



(Research Paper)
Biological Journal of Microorganism
11th Year, No. 42, Summer 2022
Received: April 3, 2021
Accepted: May 17, 2021

Investigating the Extracellular Synthesis of *Magnetic* Nanoparticles by an *Endophytic* Bacterium *Bacillus* sp. Strain BR06 under the Cell-free Extract Strategy

Morahem Ashengroph*

Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, m.ashengroph@uok.ac.ir

Yeganeh Meschi

Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, yeganehmeschi2020@gmail.com

Abstract

Introduction: Magnetic nanoparticles have various biomedical applications such as cell therapy, tissue repair, drug delivery, and magnetic resonance imaging (MRI) due to their unique physical, chemical, thermal, and mechanical characteristics as well as their suitable surface properties. The present study aimed to synthesize magnetic Fe₃O₄ nanoparticles (NPs) using the interaction of cell-free extracts of endophytic bacterial isolates with Fe₂O₃ as the precursor of NPs.

Materials and Methods: In this study, the extracellular synthesis of Fe₃O₄ NPs was accomplished by the cell-free extract (CFE) strategy. Characterization of Fe₃O₄ NPs was performed using different methods, including ultraviolet–visible spectroscopy (UV–Vis), field emission scanning electron microscope (FE-SEM), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), X-ray powder diffraction (XRD), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

Results: The obtained results of the study showed that the precursor Fe₂O₃ could be transformed into Fe₃O₄ NPs with the endophytic strain BR06. Phylogenetic analysis indicated

*Corresponding Author

2322-5181/ © 2022 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.2021.127905.1372](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.127905.1372)



that the isolated strain BR06 belonged to the genus *Bacillus*, and shared the highest sequence similarity with *B. siamensis* (MT052693). The Fe₃O₄ NPs with average diameters of 34 nm and cauliflower shape were synthesized by the endophytic strain BR06 in the biotransformation medium containing 5 mM Fe₂O₃ after 24 h incubation time. Electron microscopy and the associated spectroscopic analyses confirmed the formation of Fe₃O₄ NPs.

Discussion and Conclusion: In the present study, for the first time, the biosynthesis of extracellular magnetite NPs was described using *B. siamensis* under the cell-free extract strategy.

Key words: Biosynthesis, Endophytic Bacterium, Nanomagnetite, Cell-free Extract, Nanoparticle Characterization

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال یازدهم، شماره ۴۲، تابستان ۱۴۰۱، صفحه ۱۶-۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۷

بررسی سنتز برون سلولی نانوذرات مگنتیت توسط باکتری اندوفیت *Bacillus sp.* BR06 تحت استراتژی عصاره‌ عاری از سلول

مراجعه آشنکرف*: دانشیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، m.ashengroph@uok.ac.ir
یگانه مس‌چی: کارشناس ارشد گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، yeganehmeschi2020@gmail.com

چکیده

مقدمه: نانوذرات مگنتیت (Fe_3O_4)، به دلیل خصوصیات منحصر به فرد فیزیکی، شیمیایی، حرارتی و مکانیکی دارای کاربردهای زیست پزشکی مختلفی مانند سلول درمانی، ترمیم بافت، تحویل دارو و تصویربرداری با رزونانس مغناطیسی‌اند. هدف از این مطالعه تولید نانوذرات مگنتیت با استفاده از میانکشی عصاره‌ عاری از سلول جدایه‌های باکتریایی اندوفیت ریشه گیاه توت‌فرنگی و اکسید آهن فریک (Fe_2O_3) به عنوان پیش ساز نانوذرات بود.

مواد و روش‌ها: برای سنتز برون سلولی نانوذرات مگنتیت، استراتژی عصاره‌ عاری از سلول استفاده شد. ویژگی نانوذرات مگنتیت سنتزی پس از استخراج از مخلوط واکنش زیست تبدیلی، به وسیله آنالیزهای طیف‌سنجی مرئی ماورای بنفش و الکترومیکروگراف‌های به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی، طیف‌سنجی پراش انرژی پرتو ایکس، آزمون پراش اشعه ایکس و طیف‌سنجی مادون قرمز فوریه مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: براساس نتایج به دست آمده، جدایه باکتری اندوفیت BR06 قادر به تبدیل زیستی پیش ساز اکسید آهن فریک به نانوذرات مگنتیت بود. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنیک تأیید کرد جدایه باکتری مذکور متعلق به جنس *باسیلوس* است و از نظر قرابت ژنتیکی بیشترین شباهت نوکلئوتیدی را با *باسیلوس سیامنسیس* (MT052693) دارد. سویه اندوفیت مذکور قادر به سنتز نانوذرات مگنتیت کروی به شکل گل کلمی با میانگین اندازه ذرات ۳۴ نانومتر در غلظت ۵ میلی مولار اکسید آهن فریک و پس از ۲۴ ساعت واکنش بود. نتایج طیف‌سنجی و میکروسکوپ الکترونی سنتز نانوذرات مگنتیت را تأیید کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: در این پژوهش، برای نخستین بار زیست سنتز برون سلولی نانوذرات مگنتیت با استفاده از باکتری اندوفیت *باسیلوس سیامنسیس* تحت استراتژی عصاره‌ عاری از سلول توصیف شده است.

واژه‌های کلیدی: زیست سنتز، باکتری اندوفیت، نانومگنتیت، عصاره‌ عاری از سلول، تعیین خصوصیت نانوذره

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © 2022 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.2021.127905.1372



20.1001.1.23225173.1401.11.42.1.0

مقدمه

نانوذرات، ذراتی با حداقل یک بعد در مقیاس نانو (۱ تا ۱۰۰ نانومتر) هستند که به‌طور گسترده‌ای در طبیعت به عنوان محصولی از پدیده‌های طبیعی همانند فعالیت‌های آتشفشانی، فرایندهای دریایی، دودهای حاصل از آتش‌سوزی جنگل‌ها، پخت غذا و آگزوز وسایل حمل‌ونقل وجود دارند (۱ و ۲). با کوچک تر شدن ذرات و عبور از وضعیت میکروذرات به نانوذرات، با افزایش نسبت سطح به حجم، رفتار اتم‌های روی سطح یک ذره، بر آنهایی که در داخل ذره قرار گرفته‌اند غلبه پیدا می‌کند؛ در چنین شرایطی فلزات خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوتی نسبت به نمونه معمولی فلز ارائه می‌دهند (۳ و ۴). نانوذرات فلزی تولید شده توسط فناوری نانو، به دلیل کاربردهای بسیار در زمینه‌های زیست‌پزشکی، زیست محیطی، تحویل دارو و نانوپزشکی درخور توجه قرار گرفته است (۵). نانوذرات پارامغناطیسی مگنتیت (Fe_3O_4) با توجه به تأثیر آنها در بسیاری از زمینه‌های کاربردی از قبیل تحویل دارو، تصویربرداری با تشدید مغناطیسی، جداسازی سلول، مهندسی بافت، فعالیت ضد میکروبی و درمان هایپرترمی^۱ برای سرطان، طی چند دهه اخیر شایان توجه دانشمندان قرار گرفته است. اندازه ذرات، خواص مغناطیسی و خواص سطحی نانوذرات مذکور اهمیت زیادی دارند. گزارش شده است این خواص تأثیر گرفته از روش سنتز هستند (۶). نانوذرات مگنتیت در مطالعات ردیابی سلول، تحویل ژن، کنترل الگوی سلولی و ساخت بافت‌های پیچیده سه‌بعدی نیز کاربرد دارند (۷). طیف گسترده‌ای از روش‌های فیزیکوشیمیایی برای سنتز نانوذرات Fe_3O_4 ، از جمله روش هیدروترمال^۲، روش سل‌ژل^۳، روش هم‌رسوبی، حلال گرمایی، سنتز

