدند و ویژگی‌های نانوذرات اکسید منگنز از جمله مورفولوژی، اندازه و ساختار شیمیایی آن توسط تکنیک‌های تأییدی شامل UV-VIS، FTIR، XRD، FESEM و TEM تعیین شدند. با استفاده از نمودار هیستوگرام FESEM اندازه نانوذرات در محدوده ۱۰ نانومتر مشخص شد و سوبه منتخب شناسایی مولکولی شد.

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © 2023 The Authors. Published by University of Isfahan

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



[10.22108/BJM.2022.132179.1442](https://doi.org/10.22108/BJM.2022.132179.1442)

نتایج: برای نخستین بار یک سویه اکتینومیست بومی با توانایی اکسیداسیون منگنز و تولید نانوذرات به صورت خارج سلولی از معدن منگنز و نارچ قم، جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی شد. سویه مدنظر بعد از شناسایی مولکولی با نام *Streptomyces xantholiticus* HA98 و کد شناسایی OM669940 در سایت NCBI ثبت شد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه نانوذرات اکسید منگنز در مصارف پزشکی، صنعتی و دارویی اهمیت دارند و معدن منگنز و نارچ قم منبع بسیار مهمی برای میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده منگنز است، این پژوهش برای نخستین بار در ایران روی خاک‌های این معدن انجام گرفت تا میکروارگانیسمی با خواص فوق، شناسایی و از آن در صنایع مختلف استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، شناسایی مولکولی، باکتری‌های اکسیدکننده منگنز، نانوذرات اکسید منگنز، معدن منگنز استان قم

مقدمه

فناوری نانو یا نانو تکنولوژی یک زمینه جدیدی از تحقیقات مربوط به تهیه نانومواد و نانوذرات است که تأثیر امیدوارکننده در بسیاری از زمینه‌ها ایجاد کرده است (۱). تولید نانومواد و نانوذرات از تنوع بسیاری برخوردار است؛ براساس این، طبقه‌بندی‌های مختلفی برای آنها ارائه می‌شود. نانومواد را در یک طبقه‌بندی رایج می‌توان در چهار دسته نانومواد کربنی، دندریمرها، نانوذرات کامپوزیت و نانوذرات فلزی قرار داد (۲). امروزه استفاده از نانوذرات فلزی برای اهداف مختلف، به موضوع با اهمیتی تبدیل شده است. این نانوذرات به دلیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاص و هدایت گرمایی بالا درخور توجه‌اند. اندازه کوچک این ذرات و نسبت سطح به حجم بالای آنها، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی را نسبت به حالت توده‌ای آنها سبب می‌شود (۳). یکی از مشکلات زیست‌محیطی آلودگی آب‌های زیرزمینی با آرسنیک^۱ است. اکسید منگنز قادر به اکسیداسیون آرسنیک III به آرسنیک V است. این فرم آرسنیک به ترکیبات اکسیدی و هیدروکسیدی، جذب و به این ترتیب از محیط حذف می‌شود. اکسید منگنز در مقیاس نانومتری از توانایی

بیشتری در اکسیداسیون یا جذب فلزات برخوردار است (۴). اکسید منگنز نقش بسیار مهمی در چرخه زیستی مونواکسید کربن توسط اکسیداسیون ترکیبات آلی پیچیده و تبدیل آنها به شکل‌های ساده‌تر دارد. از جمله کاربردهای بیوتکنولوژی اکسیدهای منگنز به پاکسازی و حذف ترکیبات آلی در سیستم‌های تصفیه آب می‌توان اشاره کرد (۵).

منابع طبیعی مانند سلول‌های گیاهی، قارچی و باکتریایی می‌توانند گزینه مناسبی برای دستیابی به روشی مطلوب برای تولید نانوذرات باشند. در دهه‌های گذشته، گزارش‌های بسیاری درباره تهیه نانوذرات فلزی با روش‌های زیستی و شیمیایی صورت گرفته است که از این میان علاقه چشمگیری به استفاده از تکنیک‌های زیستی مشاهده می‌شود. هم‌راستا با تلاش جهانی در توسعه روش‌های تولید مؤثر انرژی و کاهش ضایعات خطرناک استفاده از شیمی سبز برای تولید نانوذرات فلزی اهمیت چشمگیری یافته است (۶). از امتیازات بارز تولید نانوذرات به روش زیستی، سمیت کمتر و پایداری بیشتر نسبت به نانوذرات سنتز شده به روش شیمیایی، تمیز، غیرسمی و دوستدار محیط زیست، مصرف انرژی کمتر نسبت به روش‌های سنتز فیزیکی و شیمیایی، تولید

از طریق شیمیایی تولید می‌شوند و روش‌های شیمیایی نیز برای محیط زیست مخرب‌اند. همچنین اکسیدکننده‌های منگنز به دلیل داشتن خواص زیاد، چه در حوزه صنعت و فناوری نانو و چه در حوزه علوم دارویی و پزشکی اهمیت بسیاری دارند (۱۰).

هدف اصلی این پژوهش جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های تولیدکننده نانوذرات اکسید منگنز به منظور تولید نانوذرات دوستدار محیط زیست با کاربرد صنعتی از خاک معدن منگنز و نارچ استان قم است که برای نخستین بار در کشور انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و غربالگری باکتری‌های تولیدکننده

اکسید منگنز: با توجه به زیستگاه طبیعی میکروارگانیسم‌های اکسیدکننده منگنز و وجود عناصر منگنز احیاشونده، نمونه برداری از خاک‌های ۳ منطقه مختلف معدن منگنز و نارچ قم (طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۴۵ دقیقه و ۴۲ ثانیه و عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۲۵ دقیقه و ۳ ثانیه) صورت گرفت. ابتدا غنی‌سازی اولیه روی نمونه‌های خاک انجام شد؛ بدین صورت که ابتدا ۱۰ گرم از هر نمونه خاک معدن برای انجام فرایند فوق وزن شد و سپس داخل ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۹۰ سی‌سی محیط کشت $0/001 \text{ gr k}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0/008 \text{ gr}$ ، MgSO_4 $0/002 \text{ gr}$ ، KH_2PO_4 ، MnSO $0/01 \text{ gr}$ و Yest Extract $0/005 \text{ gr}$ ریخته شد. سپس ارلن‌ها به منظور غنی‌سازی در انکوباتور شیکردار به مدت ۷ روز با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از ۷ روز به منظور غنی‌سازی ثانویه نمونه‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک به ارلن دیگری منتقل شد که حاوی

مواد جانبی کمتر و زیست‌سازگاری بسیار بالا است. میکروارگانیسم‌های متفاوتی می‌توانند یون‌های فلزی سمی را به نانوذرات احیا^۱ کنند. این یون‌های فلزی به درون سلول، جذب و در فضای درون سلولی آنها پراکنده می‌شوند. جداسازی این نانوذرات به آزادسازی آنها از سلول‌های مولد برای کاربرد احتمالی نیازمندند (۷). باکتری‌ها در طبیعت پراکنده‌اند و برای سنتز و به دست آوردن نانوذرات می‌توانند استفاده شوند. این میکروارگانیسم‌ها زمانی که در معرض غلظت‌های بالای یون‌های فلزی قرار می‌گیرند، آنها را احیا و به حالت عنصری خود تبدیل می‌کنند. استفاده از نانوذرات، سویه‌های مقاومی را به عنوان محصول جانبی تولید می‌کند که نسبت به فلزات مقاومت دارند و همین سویه‌های مقاوم به عنوان منبعی برای تولید هرچه بیشتر و بازدهی بالاتر نانوذرات فلزی استفاده می‌شوند (۸). گزارشات زیادی مبنی بر سنتز نانوذرات فلزی^۳ و شبه‌فلزی^۴ با باکتری‌ها، قارچ‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها در شرایط استرس نمک فلزات یا نمک شبه‌فلزات صورت گرفته است. مشخص شده است باکتری‌ها تولید نانوذرات اکسید فلزی و شبه‌فلزی می‌کنند. بسیاری از این باکتری‌ها نانوذرات را به صورت درون سلولی و تعداد کمی به صورت خارج سلولی سنتز می‌کنند (۹).

به‌طور کلی تاکنون دو مکانیسم درگیر در اکسیداسون منگنز مطرح شده است. مکانیسم اول، مکانیسم غیرمستقیم، شامل افزایش میزان قلیا در محیط کشت باکتری و اکسید شدن منگنز در اثر قلیایی شدن^۵ است و مکانیسم دوم، شامل اکسیداسیون مستقیم منگنز است که بیشتر توسط آنزیم‌های اکسیدکننده منگنز صورت می‌گیرد. مکانیسم دقیق با بررسی‌های ژنتیکی آشکار می‌شود. نانوذرات اکسید منگنز تا به امروز بیشتر

استفاده از خلأ و سرما خشک شدند (۱۳).

تعیین ویژگی‌ها و خواص نانوذرات اکسید منگنز تولیدشده توسط سویه منتخب: خصوصیات نوری نانوذرات سنتز شده با استفاده از آنالیز طیف‌سنجی فرابنفش مرئی بررسی شدند. برای این کار کشت تازه باکتری مدنظر در محیط مایع K سانتریفیوژ شد (۱۰ دقیقه، سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و محلول رویی در فالكون استریل، ریخته و برای انجام تست-UV Vis بررسی شد. رسوب حاصل از سانتریفیوژ دو مرتبه با آب مقطر استریل (PH=7) شستشو داده شد. سوسپانسیون حاصل با استفاده از دستگاه اولتراسونیک در معرض امواج صوتی قرار داده (4, 15min, 40 KHz power 80%) و طیف جذبی آن توسط دستگاه طیف‌سنج مدل UV-2100 در محدوده طول موج ۳۰۰ نانومتر ثبت شد. سپس طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز براساس جذب تابش و برانگیختگی در ترازهای انرژی ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت گرفت. امواج الکترومغناطیسی استفاده شده در طیف‌سنجی‌های ارتعاشی، به‌طور معمول نور مادون قرمز است. به‌منظور اطمینان از قدرت احیاکنندگی سویه مدنظر در ابتدا توانایی آن در تولید نانوذرات اکسید منگنز در دو محیط کشت آگار مغذی حاوی منگنز و بدون منگنز بررسی شد.

تعیین گروه‌های عاملی به روش طیف‌سنجی: پودر نانوذرات به‌منظور تعیین گروه‌های عاملی موجود در سطح نانوذرات که در تشکیل، تثبیت و پایداری نانوذرات نقش دارند، با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز مدل AVATAR370 در محدوده ۴۰۰۰-۳۰۰ نانومتر ثبت شد. طرح پراش پرتوی X نمونه با استفاده از دستگاه پراش سنج پرتوی X مدل pw1730 با استفاده از داده‌های به‌دست آمده از آنالیز

۹۰ سی‌سی محیط کشت K بود و در انکوباتور شیکردار به مدت ۷ روز با سرعت ۱۴۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ته‌نشین شدن رسوبات خاک، از بخش رویی سوسپانسیون حاوی سلول‌های باکتری رقت‌های متوالی تهیه شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در سطح محیط‌های K آگاردار به‌صورت انبوه کشت شد و پلیت‌ها به مدت ۷ تا ۱۴ روز در دمای ۲۸ الی ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماخانه‌گذاری شدند. به‌منظور تهیه کشت خالص باکتری‌های اکسیدکننده منگنز پیوسته به محیط‌های کشت تازه اختصاصی K منتقل شدند. غربالگری اولیه باکتری‌های اکسیدکننده منگنز براساس تشکیل کلنی قهوه‌ای و آزمون بنزیدین صورت گرفت (۱۱).

شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی: سویه

خالص شده بعد از نشان دادن توانایی اکسید منگنز با استفاده از آنالیزهای بیوشیمیایی آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، اوره و H₂S و آزمون رشد بی‌هوازی (طبق کتاب راهنمای باکتریولوژی سیستماتیک برجی) و آزمون‌های مورفولوژیک، رنگ آمیزی گرم، اندوسپور و حرکت شناسایی شد (۱۲). همچنین سویه مدنظر در محیط‌های کشت نوترینت آگار و TSA کشت داده شد.

سنتز نانوذرات اکسید منگنز: به‌منظور تولید نانوذرات

اکسید منگنز، سویه منتخب به‌صورت هوازی در محیط کشت مایع K محتوی ۰/۰۱ میلی‌گرم سولفات منگنز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ روز در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه کشت داده شد. تغییر رنگ آجری ایجاد شده در سوسپانسیون اولین نشانه در تولید نانوذره اکسید منگنز بود. رسوبات قهوه‌ای رنگ ایجاد شده در محیط کشت، توسط دستگاه لیوفیلیز با

سایت NCBI به عنوان سویه جدید ثبت شد. با استفاده از نرم افزار MegaX درختچه فیلوژنتیکی براساس پیوست همسایگی رسم شد.

نتایج

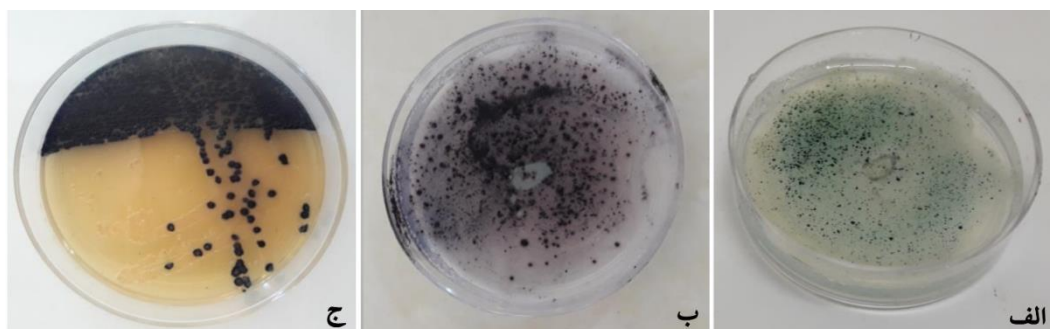
جداسازی و غربالگری اولیه: با توجه به زیستگاه طبیعی باکتری های اکسیدکننده منگنز از بین ۱۰۰ نمونه خاک جمع آوری شده از نواحی مختلف سرپوشیده و باز معدن منگنز و نارچ قم، ۲۰ عدد از باکتری های رشد یافته در محیط های کشت افتراقی و انتخابی توانایی اکسیداسیون منگنز را از خود نشان دادند. این نمونه ها روی محیط های کشت در مدت ۲ الی ۳ هفته توانستند منگنز محیط را اکسید کنند. از میان سویه های فوق تنها یک سویه توانایی بیشتری در اکسایش منگنز داشت که به عنوان سویه منتخب برای انجام ادامه پژوهش انتخاب شد. این سویه توانست منگنز موجود در محیط کشت را در مدت زمان کمتر از سه هفته، مصرف و اکسید منگنز تولید کند. آزمون بنزیدین روی کلنی سویه منتخب رشد یافته در محیط کشت K انجام شد و بعد از چند دقیقه سویه فوق با انجام اکسیداسیون منگنز رنگ محیط را به آبی تیره تا سیاه تغییر داد که نشان دهنده توانایی اکسیداسیون منگنز توسط سویه منتخب است. سایر نمونه ها به دلیل ضعف اکسیدکنندگی منگنز در آزمایشات بعدی حذف شدند. تصاویر میکروسکوپی کلنی های تیره شده سویه منتخب در شکل ۱ آورده شده اند. شکل ۲- الف، محیط کشت مایع K حاوی سویه منتخب رشد یافته و شکل ۲- ب، محیط کشت مایع فاقد باکتری را نشان می دهد.

XRD اندازه نانوبلوک ها از معادله شرر محاسبه شد.

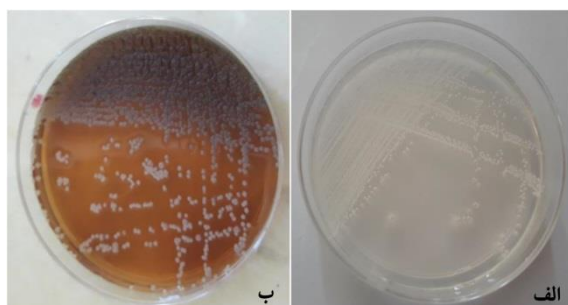
تصویربرداری الکترونی: تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی نمونه با میکروسکوپ الکترونی مدل MIRA III و تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نمونه با میکروسکوپ الکترونی مدل MIRA III ثبت شدند.