الکتروشیمیایی و سونوشیمیایی گزارش شده است (۸ و ۹). روش‌های شیمیایی و فیزیکی به‌دلیل پیچیدگی فرایند، گران قیمت بودن، آلودگی زیست محیطی به دلیل استفاده از مواد شیمیایی سمی و عدم استفاده از نانوذرات حاصل در کاربردهای زیستی، برای تولید مواد زیست‌سازگار مناسب نیستند (۱۰)؛ بنابراین، توسعه روش‌های زیستی به عنوان یک روش نسبتاً ساده، ارزان و سازگار با محیط زیست برای سنتز نانوذرات از اهمیت بالایی برای گسترش کاربردهای زیست پزشکی آنها برخوردار است (۱۱). در دو دهه گذشته مطالعات زیادی برای تولید میکروبی نانوذرات مگنتیت انجام شده که به شناسایی جدایه‌های باکتری و قارچی مختلف شامل سویه‌های *آسیتوباکتر*^۴ (۱۲)، *ورتیسلیوم*^۵ و *فوزاریوم*^۶ (۱۳)، *ترموتروباکتر*^۷ (۱۴)، *باسیلوس سابتیلیس*^۸ (۱۵)، *تیوباسیلوس تیوپاروس*^۹ (۱۶)، *باسیلوس مگاتریوم*^{۱۰} (۱۷) منجر شده‌اند. میکروب‌های اندوفیتی (باکتری یا قارچ) در یک رابطه همزیستی با گیاهان اند. تراکم بیشتری از اندوفیت‌ها در قسمت‌های زیرزمینی گیاهان نسبت به قسمت‌های بالایی زمین وجود دارد و بیشتر در ریشه‌ها یافت می‌شوند. برای همزیستی پایدار، اندوفیت‌ها ترکیبات مختلفی را ایجاد می‌کنند که رشد گیاه را تحریک می‌کند و مکانیسم دفاعی گیاهان را بهبود می‌بخشد و آنها را از بیماری‌زاهای گیاهی محافظت می‌کند (۱۸). به تازگی، سنتز نانوذرات مختلف شامل نقره، طلا، مس، اکسید روی، کلرید کلسیم، اکسید کبالت و اکسید منیزیم از طریق اندوفیت‌ها گزارش شده که افق جدیدی از تحقیقات روی روابط زیست‌شناسی و فناوری نانو را به وجود آورده است (۱۹)؛ با این حال، مطالعه‌ای در ارتباط با قابلیت سنتز زیستی نانوذرات مگنتیت توسط باکتری‌های اندوفیت انجام نشده است.

شدند و پس از شستشو با آب مقطر، به منظور ضد عفونی سطحی بافت‌ها به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد وزنی / حجمی و سپس به مدت ۲ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد وزنی / حجمی و پس از آن در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شدند. برای حذف هیپوکلریت سدیم، بافت‌های ضد عفونی شده سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده می‌شوند. بافت‌های ضد عفونی شده به طور کامل له و ۱۰ میلی لیتر آب به هر نمونه اضافه شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده روی محیط کشت نوترینت آگار غنی شده با ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر به صورت چمنی کشت داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد برای رشد کلنی‌ها در داخل انکوباتور نگهداری شدند (۲۰)؛ در نهایت، جدایه‌های خالص باکتری با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی انتخاب شدند.

بررسی توانایی سنتز برون سلولی نانوذرات مگنتیت

توسط جدایه‌های باکتری اندوفیت تحت استراتژی عصاره عاری از سلول: از استراتژی عصاره عاری از سلول^{۱۸} برای بررسی سنتز برون سلولی نانوذرات مگنتیت و انتخاب جدایه باکتری برتر استفاده شد (۲۱). برای این منظور، از محیط کشت نوترینت آگار یک لوب کامل کلنی خالص از باکتری‌های رشد یافته (کشت ۲۴ ساعته) در محیط کشت نوترینت برات (۵۰ میلی لیتر محیط کشت مایع در ارلن‌های ۲۵۰ میلی لیتری) تلقیح و در انکوباتور شیکردار به مدت ۲۴ ساعت با دور ۲۰۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. از این محیط به عنوان کشت بذری به منظور تلقیح در محیط‌های کشت استفاده شد. یک درصد از سوسپانسیون باکتری‌های تهیه شده (با غلظت معادل نیم مک فارلند

میکروب‌های اندوفیت همزیست با گیاهان دارای مخزن منحصربه‌فرد از متابولیت‌های ثانویه بالقوه‌اند که تمایل به کاهش (احیا) یون‌های فلزی به نانوذرات دارند. در این مطالعه، قابلیت سویه‌های بومی اندوفیت به عنوان زیست کاتالیزگر در سنتز نانوذرات مگنتیت بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و محیط‌های کشت استفاده شده:

اکسید آهن (III) با فرمول شیمیایی Fe_2O_3 با خلوص بالای ۹۹ درصد از شرکت سیگما - آلد ریچ^{۱۱} آمریکا خریداری شد. محیط کشت نوترینت برات (پپتون ۱۰ گرم در لیتر، عصاره گوشت ۱۰ گرم در لیتر و نمک کلرید سدیم ۵ گرم در لیتر) از هایمدیا^{۱۲} هند خریداری شد. آگار و محیط‌های کشت سیمون سترات آگار، نشاسته آگار و کازئین آگار از شرکت مرک^{۱۳} آلمان خریداری شدند. کیت رنگ آمیزی گرم از تالیژن پارس واقع در شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان تهیه شد. دیسک اکسیداز از پادتن طب ایران خریداری شد. کیت استخراج DNA شرکت متابیون^{۱۴} آلمان خریداری شد. برای تهیه ژل آگارز از آگارز تهیه شده از سیگما - آلد ریچ استفاده شد. مواد به کاررفته در واکنش زنجیره ای پلیمراز^{۱۵} شامل مسترمیکس^{۱۶} و آغازگرهای جهانی^{۱۷} از شرکت سیناژن ایران تهیه شدند.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت و خالص سازی

آنها: ۲۲ جدایه باکتری اندوفیت جدا شده از ریشه گیاه توت‌فرنگی جمع‌آوری شده از مزارع مختلف توت‌فرنگی در استان کردستان، به عنوان جدایه‌های منتخب در بررسی سنتز زیستی نانوذرات مگنتیت استفاده شدند. برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت، نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، به قطعات کوچک‌تر تقسیم

۱۰^۸CFU/ml در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت برات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر مدور (۲۰۰ دور در دقیقه)، به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. به منظور جدا کردن توده زیستی باکتری از محیط کشت مایع نوترینت برات، از سانتریفیوژ یخچال دار با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. بعد از سه بار شستشو با آب دوبار تقطیر استریل، ۵ گرم از توده زیستی مذکور در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استریل ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور دار در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر rpm ۲۰۰ قرار داده شد. توده زیستی باکتری با استفاده از سانتریفیوژ پس از طی دوره انکوباسیون، جدا و از عصاره عاری از توده زیستی باکتری جمع‌آوری شده به عنوان بیوکاتالیست برای تبدیل زیستی اکسید آهن Fe₂O₃ به نانو اکسید آهن مگنتیت (Fe₃O₄ NP) استفاده شد. برای این منظور محلول استوک Fe₂O₃ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌مولار، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از عصاره عاری از سلول باکتری اضافه شده و در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر rpm ۲۰۰ به مدت زمان ۴۸ ساعت انکوبه‌گذاری شد. به عنوان محیط‌های کنترل منفی به‌طور همزمان از محلول اکسید آهن Fe₂O₃ (بدون تلقیح عصاره عاری از سلول) و عصاره عاری از سلول (بدون حضور Fe₂O₃) استفاده شد. ویژگی نانوذرات مگنتیت تشکیل شده در محلول واکنش، مورد آنالیزهای چشمی و اسپکتروفتومتری مرئی-ماورای بنفش^{۱۹} قرار داده شد (۲۲).