شناسایی مولکولی سویه منتخب تولیدکننده نانوذرات اکسید منگنز: ماده ژنتیکی با استفاده از روش جوشاندن، استخراج و با دستگاه نانودراپ از نظر غلظت بررسی شد. از پرایمرهای یونیورسال^۶ برای تکثیر قطعه ژنی *16S rRNA* با طول ۲۰ جفت باز (طول کل ۴۰ جفت باز) استفاده شد؛ پرایمر 5'-F27 (Forward) و پرایمر 3'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (Reverse) R1492

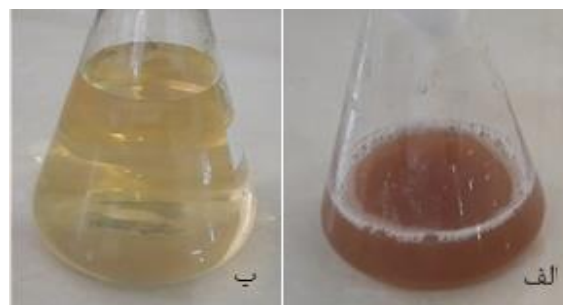
ترکیب (GGGTTACCTTGTTACGACTT-3') واکنش حاوی rRNA (۳۰ میکرولیتر) از ترکیب اصلی با DNA و پرایمرها تشکیل شده است. شرایط فرایند PCR به شرح زیر بود: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه دناتوراسیون به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال مجدد به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد، گسترش به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. فرایند توالی یابی در مؤسسه توپاز ژن (کرج، ایران) انجام شد. توالی به دست آمده برای شناسایی مولکولی سویه منتخب در سایت NCBI بلاست شد (۱۴). سپس توالی های فوروارد و ریورس تولید شده با استفاده از نرم افزار Bioedit نسخه ۷,۲ ترکیب شدند و توالی نهایی در



شکل ۱- الف، انجام آزمون بنزدین روی سویه منتخب در محیط کشت TSA؛ ب، کلنی سیاه‌شده سویه منتخب بعد از گذشت ۶۰ دقیقه در اثر مجاورت با بنزدین در محیط کشت TSA؛ ج، کلنی‌های قهوه‌ای تا سیاه رنگ سویه منتخب اکسیدکننده منگنز در محیط اختصاصی K بعد از گذشت ۲ هفته از انجام کشت

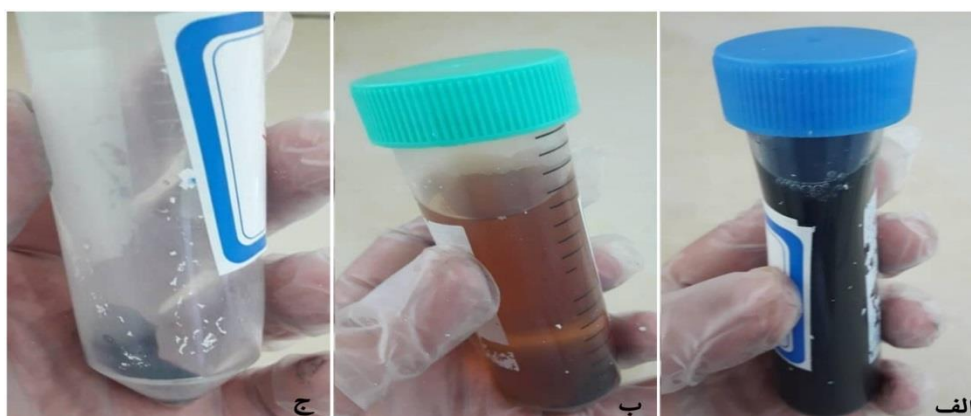


شکل ۲- الف، محیط کشت K حاوی سویه‌های باکتریایی رشد یافته؛ ب، محیط کشت K فاقد سویه باکتریایی رشد یافته



سنترز نانوذرات اکسید منگنز: با توجه به تولید کلنی‌های قهوه‌ای تا سیاه رنگ در محیط حاوی منگنز و عدم تولید کلنی‌های فوق در محیط بدون منگنز، پتانسیل احیاکنندگی سویه مذکور با مشاهده توانایی آن در تولید نانوذرات اکسید منگنز با تغییر رنگ کلنی‌های محیط کشت به اثبات رسید. مراحل جداسازی نانوذرات تولیدشده در شکل ۴ آورده شده‌اند.

شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی: براساس نتایج حاصل از آزمایش‌های شناسایی سویه منتخب، گرم مثبت، فاقد حرکت و اندوسپور منفی است. همچنین سویه فوق، رشته‌ای، کاتالاز، اکسیداز، اوره و H_2S مثبت و هوازی است. نتایج فوق نشان می‌دهند سویه فوق از اعضای خانواده اکتینومیسست‌ها است. تصاویر رشد سویه منتخب در محیط‌های کشت نوترینت آگار و TSA در شکل ۳ آورده شده‌اند.



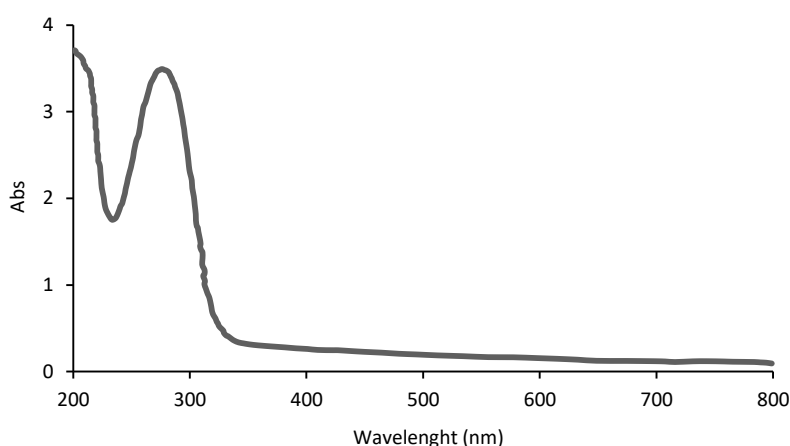
شکل ۴- الف، نانوذره اکسید منگنز تولیدشده توسط سویه منتخب؛ ب، نانوذره اکسید منگنز سانترفیوژشده؛ ج، نانوذره اکسید منگنز پس از حذف محیط کشت

اکسید منگنز در شکل ۶ مشاهده می‌شوند؛ حضور یک شیفت بزرگ از 3742 cm^{-1} به 3850 cm^{-1} نشان دهنده باندهای C-N متعلق به گروه آمین است. الگوی انرژی تفرق اشعه ایکس از نانوذرات اکسید منگنز تولیدشده توسط سویه منتخب در شکل ۷ نشان داده شده است. طیف مدنظر پیک‌های کریستالین دارد که با توجه به موقعیت پیک‌ها ترکیب شیمیایی رسوبات دارای فرمول مولکولی Mn_2O_3 تشخیص داده شد.