شناسایی فنوتیپی و مولکولی جدایه باکتری

اندوفیت منتخب: شناسایی اولیه جدایه باکتری BR06 با

آزمایش‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی نظیر بررسی رنگ کلنی، واکنش رنگ آمیزی گرم، بررسی شکل میکروسکوپی باکتری با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی روبشی، تست‌های کاتالاز و اکسیداز، توانایی تولید اسپور، تست مصرف سیتрат، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، تست احیای نیترات، رشد در دماها و pHهای مختلف، رشد در غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم، تولید اسید از منابع کربوهیدراتی (گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، لاکتوز، سوکروز، آرابینوز، تری‌هالوز و گلیکوزن) براساس دستورالعمل کتاب برگگی^{۲۰} انجام شد (۲۳). به منظور استخراج DNA ژنومی، از کیت استخراج DNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. با هدف شناسایی مولکولی جدایه باکتری BR06 از آغازگرهای جهانی ژن 16s rDNA fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')^{۲۱} و (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3')^{۲۲}

استفاده شد (۲۴). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (BioRAD ساخت کشور آمریکا) با حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، یک میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت (با غلظت اولیه ۲۵ میکرومولار)، یک میکرولیتر DNA الگو (با غلظت ۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل انجام شد. چرخه حرارتی به‌صورت یک چرخه واسرشت‌سازی^{۲۳} اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد شروع شد و در ادامه به‌صورت ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۲ درجه به مدت یک دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نظر

معرض Fe_2O_3 ، با استفاده از تغییر رنگ، آنالیز طیف‌های اسپکتروفتومتری در ناحیه فرابنفش^{۲۶} (Specord 210 ساخت کشور آلمان)، طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز^{۲۷} (Bruker Vector 22 ساخت کشور آلمان)، الکترومیکروگراف‌های تهیه‌شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۲۸} مجهز به طیف‌سنج پراش انرژی پرتو ایکس (TESCAN Mira 3-LMu ساخت کشور چک) و همچنین دستگاه طیف‌سنجی پراش اشعه ایکس^{۲۹} (Philips X'Pert-MPD ساخت کشور هلند) بررسی شدند. با هدف تعیین طیف جذبی اسپکتروفتومتری محلول رویی به‌دست آمده از سانتی‌فیوژ، نمونه‌ها با سرعت $10000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتی‌فیوژ شدند و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر بررسی شد. به‌منظور استخراج نانوذرات مگنتیت تشکیل‌شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی، ابتدا عصاره‌عاری از توده زیستی باکتری از فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده و بعد از آن با هدف رسوب نانوذرات، از سانتی‌فیوژ با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. در آخر، بعد از چند بار شستشوی نانوذرات با استفاده از آب دیونیزه‌شده سترون، نمونه نانوذره در دستگاه خشک‌کن انجمادی^{۳۰} (Alpha 1-2Dplus ساخت کشور آلمان) به مدت ۲۴ ساعت، خشک و آنالیزهای ذکرشده روی آنها انجام شد (۲۷). از آنالیز SEM-EDX به‌منظور بررسی شکل، اندازه ذرات و عناصر تشکیل‌دهنده ترکیب نانوذرات استفاده شد. از نرم‌افزار ImageJ ورژن ۱/۵۲ a و با شمارش حداقل ۱۲۰ ذره برای بررسی توزیع نانوذرات و تعیین میانگین قطر نانوذرات استفاده شد. از آنالیز FTIR به‌منظور شناخت گروه‌های عاملی دخیل در ماکرومولکول‌های احتمالی در گیر در سنتز و پایداری

گرفته شد. محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شد (۲۵). توالی‌یابی محصول واکنش PCR توسط ABI3730xl DNA sequencer شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد. توالی‌های به‌دست آمده پس از ویرایش توسط نرم‌افزار BioEdit با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات ژن با استفاده از ابزار جستجوی بلاست^{۳۴} مقایسه شدند. در نهایت درخت فیلوژنی به روش Neighbor Joining با بوت استرپ^{۳۵} ۱۰۰۰ و با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۷ انجام شد (۲۶).

اثر غلظت‌های مختلف Fe_2O_3 بر تولید برون سلولی نانوذره مگنتیت: برای بررسی اثر غلظت‌های اولیه پیش‌ساز Fe_2O_3 بر سنتز برون سلولی نانوذره مگنتیت (Fe_3O_4 NP)، غلظت‌های مختلفی از Fe_2O_3 شامل ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار به عصاره‌عاری از توده زیستی اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت، تشکیل نانومگنتیت با روش اسپکتروفتومتر بررسی شد. گفتنی است تمام آزمایش‌ها در این مرحله در دمای واکنش ۲۵ درجه سانتی‌گراد، pH برابر ۷ و دور شیکر برابر ۲۰۰ rpm انجام شدند. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند (۲۷).

اثر دوره انکوباسیون: به‌منظور تعیین بهترین زمان واکنش تبدیل زیستی تحت استراتژی عصاره‌عاری از سلول، اثرات دوره انکوباسیون شامل ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت روی سنتز برون سلولی نانومگنتیت در غلظت بهینه اکسید آهن فریک بررسی شد. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند (۲۱).

مشاهدات ظاهری و دستگاهی برای تأیید سنتز زیستی برون سلولی نانوذرات مگنتیت: نانوذرات مگنتیت تشکیل‌شده در مخلوط واکنش حاصل از برهمکنش عصاره‌عاری از سلول جدایه باکتری اندوفیت BR06

قهوه‌ای تیره تغییر رنگ داده بود. آنالیز نمونه‌ها با اسپکتروفتومتری مرئی ماورای بنفش یک پیک جذبی را در طول موج ۲۵۲ نانومتر نشان داد که براساس منابع معتبر بیشینه پیک جذبی نانوذرات مگنتیت در طول موج‌های بین ۲۵۰ تا ۳۵۰ است (۲۲). در محلول تیمار نشده (عاری از عصاره عاری از سلول)، در طول موج‌های بین ۲۵۰ تا ۴۰۰ نانومتر، هیچ پیک جذبی مرتبط با رزونانس پلاسمون سطحی مشاهده نشده است (شکل ۱).

شناسایی فنوتیپی و مولکولی جدایه منتخب BR06:

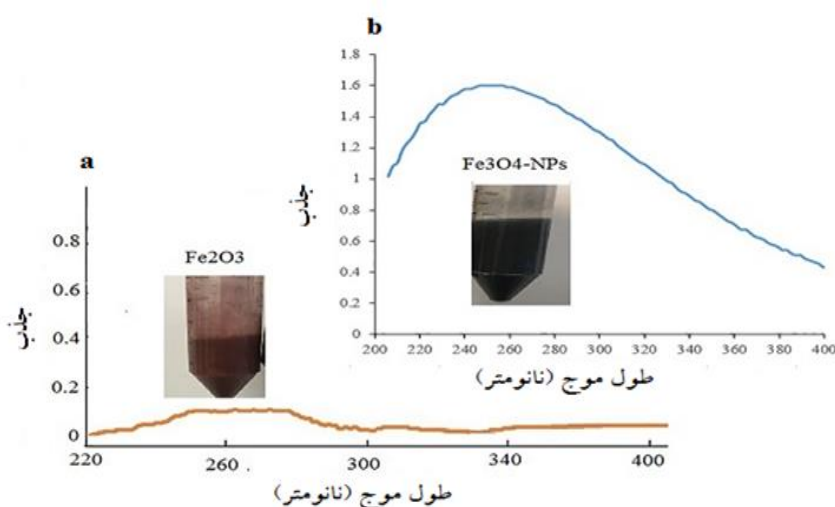
جدایه باکتری اندوفیت باکتری BR06 انتخاب شد که براساس طیف‌سنجی توانایی احیای زیستی Fe_2O_3 به نانوذرات Fe_3O_4 را داشت و براساس خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک، انجام تست‌های بیوشیمیایی و آنالیزهای مولکولی و فیلوژنتیکی شناسایی شد. با توجه به شکل ۲، جدایه باکتری منتخب به صورت میله‌ای شکل با میانگین ابعاد 0.7 ± 0.1 تا 1.6 ± 0.1 میکرون از نظر طول، 0.4 ± 0.1 تا 0.85 ± 0.1 از نظر عرض و دارای کلنی‌های موکونیدی به رنگ سفید کرمی شکل است.

نانوذرات استفاده شد. الگوی طیف‌سنج پراش اشعه ایکس با لامپی از جنس آند مس با طول موج $K\alpha$ حدود 1.54 آنگستروم در 40 کیلوولت و 40 میلی‌آمپر با هدف تعیین ساختار کریستالی نانوذرات تشکیل شده در واکنش زیست تبدیلی استفاده شد.

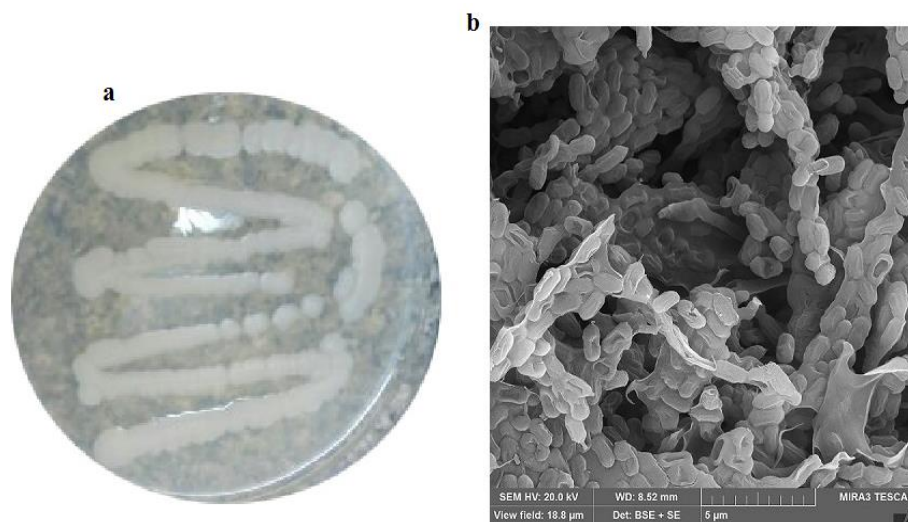
نتایج

غربالگری سوبه‌های باکتری با قابلیت سنتز

برون سلولی نانوذرات مگنتیت: ۲۲ جدایه باکتری
اندوفیت در آزمایشات سنتز برون سلولی نانوذرات مگنتیت (Fe_3O_4) تحت استراتژی عصاره عاری از سلول بررسی شدند. براساس نتایج به دست آمده تنها جدایه باکتری BR06 (جدا شده از ریشه گیاه توت‌فرنگی مزارع توت‌فرنگی مریوان) قادر به تبدیل زیستی پیش‌ساز Fe_2O_3 به نانومگنتیت (Fe_3O_4 NP) در غلظت $2/5$ میلی‌مولار بود که با استفاده از تغییر رنگ و طیف‌سنجی جذبی اسپکتروفتومتری مشخص شد. Fe_2O_3 تیمار نشده با عصاره عاری از سلول (محیط کنترل) دارای رنگ قرمز آجری است؛ در حالی که در نمونه تیمار شده با عصاره عاری از سلول، رنگ محلول واکنش به دلیل تشکیل نانوذرات مگنتیت به رنگ



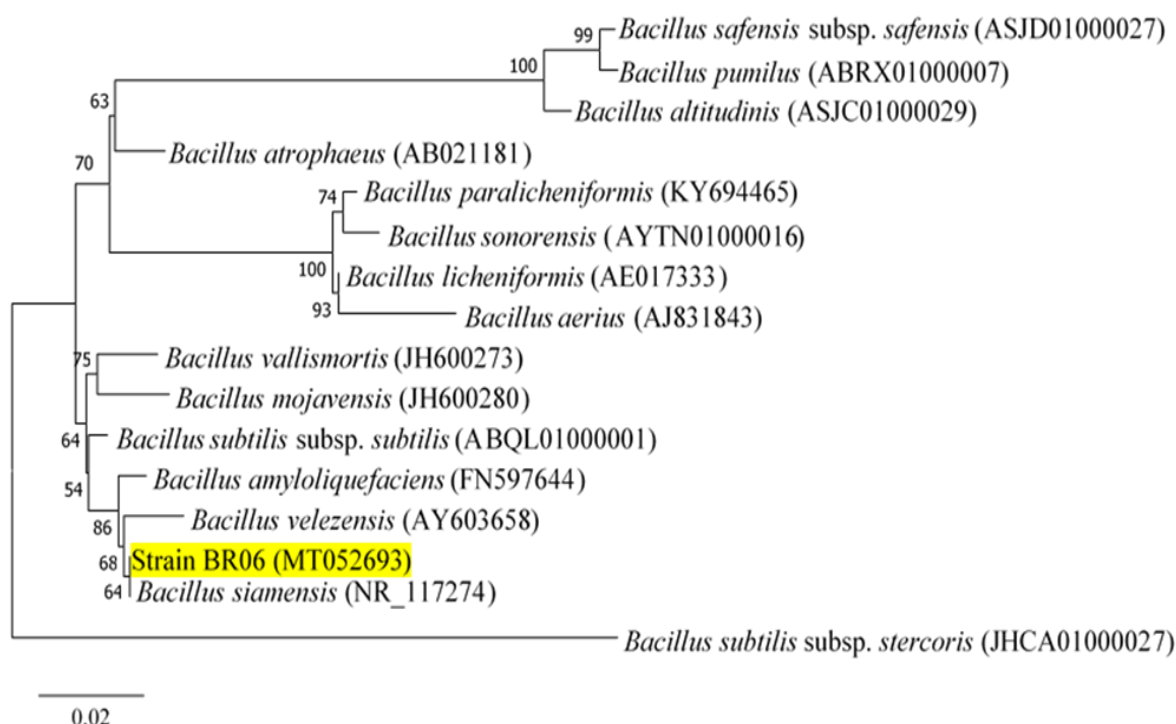
شکل ۱- آنالیزهای اسپکتروفتومتری محلول Fe_2O_3 (در غلظت ۲/۵ میلی مولار) تیمار نشده (a) و Fe_2O_3 تیمار شده (b) با عصاره عاری از سلول جدایه باکتری BR06 در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد و دور شیکر ۲۰۰ rpm پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری



شکل ۲- ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه باکتری منتخب BR06. (a) کلنی باکتری در محیط کشت نوترینت آگار پس از ۲۴ ساعت گرم‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و (b) تصویر میکروسکوپ الکترونی SEM جدایه باکتری

جدایه باکتری BR06 به‌طور موقت به‌عنوان باسیلوس سیامنسیس^{۳۱} تشخیص داده شد (۲۸). به دنبال آن و به منظور تعیین هویت دقیق جدایه باکتری منتخب، ژن *16S rDNA* از طریق آغازگرهای همگانی و به روش PCR تکثیر شد. نتایج حاصل از بلاست کردن در سایت NCBI نشان داد جدایه مذکور مشابهت بیش از ۹۹ درصدی با سویه‌های متعلق به گونه باکتری باسیلوس سیامنسیس دارد. تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنیک تأیید کرد جدایه باکتری مذکور متعلق به جنس باسیلوس است و از نظر قرابت ژنتیکی بیشترین نزدیکی را با گونه باکتری باسیلوس سیامنسیس دارد. در ادامه نتایج ترسیم درخت فیلوژنتیک به روش Neighbor-Joining تأیید کرد جدایه باکتری BR06 را می‌توان از نظر تاکسونومی به‌عنوان سویه‌ای از جنس باسیلوس طبقه‌بندی کرد (شکل ۳).