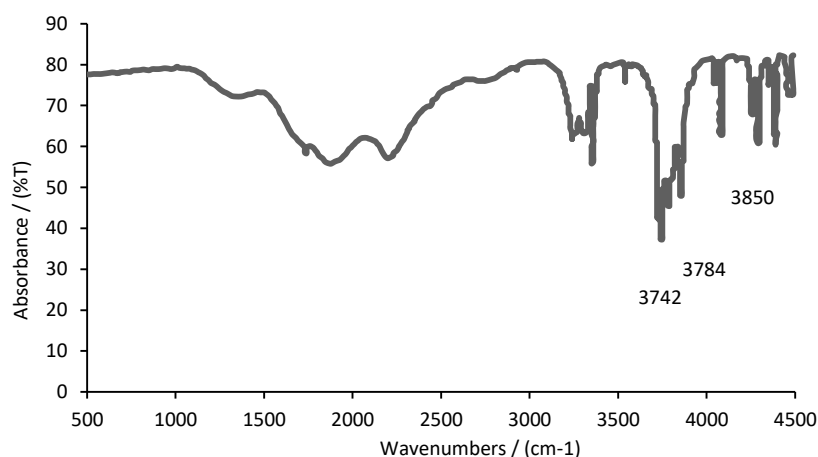
تعیین ویژگی‌ها و خواص نانوذرات سنتز شده: شکل

۵ نتیجه حاصل از طیف‌سنجی در محدوده طول موج ماورای بنفش و نور مرئی را نشان می‌دهد. طیف تولیدشده نشان می‌دهد نانوذرات اکسید منگنز سنتز شده توسط سویه منتخب بیشترین جذب را در محدوده ۳۰۰ نانومتر دارند.

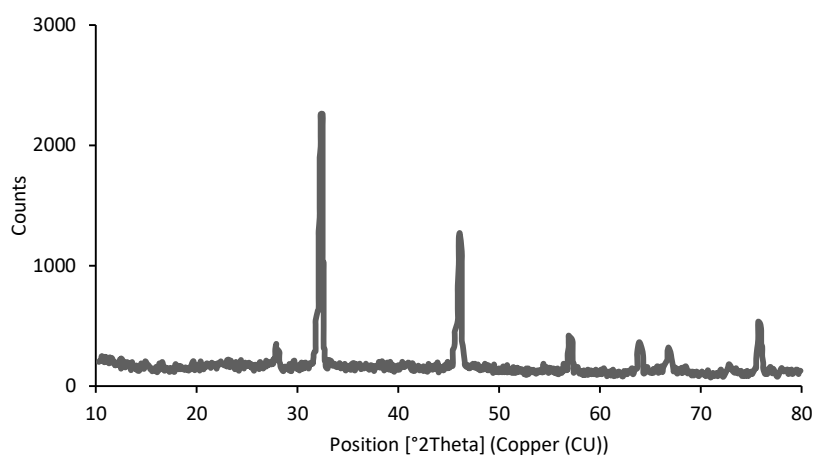
نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز از رسوبات قهوه‌ای اکسید منگنز تولیدشده در محیط کشت K برای شناسایی بیومولکول‌های درگیر در تولید نانوذرات



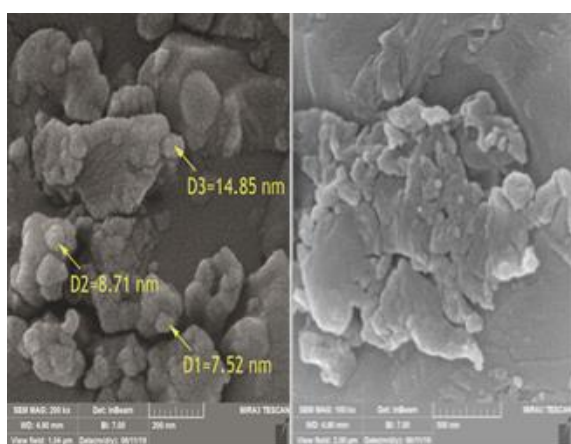
شکل ۵- طیف جذبی UV-Vis سویه منتخب رشد یافته در محیط کشت K



شکل ۶- طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه نانوذرات سنتز شده توسط سویه منتخب



شکل ۷- الگوی تفرق اشعه X به دست آمده از نانوذرات سنتز شده توسط سویه منتخب

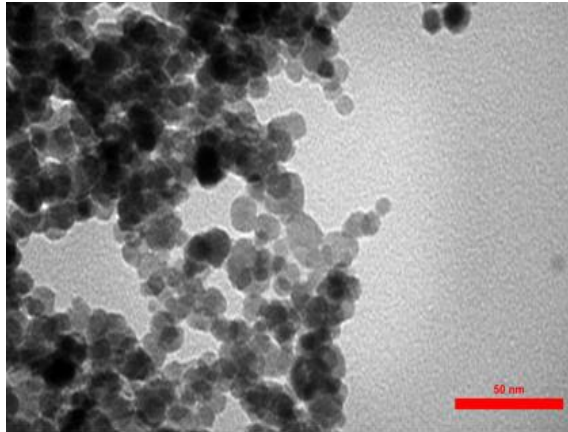


شکل ۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از اندازه و نحوه

قرارگیری نانوذرات اکسید منگنز سنتز شده

ارزیابی و آنالیز ترکیبات و مورفولوژی رسوبات حاصل از فرایند آماده‌سازی نانوذرات خارج سلولی با میکروسکوپ الکترونی روبشی و همچنین استفاده از نمودار هیستوگرام میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی نشان داد نانوذرات خارج سلولی سنتز شده توسط سویه منتخب دارای اندازه‌های در بازه ۱۰ نانومتر و بیشتر به شکل کروی و تجمع یافته هستند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات سنتز شده در شکل ۸ آمده‌اند.

سایت NCBI ثبت شد. آنالیز فیلوژنتیکی سویه منتخب در شکل ۱۰ آمده است.

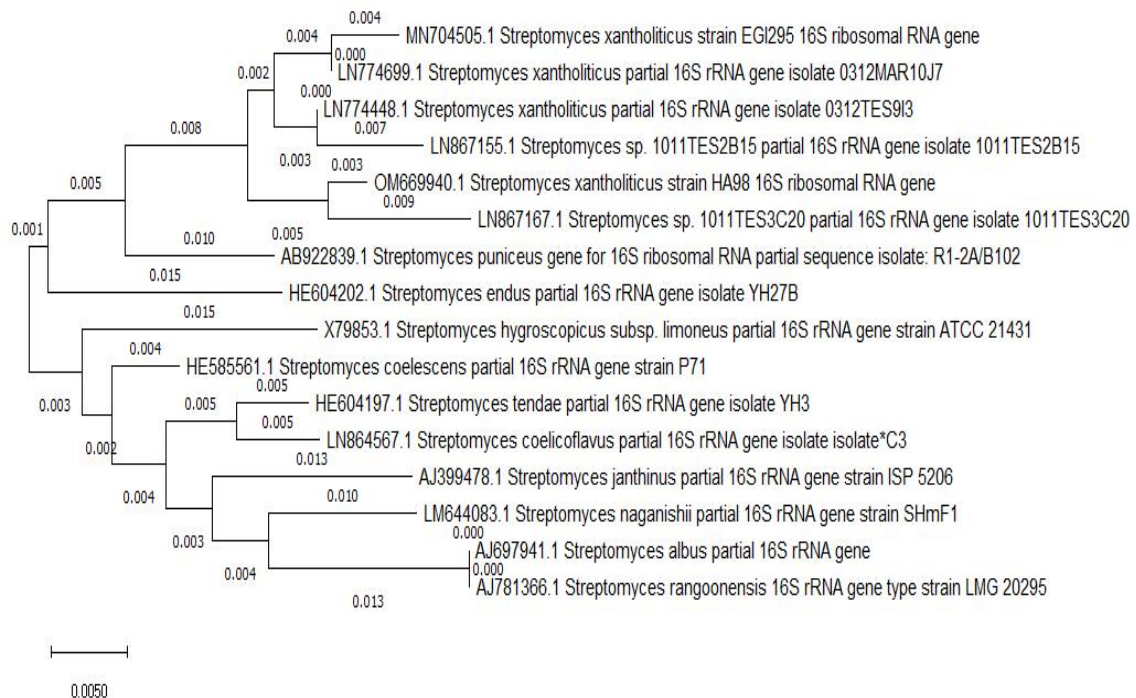


شکل ۹- میکروسکوپ الکترونی عبوری که تولید نانوذرات اکسید منگنز را نشان می‌دهد.

تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری سویه منتخب در شکل شماره ۹ آورده شده است. میانگین اندازه ذرات محاسبه شده با استفاده از تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری میانگین ۱۰ نانومتر است. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری اندازه ذرات و شکل کروی به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی را تأیید می‌کنند.

شناسایی مولکولی سویه منتخب تولیدکننده

نانوذرات اکسید منگنز: نتایج بلاست توالی حاصل از شناسایی مولکولی سویه منتخب نشان دهنده شباهت ۹۸ درصدی سویه فوق با باکتری *Streptomyces xantholiticus* strain EGI295 هستند. همچنین توالی به دست آمده با نام باکتری *Streptomyces xantholiticus* HA98 و کد شناسایی OM669940 در



شکل ۱۰- آنالیز فیلوژنتیکی سویه منتخب با استفاده از روش پیوست همسایگی

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از مواد مختلف در ابعاد نانو خواص و عملکردهای جدیدی را ایجاد می‌کند که بررسی این ویژگی‌ها سبب توسعه علم و افزایش کشف کاربردهای آنها می‌شود. از میان نانوذرات فلزی، اکسیدهای فلزی به‌ویژه نانوذرات اکسید منگنز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند؛ به طوری که در صنعت فولاد به‌منظور کنترل ناخالصی‌ها به کار برده و باعث افزایش پایداری، سختی و استحکام فولاد می‌شود.

دینگ^۸ و همکارانش در سال ۲۰۱۳ بیان داشتند در سال‌های اخیر، اکسیدهای فلزی، به‌خصوص اکسیدهای منگنز، به‌علت خواص منحصر به فرد فیزیکی و شیمیایی و کاربردهای بالقوه‌ای که در کاتالیست‌ها، تبادل یونی، جذب مولکولی و حسگرهای زیستی دارند، به شدت مورد علاقه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۱۵).

در پزشکی و داروسازی از نانوذرات اکسید منگنز برای بهبود عملکرد تکنیک MRI، دارورسانی و آزادسازی RNA کوچک مداخله‌گر به‌منظور ژن درمانی استفاده شده است. تولید نانوذرات اکسیدهای فلزی باعث افزایش کارایی این ترکیبات می‌شود؛ به عبارت دیگر، اکسید منگنز در مقیاس نانومتری از توانایی بیشتری در اکسیداسیون یا جذب فلزات برخوردار است.