در ادامه و با انجام تست‌های بیوشیمیایی متداول در تشخیص باکتری‌ها مشخص شد جدایه مذکور باکتری گرم مثبت اسپوردار بوده است که از نظر تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، تست احیای نیتрат، هیدرولیز ژلاتین و هیدرولیز نشاسته، مثبت و در مقابل از نظر تست‌های اکسیداز و مصرف سیترات منفی بود. باکتری مذکور قابلیت رشد در دماهای ۴ تا ۵۵ درجه سانتی گراد، رشد در pHهای ۴ تا ۱۰ و همچنین رشد در شرایط بدون حضور نمک و درصدهای مختلف نمک کلرید سدیم تا ۱۴ درصد را داشت. همچنین از نظر تولید اسید از منابع کربوهیدراتی، تولید اسید از گلوکز، فروکتوز، سوکروز، گالاکتوز و لاکتوز، مثبت و از نظر تست تخمیر آرایینوز و تری‌هالوز منفی بود. براساس نتایج ویژگی‌های فنوتیپی و تست‌های بیوشیمیایی، کتاب‌های مرجع و مقالات منتشرشده در این ارتباط،

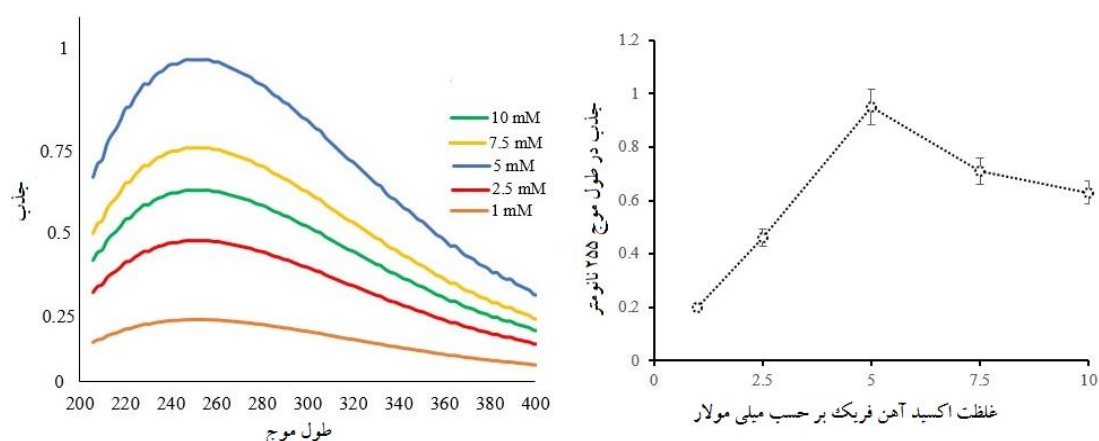


شکل ۳- درخت فیلوژنی رسم شده براساس توالی ژنی 16S rDNA که وابستگی جدایه باکتری BR06 را با جدایه‌های باکتری متعلق به گونه‌های مختلف جنس باسیلوس نشان می‌دهد. درخت مذکور براساس الگوریتم neighbor-joining و به کمک نرم‌افزار 7 MEGA ترسیم شد. اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده شماره دسترسی سویه‌های باکتری ثبت شده در بانک ژنی است.

اثر غلظت‌های مختلف Fe_2O_3 : همان گونه که در

شکل ۴ نشان داده شده است، با افزایش غلظت اولیه Fe_2O_3 از ۱ تا ۵ میلی مولار، افزایش تدریجی در طیف جذبی در رابطه با تشکیل خارج سلولی نانوذرات مگنتیت در واکنش زیست تبدیلی تحت استراتژی عصارة عاری از سلول، پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری، در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد، pH برابر ۷ و

دور شیکر ۲۰۰ rpm مشاهده می شود. بیشینه سنتز در غلظت ۵ میلی مولار وجود دارد. در غلظت‌های بالاتر از ۵ میلی مولار سنتز برون سلولی نانوذرات مگنتیت احتمالاً به دلیل سمیت Fe_2O_3 کاهش یافته است. با توجه به نتایج به دست آمده از غلظت بهینه ۵ میلی مولار برای آزمایشات بعدی استفاده شد.

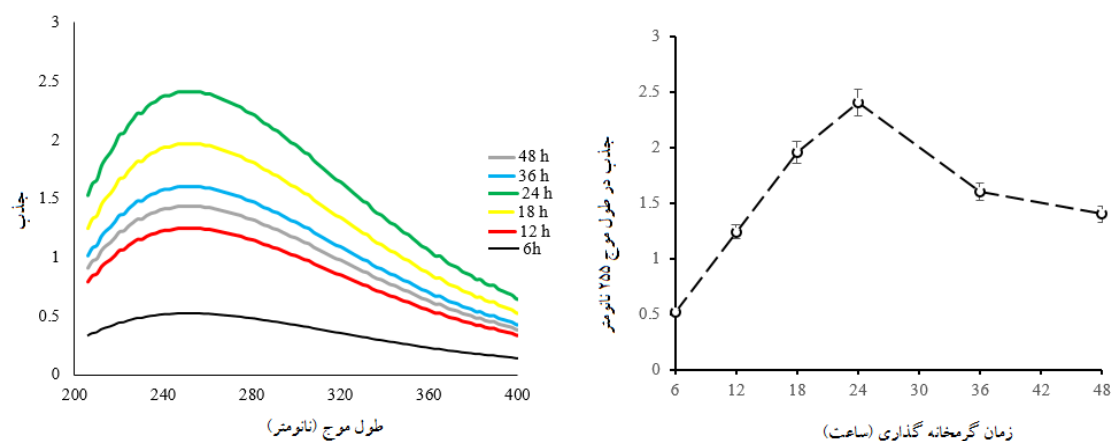


شکل ۴- نتایج طیف های جذبی اسپکتروفتومتری مرتبط با تأثیر غلظت های مختلف Fe_2O_3 بر سنتز برون سلولی نانوذرات مگنتیت در مخلوط واکنش حاوی عصاره عاری از سلول *B. siamensis* strain BR06 تیمار شده با Fe_2O_3 . نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار ± 1 معرف انحراف معیار است.

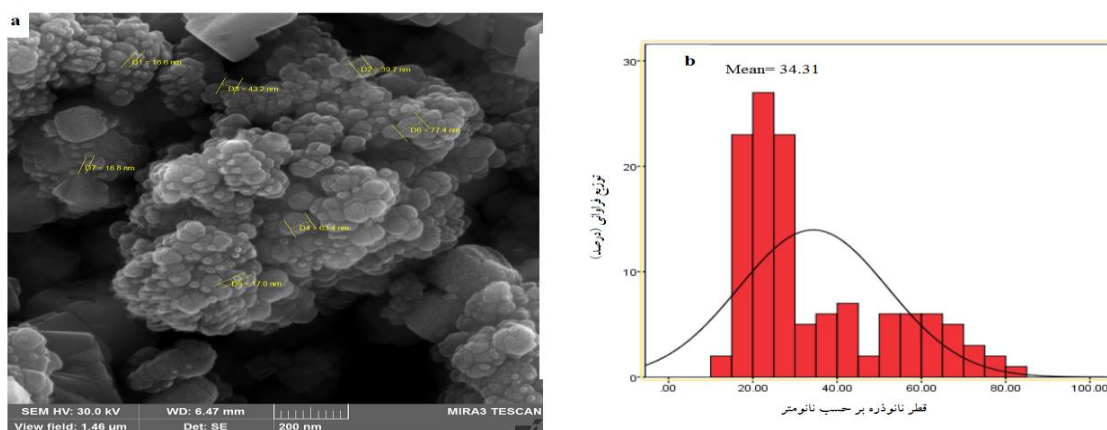
درحالی که در بازه های زمانی ۳۶ تا ۴۸ ساعت، طیف نسبتاً ثابت مانده که نشان دهنده پایداری نانوذرات خارج سلولی تشکیل شده در مخلوط واکنش است.

نتایج آنالیزهای مرتبط با میکروسکوپ الکترونی و طیف سنجی نانوذرات مگنتیت تولید شده از طریق استراتژی عصاره عاری از سلول: نانوذرات مگنتیت تولیدی به وسیله عصاره عاری از سلول در شرایط بهینه (غلظت بهینه ۵ میلی مولار و دوره انکوباسیون ۲۴ ساعت)، پس از استخراج و خشک کردن با دستگاه فریز درایر، به منظور تعیین مورفولوژی و دامنه پراکنش ذرات توسط میکروسکوپ الکترونی SEM بررسی شدند که نتایج در شکل ۶ نشان داده شده اند.

اثر دوره انکوباسیون: به منظور بهبود احیای زیستی Fe_2O_3 به نانوذرات مگنتیت در شرایط بهینه به دست آمده در مراحل قبل واکنش (غلظت بهینه ۵ میلی مولار)، اثر زمان انکوباسیون (۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت) سنجش شد (شکل ۵). براساس نتایج به دست آمده، سنتز نانوذرات مگنتیت پس از ۶ ساعت واکنش در حضور عصاره عاری از سلول آغاز شده و پس از ۲۴ ساعت به بیشینه مقدار خود رسیده است. به عبارت دیگر بیشترین طیف جذبی نانوذرات تشکیل شده در مخلوط واکنش زیست تبدیلی پس از ۲۴ ساعت مشاهده شده است. در فاصله زمانی ۲۴ تا ۳۶ ساعت، یک کاهش تدریجی در طیف جذبی نانوذرات مگنتیت مشاهده شده است؛



شکل ۵- نتایج طیف‌های جذبی اسپکتروفتومتری مرتبط با تأثیر زمان انکوباسیون بر سنتز برون‌سلولی نانوذرات مگنتیت در مخلوط واکنش حاوی عصاره عاری از سلول *B. siamensis* strain BR06 تیمار شده با Fe_2O_3 در غلظت بهینه ۵ میلی‌مولار. نتایج ارائه شده میانگین سه بار آزمایش بوده و بار ± 1 معرف انحراف معیار است.



شکل ۶- (a) تصاویر حاصل از FESEM نانوذرات برون سلولی مگنتیت تولیدی تحت استراتژی CFE و (b) هیستوگرام توزیع اندازه نانوذرات مگنتیت

برای مشخص کردن ساختار کریستالی نانوذرات برون سلولی مگنتیت سنتز شده توسط باکتری اندوفیت *B. siamensis* strain BR06 آزمون پراش اشعه ایکس (XRD) انجام شد. الگوی XRD نانوذرات تهیه شده در شکل ۸ آورده شده است. پیک‌های قابل رؤیت به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (۲۲۰)، (۳۱۱)، (۴۰۰)، (۴۲۲)، (۵۱۱) و (۴۴۰) است که با تطابق پیک‌های این صفحات و زوایای پرش آنها با نمونه استاندارد نانوذرات

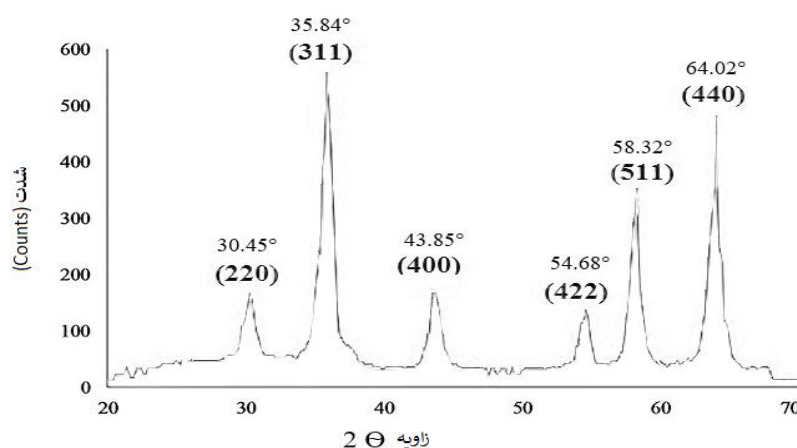
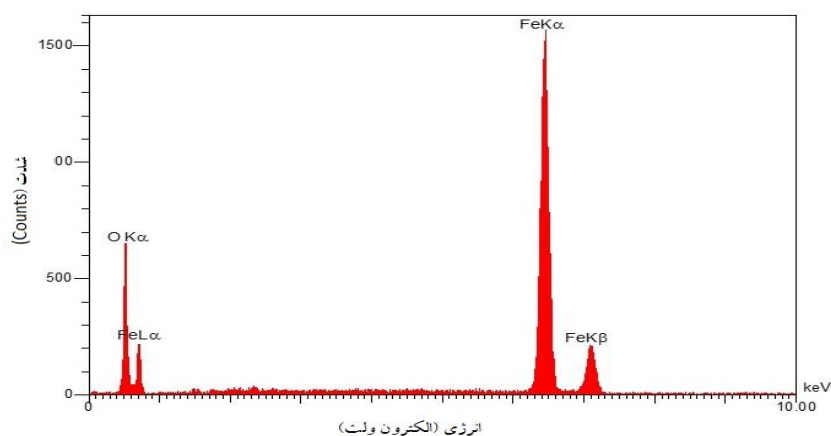
با توجه به شکل ۶، بررسی ساختار سطحی نانوذرات تولیدی توسط میکروسکوپ الکترونی FESEM، سنتز نانوذرات مگنتیت کروی به صورت گل کلمی با میانگین اندازه ذرات ۳۴ نانومتری را نشان می‌دهد. در ادامه، طیف EDS که با هدف تجزیه و تحلیل ساختاری نانوذرات مگنتیت سنتزی صورت گرفت، حضور پیک‌های مربوط به عناصر آهن و اکسیژن را در نانوذرات سنتزی نشان داد (شکل ۷).

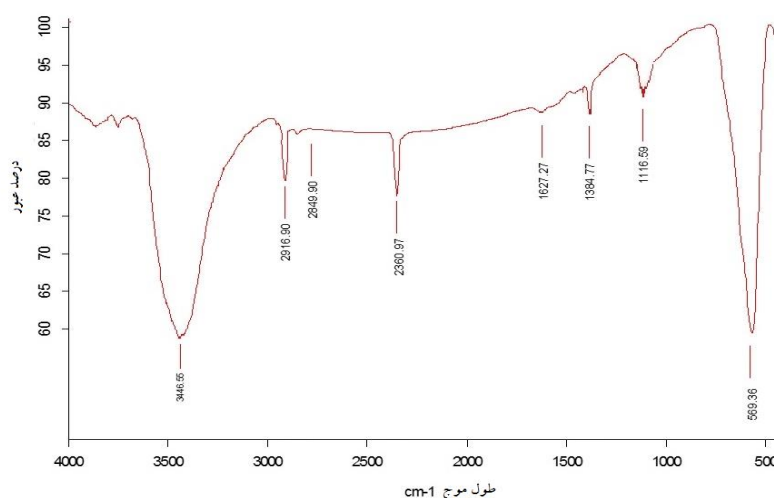
مگنتیت، مگنتیت بودن نانوذرات اکسید آهن تولید شده در این مطالعه تأیید شد (۲۹).