امروزه تولید نانوذرات با پایه زیستی با توجه به کارایی آنها در علوم پزشکی و زیست‌شناسی رو به افزایش است. همچنین استفاده از فرایندهای زیست‌فناورانه به‌علت سنتز غیرسمی نانوذرات ضروری به نظر می‌رسد؛ بنابراین، محققان با الهام از ساختارهای زیستی به توسعه فرایندهای سنتزی دوستدار محیط زیست برای سنتز نانوذرات فلزی (اکسید فلزی) با

استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها، مخمرها، عصاره‌های گیاهی و غیره در سنتز نانوذرات فلزی و شبه‌فلزی پرداختند. با وجود تمام پژوهش‌های انجام‌شده، رسیدن به دانش کافی برای استفاده کاربردی و روزانه از نانوذرات اکسید فلزی و به‌صورت خاص نانوذرات اکسید منگنز به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

معدن منگنز ونارچ واقع در استان قم به‌عنوان یک منبع غنی از منگنز در طبیعت شناخته می‌شود و مطالعه روی میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و توانایی آنها در تولید نانوذرات اکسید منگنز پیش از این به میزان مطلوب صورت نگرفته است؛ بنابراین، بررسی باکتری‌های موجود در معدن منگنز برای تولید نانوذرات اکسید منگنز بسیار ارزشمند است. همچنین، به‌دلیل شرایط خاص و استراتژیک معدن منگنز واقع در منطقه ونارچ قم و با توجه به اینکه خاک‌ها منابع غنی از فلزات هستند و باکتری‌های موجود در خاک بیشترین مقاومت را نسبت به این فلزات دارند، استفاده از باکتری‌ها در روند سنتز نانوذرات اکسید منگنز از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. در جداسازی باکتری‌های اکسیدکننده منگنز سعی شده است از تمام مناطق سرباز و سرپوشیده معدن منگنز نمونه برداری انجام شود تا تقریباً تمام مناطق معدن تحت پوشش قرار گیرند و برای این کار از عمق ۲۹۰ متری از سطح زمین نیز نمونه خاک برداشت شد. جداسازی باکتری‌های اکسیدکننده منگنز با استفاده از محیط اختصاصی K حاوی سولفات منگنز انجام شد. منگنز موجود در خاک به‌صورت کاتیون دو ظرفیتی جذب می‌شود؛ به همین دلیل، در این پروژه از سولفات منگنز استفاده شد؛ زیرا ترکیبات سولفات، نمک‌ها یا استرهای اسید سولفوریک هستند که با جایگزینی یک

یا هر دو هیدروژن آن با یک فلز سنتز شده‌اند.

حسین‌خانی و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی تولید نانوذرات اکسید منگنز توسط سویه‌های اسنیتوباکتر جدا شده از رسوبات دریایی فعالیت کرده و از کلرید منگنز به عنوان ماده کربنی برای شناسایی باکتری‌های اکسیدکننده منگنز استفاده کرده‌اند. نتایج پژوهش نشان دادند اسنیتوباکترهای جدا شده توانایی مصرف کلرید منگنز و تولید نانوذرات اکسید منگنز به صورت خارج سلولی را دارند (۱۱).

باترفیلد^۹ و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند گروه‌های عاملی موجود در دیواره سلولی باکتری‌ها، مکان‌های مناسبی برای ایجاد اتصال و جذب سطحی فلزات هستند و این عملکرد، مستقل از فعالیت متابولیتی سلول بوده است؛ در نتیجه، قطعاتی از دیواره سلول قادر به جذب فلزات خواهند بود و بعد از ایجاد اتصال فلز، عمل احیای فلز توسط پروتئین اکسیدازی به نام اکسیداز مولتی مس صورت می‌گیرد که یک عامل انتقال الکترون است (۱۶). با توجه به دانش ایجاد شده، در پژوهش‌های آینده در یک فرایند مشترک نانوذرات فلزی را با استفاده از باکتری‌های جذب کننده و اکسید کننده فلزات می‌توان تولید کرد.

باکتری‌های اکسید کننده منگنز در محیط کشت اختصاصی K، کلنی‌های قهوه‌ای تا سیاه رنگ ایجاد می‌کنند که تست بنزیدین به دلیل داشتن گروه آزو می‌تواند طیف وسیعی از رنگ‌ها مانند آبی، سبز و سیاه را سنتز کند و باکتری‌هایی که توانایی اکسیداسیون منگنز را دارند با این روش جداسازی می‌شوند. پس از ایجاد واکنش تغییر رنگ، با بررسی اسپکتروفتومتری نانوذرات اکسید منگنز تولید شده در محدوده طول موج ۳۰۰ نانومتر با حداکثر جذب مشخص شدند.

ویلاوبوس^{۱۰} و همکاران در سال ۲۰۰۳، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی رسوبات اکسید منگنز تولید شده توسط باکتری سودوموناس پوتیلد^{۱۱} را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و تکنیک تفرق اشعه ایکس مطالعه کردند. آنها پس از بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی به دست آمده از سنتز نانوذرات اکسید منگنز خارج سلولی، اظهار داشتند ترکیبات اکسید منگنز تولیدی توسط این باکتری ساختار ضعیف کریستالین دارد (۱۷). تاکاهاشی^{۱۲} و همکاران در سال ۲۰۰۷ و با استفاده از بررسی فیلوگرام نشان دادند باکتری‌های Proteobacteria-Firmicutes-Actinobacteria توانایی تولید اکسید منگنز (II) Mn را در توالی *16S rRNA* خود دارند (۱۸).

در این پژوهش بعد از نمونه برداری از خاک معدن منگنز و نارچ استان قم و غنی سازی آنها با استفاده از تست بنزیدین و با تولید کلنی‌های رنگی، شناسایی اولیه باکتری‌های تولید کننده نانوذرات اکسید منگنز انجام شد. سپس با استفاده از محیط کشت اختصاصی K باکتری مناسب، جداسازی و با آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شد. برای بررسی تولید نانوذرات از آزمون‌های اسپکتروفتومتری، طیف سنجی نور ماورای بنفش و نور مرئی و تصویربرداری الکترونی عبوری و روشی استفاده شد که در نهایت تولید نانوذرات اثبات شد.