در ادامه و به منظور بررسی گروه‌های عاملی پوشاننده دخیل در سنتز و پایداری نانوذرات مگنتیت سنتزی، آنالیز FTIR انجام شد. برای این منظور پودر خشک شده نانوذرات مگنتیت در دمای ۸۰۰ درجه سانتی گراد توسط FTIR آنالیز شد (شکل ۹).

بر اساس مشخصه‌یابی طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، پیک نسبتاً پهن در ناحیه 3446 cm^{-1} متعلق به گروه هیدروکسیل (-OH) است. پیک ظاهر شده در محدوده ۲۹۱۶ مربوط به گروه C-H کششی موجود در

ترکیبات آلی است. پیک ظاهر شده در ناحیه ۲۳۶۰ متعلق به گروه کربونیل (C=O)، پیک در ناحیه ۱۳۸۴ متعلق به گروه C-H و پیک در ناحیه ۱۱۱۶ مربوط به گروه C-O کششی است. همچنین نمایان شدن پیک در نواحی ۴۴۷ و ۵۵۹ مربوط به تشکیل پیوندهای فلزی و نشان‌دهنده باندهای Fe-O مربوط به نانوذرات مگنتیت است. در مجموع به نظر می‌رسد گروه‌های عاملی -OH، C-O، C=O و C-H مرتبط با ترکیبات آلی موجود در عصاره عاری از سلول باکتری مذکور به‌عنوان عامل پوشاننده^{۳۲} در سنتز زیستی نانوذرات مگنتیت نقش داشته‌اند (۳۰).





شکل ۹- طیف جذب FTIR نانوذرات برون‌سلولی مگنتیت سنتز شده تحت استراتی CFE

بحث و نتیجه‌گیری

سنتز و کاربردهای نانومواد از دهه گذشته تاکنون بخش جالبی از فناوری نانو بوده است. چندین روش فیزیکی و شیمیایی برای سنتز نانوذرات عنصری، اکسید فلزی و سولفید فلزی استفاده شده است. روش‌های فیزیکی کار بسیار دشواری است؛ درحالی‌که روش‌های شیمیایی معمولاً شامل استفاده از مواد کاهش‌دهنده مختلف، فرایند رادیولیز و تکنیک‌های الکتروشیمیایی‌اند. با این حال، به دلیل تولید پسماندهای خطرناک و مقرون به صرفه نبودن، روش‌های فیزیکوشیمیایی ارجحیت کمتری دارند (۱ و ۴). استفاده از مواد شیمیایی سمی نیز کاربردهای پزشکی نانوذرات را در زمینه‌های بالینی محدود می‌کند. مسیرهای زیستی سنتز نانوذرات فلزی از طریق میکروب‌ها به دلیل سمیت کم، زیست‌سازگاری و دوست‌دار محیط زیست بودن شایان توجه بسیاری قرار می‌گیرند. توسعه فرایندهای مبتنی بر شیمی سبز برای سنتز نانوذرات با اشکال، اندازه و پراکندگی دقیق، یک منطقه قابل رشد از نانوزیست فناوری است (۴ و ۵). سنتز برون‌سلولی و درون‌سلولی

نانوذرات مگنتیت توسط میکروارگانیسم‌های مختلف گزارش شده است. بهاراد^{۳۳} و همکاران با استفاده از سویه باکتری *Acientobacter sp.* در مخلوط واکنش حاوی فروسیانید پتاسیم / فریک سیانید پتاسیم موفق به سنتز نانوذرات مکعبی مگنتیت با ابعاد ۱۰ تا ۴۰ نانومتر پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند (۱۲). در تحقیق مشابهی بهاراد و همکاران با استفاده از سویه‌های قارچی *Verticillium sp.* و *Fusarium oxysporum* موفق به سنتز برون‌سلولی نانوذرات کروی مگنتیت با پراکنش اندازه ذرات ۲۰ تا ۵۰ نانومتری شدند (۱۳). مون^{۳۴} و همکاران با استفاده از سویه باکتری *Thermoanaerobacter sp.* TOR-39 و طی یک واکنش تخمیری موفق به سنتز نانوذرات مغناطیسی مگنتیت با میانگین اندازه ۱۳ نانومتری شدند (۱۴). ساندرام^{۳۵} و همکاران به کمک سویه باکتری *Bacillus subtilis* جداشده از خاک ریزوسفری موفق به سنتز برون‌سلولی نانوذرات مغناطیسی مگنتیت با پراکنش اندازه ذرات ۶۰ تا ۸۰ نانومتری شدند (۱۵). السی^{۳۶} و همکاران موفق به سنتز نانوذرات مغناطیسی مگنتیت

مگنتیت برون سلولی تولیدی به وسیله عصاره عاری از سلول در شرایط بهینه (غلظت ۵ میلی مولار اکسید آهن فریک و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون)، کروی به شکل گل کلمی با میانگین اندازه ذرات ۳۴ نانومتری اند. سنتز برون سلولی شامل ترشح آنزیم های خارج سلولی، کاهش زیستی و کلاهیك گذاری ذرات است که کاربردهای زیادی در زمینه های مختلف دارد (۳۱). مزیت سنتز برون سلولی فرایندهای پایین دستی و تصفیه راحت تر از روش های داخل سلولی است (۳۲). از دستاوردهای حاصل از این پژوهش می توان به معرفی جدایه های باکتری اندوفیت به عنوان یک منبع زیستی بالقوه به منظور تولید برون سلولی نانوذرات کوچک و با اندازه مطلوب مگنتیت تحت استراتژی عصاره عاری از سلول اشاره کرد. امید است با بهینه سازی شرایط واکنش زیست تبدیلی بتوان به سنتز برون سلولی نانوذرات با کفایت مگنتیت در مقیاس های وسیع^{۳۸} با امکان استفاده در زمینه های مختلف صنعتی و دارویی دست یافت.

سپاسگزاری

این مقاله پژوهشی مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم یگانه مس چی (کد رهگیری در ایران داک: ۱۴۶۶۳۸۱ تاریخ ۱۳۹۷/۱۰/۱۲) با راهنمایی دکتر مراحم آشنگرف و با حمایت مالی و معنوی دانشگاه کردستان اجرا شده است که بدینوسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می دارد.

References

- (1) Logothetidis S. *Nanotechnology: Principles and Applications*. In: Logothetidis S. (eds) *Nanostructured Materials and Their Applications*. NanoScience and Technology. Springer, Berlin, Heidelberg; 2012.

توسط باکتری احیاکننده آهن با نام *Thiobacillus thioparus* (جداشده از خاک اطراف معادن آهن) شدند (۱۶). قانی^{۳۷} و همکاران با استفاده از باکتری (PTCC1656) *Bacillus megaterium* نانوذرات مگنتیت با شکل مکعبی و اندازه ۴۰ تا ۶۰ نانومتری تولید کردند (۱۷). از میان روش های سنتز سبز با توجه به تنوع و سازگاری زیاد باکتری ها در شرایط شدیداً سخت، ابزارهای مهمی برای به دست آوردن نانوذرات در نظر گرفته می شوند. سنتز باکتریایی نانوذرات به دلیل مصرف کم انرژی و قابلیت کنترل فرایند بسیار امیدوارکننده است. مشخص شده است سنتز خارج سلولی برای استخراج نانوذرات کارآمدتر و آسان تر است؛ در این حالت، بیوسنتز نانوذرات فلزی در برابر اکسیداسیون مقاومت بیشتری دارند و استفاده از آنها در زمینه های مختلف امکان پذیر می شود (۲۱ و ۳۲). در این پژوهش، شناسایی جدایه باکتری اندوفیت با قابلیت تولید برون سلولی نانوذرات مگنتیت مطالعه و بررسی شد. میکروب های اندوفیت به صورت رابطه همزیستی با گیاهانی زندگی می کنند که دارای مخزن منحصربه فرد و همه جانبه از متابولیت های ثانویه بالقوه درمانی اند و به کاهش (احیا) یون های فلزی به نانوذرات تمایل دارند (۱۸ و ۱۹). به همین منظور، ۲۲ جدایه باکتری اندوفیت جداشده از قسمت های مختلف گیاه توت فرنگی، جمع آوری و در آزمایشات تولید خارج سلولی نانوذرات مگنتیت (Fe_3O_4) و به وسیله استراتژی عصاره عاری از سلول بررسی شدند. پس از انجام آزمایشات مشخص شد جدایه باکتری strain BR06 B. *siamensis* قادر به تبدیل زیستی پیش ساز Fe_2O_3 به نانومگنتیت (Fe_3O_4NP) بود که با استفاده از طیف سنجی و میکروسکوپی مشخص شد. نانوذرات