با توجه به اینکه نانوذرات ساختارهای سطحی و میان کنش‌های متفاوت و فعال تری نسبت به ذرات با اندازه‌های بزرگ تر و همچنین توانایی و گرایش بیشتری برای اتصال، چسبندگی و تجمع دارند، سنتز نانوذرات با اندازه کوچک حائز اهمیت است. در این پژوهش سنتز نانوذرات اکسید منگنز به روشی کاملاً

DC: US Environmental Protection Agency.

- (3) Umer, A., Naveed, S., Ramzan, N., & Rafique, M. S. (2012). The selection of a suitable method for the synthesis of copper nanoparticles. *Nano*, 7(5), 1230005.
- (4) Miyata, N., Tani, Y., Sakata, M., & Iwahori, K. (2007). Microbial manganese oxide formation and interaction with toxic metal ions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1), 1-8.
- (5) Kim, H. S., Pastén, P. A., Gaillard, J. F., & Stair, P. C. (2003). Nanocrystalline todorokite-like manganese oxide produced by bacterial catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 125(47), 14284-14285.
- (6) Hoseinpour, V., & Ghaemi, N. (2018). Green synthesis of manganese nanoparticles: Applications and future perspective—A review. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 189, 234-243.
- (7) Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S. R., Kottaisamy, M., BarathManiKanth, S., Kartikeyan, B., & Gurunathan, S. (2010). The biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 77(2), 257-262.
- (8) Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Journal of Trends in Biotechnology*, 34(7), 588-599.
- (9) Quester, K., Avalos-Borja, M., & Castro-Longoria, E. (2013). The biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*, 54, 1-27.
- (10) Dick, G. J., Lee, Y. E., & Tebo, B. M. (2006). Manganese (II)-oxidizing *Bacillus* spores in Guaymas Basin hydrothermal sediments and plumes. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3184-90.
- (11) Hosseinkhani, B., & Emtiazi, G. (2011). Synthesis and Characterization of a Novel Extracellular Biogenic Manganese Oxide (Bixbyite-like Mn₂O₃) Nanoparticle by Isolated *Acinetobacter* sp. *Journal of Current Microbiology*, 63(3), 300-305.

دوستدار محیط زیست با استفاده از باکتری اکتینومیست^{۱۳} (استرپتومیست^{۱۴}) برای نخستین بار انجام گرفت. همچنین به دلیل کاربردهای وسیع نانوذرات اکسید فلزی به ویژه نانوذرات اکسید منگنز از جمله استفاده از آنها در ترکیبات آلی منگنزدار شامل آفت کش ها و متیل سیکلوپنتادین تری کربونیل^{۱۵} (MMT) و مواد افزودنی به سوخت، پژوهشگران مطالعه حاضر امیدوارند منابع غنی از میکروارگانیسم‌های اکستریم^{۱۶} در کشور مانند معدن منگنز و نارچ قم بیشتر پژوهش و بررسی شود. این پژوهش برای نخستین بار در کشور موفق به جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی سویه تولیدکننده اکسید منگنز از معدن منگنز و نارچ استان قم شد.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم معدن منگنز و نارچ استان قم و همچنین از مجموعه پرسنل و به‌طور خاص از واحد HSE و واحد آزمایشگاه به‌منظور همکاری‌های گسترده در راستای نمونه‌برداری از خاک معدن و سایر فعالیت‌های مشفقانه در پیشبرد این تحقیق تشکر می‌کنیم. همچنین از مسئول آزمایشگاه تحقیقاتی گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و سایر کارشناسان آن آزمایشگاه کمال قدردانی را داریم.

References

- (1) Ahmed, S., Chaudhry, S. A., & Ikram, S. (2017). A review on biogenic synthesis of ZnO nanoparticles using plant extracts and microbes: a prospect towards green chemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 166, 272-284.
- (2) Morris, J., Willis, J., & Gallagher, K. (2007). *Nanotechnology white paper*. Washington,

- (12) Sankari, D., Khusro, A., & Aarti, C. (2020). Isolation of bacteria from soil sample of Tamil Nadu and their in vitro interaction. *Journal of World News of Natural Sciences*, 28.
- (13) Toner, B., Fakra, S., Villalobos, M., Warwick, T., & Sposito G. (2005). The spatially resolved characterization of biogenic manganese oxide production within a bacterial biofilm. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1300-1310.
- (14) Rasouli, A., Aghaei, S. S., & Zargar M. (2021). Single-cell Oil Production Using Low-Cost Carbon Sources by Newly Isolated Kocuria Y205. *Archives of Hygiene Sciences*, 10(2), 143-154.
- (15) DING, P., XU, Y. L., & SUN, X. F. (2013). Synthesis and Performance of Nano MnO as an Anode Material for Lithium-Ion Batteries. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 29(2), 293-297.
- (16) Butterfield, C. N., Soldatova, A. V., Lee, S. W., Spiro, T. G., & Tebo, B. M. (2013). Mn (II, III) oxidation and MnO₂ mineralization by an expressed bacterial multicopper oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), 11731-11735.
- (17) Villalobos, M., Toner, B., Bargar, J., & Sposito, G. (2003). The characterization of the manganese oxide produced by *Pseudomonas putida* strain MnB1. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 67(14), 2649-2662.
- (18) Takahashi, Y., Manceau, A., Geoffroy, N., Marcus, M. A., & Usui, A. (2007). Chemical and structural control of the partitioning of Co, Ce, and Pb in marine ferromanganese oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(4), 984-1008.

- 7- Universal
 8- Ding
 9- Butterfield
 10- Villalobos
 11- *Pseudomonas putida*
 12- Takahashi
 13- Actinomist
 14- Streptomyces
 15- Methylcyclopentadenylcarbonyl
 16- Extreme

¹- Arsenic
²- Reduction
³- Metal nanoparticles
⁴- Metallic nanoparticles
⁵- Alkalization
⁶- Bergey's