- (2) Ghosh CR, Paria S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chemical reviews*. 2011; 112 (4): 2373-433.
- (3) Chmid G, Corain B. Nanoparticulated gold: syntheses, structures, electronics, and reactivities. *European Journal of Inorganic Chemistry*. 2003; 17: 3081-98.
- (4) Gour A, Jain NK. Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2019; 47 (1): 844-51.
- (5) Singh P, Kim YJ, Zhang D, Yang DC. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in biotechnology*. 2016; 34 (7): 588-99.
- (6) Iida H, Takayanagi K, Nakanishi T, Osaka T. Synthesis of Fe_3O_4 nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis. *Journal of colloid and interface science*. 2007; 314 (1): 274-80.
- (7) Hasan A, Morshed M, Memic A, Hassan S, Webster TJ, Marei HE. Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects. *International journal of nanomedicine*. 2018; 13: 5637-55.
- (8) Chaki SH, Malek TJ, Chaudhary MD, Tailor JP, Deshpande MP. Magnetite Fe_3O_4 nanoparticles synthesis by wet chemical reduction and their characterization. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 2015; 6 (3): 035009.
- (9) Ramesh AV, Rama DD, Mohan BS, Basavaiah K. Facile green synthesis of Fe_3O_4 nanoparticles using aqueous leaf extract of *Zanthoxylum armatum* DC. For efficient adsorption of methylene blue. *Journal of Asian Ceramic Societies*. 2018; 6 (2): 145-55.
- (10) Ankamwar B, Damle C, Ahmad A, Sastry M. Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *emblica officinalis* fruit extract, their phase transfer and transmetallation in an organic solution. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2005; 5 (10): 1665-71.
- (11) Saravanan A, Senthil KP, Karishma S, Dai-Viet N Vo, Jeevanantham S, Yaashikaa PR, et al. A review on biosynthesis of metal nanoparticles and its environmental applications. *Chemosphere*. 2021; 264 (2): 128580.
- (12) Bharde A, Wani A, Shouche Y, Joy PA, Prasad BLV, Sastry M. Bacterial aerobic synthesis of nanocrystalline magnetite. *Journal of the American Chemical Society* 2005; 127: 9326-27.
- (13) Bharde A, Rautaray D, Bansal V, Ahmad A, Sarkar I, Yusuf SM, et al. Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi. *Small*. 2006; 2 (1): 135-41.
- (14) Moon JW, Rawn CJ, Rondinone AJ, Love LJ, Roh Y, Everett SM, et al. Large-scale production of magnetic nanoparticles using bacterial fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2010; 37 (10): 1023-31.
- (15) Sundaram PA, Augustine R, Kannan M. Extracellular biosynthesis of iron oxide nanoparticles by *Bacillus subtilis* strains isolated from rhizosphere soil. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012; 17: 835-40.
- (16) Elcey C, Kuruvilla AT, Thomas D. Synthesis of magnetite nanoparticles from optimized iron reducing bacteria isolated from iron ore mining sites. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014; 3: 408-17.
- (17) Ghani S, Rafiee B, Sadeghi D, Ahsani M. Biosynthesis of iron nanoparticles by *Bacillus megaterium* and its anti-bacterial properties. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2017; 19 (7): 13-19.
- (18) Rahman S, Rahman L, Khalil AT, Ali N, Zia D, Ali M, et al. Endophyte-mediated synthesis of silver nanoparticles and their biological applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2019; 103 (6): 2551-69.
- (19) Rana KL, Kour D, Yadav N, Yadav AN. Endophytic microbes in nanotechnology: current development, and potential biotechnology applications. In: Kumar A,

- Singh VK (eds) *Microbial endophytes*. Woodhead Publishing, Cambridge, 2020: 231–62.
- (20) Costa LE, Queiroz MV, Borges AC, Moraes CA, Araujo EF. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012; 43: 1562-75.
- (21) Ashengroph M, Khaledi A, Bolbanabad EM. Extracellular biosynthesis of cadmium sulphide quantum dot using cell-free extract of *Pseudomonas chlororaphis* CHR05 and its antibacterial activity. *Process Biochemistry*. 2020; 89: 63–70.
- (22) Sundaram PA, Augustine R, Kannan M. Extracellular biosynthesis of iron oxide nanoparticles by *Bacillus subtilis* strains isolated from rhizosphere soil. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2012; 17 (4): 835-40.
- (23) Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1994.
- (24) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 1991; 173: 697–703.
- (25) Bereswill S, Bugert P, Bruchmüller I, Geider, K. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61 (7): 2636-42.
- (26) Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016; 33: 1870-74.
- (27) Bolbanabad EM, Ashengroph M, Darvishi F. Development and evaluation of different strategies for the clean synthesis of silver nanoparticles using *Yarrowia lipolytica* and their antibacterial activity. *Process Biochemistry*. 2020; 94: 319-28.
- (28) Sumpavapol P, Tongyonk L, Tanasupawat S, Chokesajjawatee N, Luxananil P, Visessanguan W. *Bacillus siamensis* sp. nov, isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010; 60: 2364-70.
- (29) Cheng FY, Su CH, Yang YS, Yeh CS, Tsai CY, Wu CL, et al. Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials*. 2005; 26: 729-738.
- (30) Colthrup NB, Daly LH, Wiberly SE. *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 3rd ed, pp. 355-386. Academic Press, NY; 1990.
- (31) Singh VK, Singh AK. Role of microbially synthesized nanoparticles in sustainable agriculture and environmental management. In: *Role of plant growth promoting microorganisms in sustainable agriculture and nanotechnology*. Woodhead Publishing. 2019: 55–73.
- (32) Ashengroph M. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Ralstonia* sp. SM8 isolated from the Sarcheshmeh copper mine. *Biological Journal of Microorganisms*. 2014; 3 (9): 53-64.

¹- Hyperthermia

²- Hydrothermal method

³- Sol-gel

⁴- *Acientobacter* sp.

⁵- *Verticillium* sp.

⁶- *Fusarium* sp.

⁷- *Thermoanaerobacter* sp.

⁸- *Bacillus subtilis*

⁹- *Thiobacillus thioiparus*

¹⁰- *Bacillus megaterium*

¹¹- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

¹²- HiMedia

¹³- E. Merck, Darmstadt, Germany

¹⁴- Mi-bacterial Genomic DNA Isolation Kit mi-BD 100

¹⁵- Polymerase chain reaction (PCR)

¹⁶- Master mix

¹⁷- Universal primers

¹⁸- Cell Free Extract= CFE

¹⁹- UV-Vis spectrophotometer

²⁰- Bergey

²¹- Forward primer

²²- Reverse primer

²³- Denaturation

²⁴- BLAST

²⁵- Bootstrap

²⁶- UV-vis spectrophotometer

²⁷- Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

²⁸ - *Field emission scanning electron microscopy equipped with energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)*

²⁹ - *X-ray diffractometer (XRD)*

³⁰ - *Freeze Dryer*

³¹ - *Bacillus siamensis*

³² - *Capping agent*

³³ - *Bharde*

³⁴ - *Moon*

³⁵ - *Sundaram*

³⁶ - *Elcey*

³⁷ - *Ghani*

³⁸ - *Scale-up*