

## جداسازی باکتری های مگنتوتاکتیک تولید کننده نانوذرات آهن از خاک معدن آهن ارجین استان زنجان

**سوان آوادیس یانس:** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

**مجتبی صلوتی:** استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران

**محمد مهدی سلطان دلال:** استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران - نویسنده رابط: soltanirad34@yahoo.com

**روناک بختیاری:** کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** نانوذرات آهن کاربرد وسیعی در علم پزشکی به خصوص در ساخت شناسه گرهای زیستی فلورسانس، درمان تومورهای سرطانی به روش Hyperthermia، عامل کتراست در تصویر برداری MRI دارند. روش های تولید فیزیکی و شیمیایی این نانوذرات، همراه با آلودگی های زیست محیطی هستند. در این میان، باکتری قادر به سنتز مقدار قابل توجهی نانوذرات آهن هستند، طوری که کاملاً مطابق با اصول شیمی سبز می باشد. هدف از این تحقیق، جداسازی باکتری های مگنتوتاکتیک تولید کننده نانوذرات آهن از خاک معدن آهن ارجین استان زنجان می باشد.

**روش کار:** از خاک معدن، رقت متوالی تهیه شد و روی محیط کشت جامد ترکیبی که مخصوص جداسازی باکتری های مگنتوتاکتیک بود تلقیح شد و بعد از یک هفته گرماگذاری در ۳۰ درجه سانتی گراد از کلنی ها برداشت شد و به محیط مایع مخصوص منتقل شد و بعد از ۳ هفته گرماگذاری، با رنگ آمیزی گرم و کریستالوگرافی اشعه ایکس (XRD) و میکروسکوپ الکترونی SEM مورد مطالعه قرار گرفت.

**نتایج:** آنالیز گراف XRD وجود نانوذرات آهن و عکس های میکروسکوپ الکترونی SEM شکل باکتری ها و تجمعات خارج سلولی نانوذرات آهن تولیدی توسط باکتری ها را اثبات کرد.

**نتیجه گیری:** باکتری های جدا شده از معدن آهن ارجین زنجان قادر به تولید نانوذرات آهن هستند.

**واژگان کلیدی:** بیوسنتز، نانوذرات آهن، باکتری های مگنتوتاکتیک، معدن آهن

### مقدمه

نانوذرات آهن کاربرد وسیعی در علم پزشکی به خصوص در ساخت شناسه گرهای زیستی فلورسانس (Silveira et al. 2007; Shamsipor et al. 2009)، درمان تومورهای سرطانی به روش Hyperthermia ( Huey et al. 2004; Petri-Fink et al. 2008)، تشخیص زیستی پاتوژن ها، به عنوان عامل کتراست در تصویر برداری

Magnetic resonance imaging (MRI) دارند (Arakaki et al. 2008; Heyen et al. 2003). به طور کلی سه روش برای سنتز نانو ذرات آهن، شامل روش های فیزیکی، شیمیایی و زیستی وجود دارد. روش های فیزیکی و شیمیایی همراه با آلودگی های زیست محیطی هستند. روش های زیستی شامل استفاده از قارچ ها، باکتری ها، مخمرها، ویروس ها و هم چنین

نانوذرات آهن کاربرد وسیعی در علم پزشکی به خصوص در ساخت شناسه گرهای زیستی فلورسانس (Silveira et al. 2007; Shamsipor et al. 2009)، درمان تومورهای سرطانی به روش Hyperthermia ( Huey et al. 2004; Petri-Fink et al. 2008)، تشخیص زیستی پاتوژن ها، به عنوان عامل کتراست در تصویر برداری

غلظت های پایین اکسیژن می باشد. این باکتری ها می توانند در محیط های کاملاً مهر و موم و درزگیری شده، در صورتی که بین ۰/۱ درصد تا ۲۱ درصد اکسیژن وارد محیط کشت شود، رشد کنند و حداکثر تولید مگنتیت در غلظت اکسیژن ادرصد اتفاق می افتد، در حالی که در اکثر سویه ها، غلظت های بالاتر از ۵درصد نقش مهمی دارند. باکتری های مگنتوتاکتیک از طریق بیومینرالیزاسیون مگنتیت ( $Fe_3O_4$ )، در ساختارهای درون سلولی خود که متصل به سطح داخلی غشاء سیتوپلاسمی شان هستند (مگنتوزوم)، کریستال های مگنتیت تولید می کنند ( Gao jian et al. 2006; Schuler 1999; Schuler ) (2002; Frankel and Buseck 2000).

مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) دارای یک ساختار داربستی شکل (Spinel) می باشد که شامل سایت های ۸ وجهی و ۴ وجهی است که به ترتیب محل قرارگیری یون های سه ظرفیتی و دو ظرفیتی آهن می باشد و هنگامی که هر دو سایت در مجاورت هم قرار بگیرند ساختار فرومغناطیسی تولید می شود و همین امر باعث به وجود آمدن خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک جدید در ماده می شود ( Narayanan and Sakthivel 2010; ) (Brazylinski and Frankel 2004). مطالعات اولیه توسط میکروبیولوژیست آمریکایی Richard Blakemore در سال ۱۹۷۹ نشان داد که انواع مختلفی از باکتری های مگنتوتاکتیک در محیط های آب شیرین و لایه های رسوبی وجود دارند که قادر به سنتز نانو ذرات آهن به صورت درون سلولی یا خارج سلولی می باشند. این باکتری ها در مجاورت میدان مغناطیسی دارای مگنتوتاکسی بوده و به سمت قطب شمال حرکت می کنند (Love Lonnie et al. 2005; Schuler 2002). باکتری *M. magnetotacticum* سویه MS-1 اولین عضو از خانواده ی باکتری های مگنتوتاکتیک است که توسط Blakemore ایزوله و

گیاهان می باشند. استفاده از باکتری ها به عنوان منبع تولید ارزان قیمت نانوذرات آهن، کاملاً مطابق با اصول شیمی سبز می باشد ( Love Lonnie et al. ) (2005; Narayanan and Sakthivel 2010). در این میان، باکتری های مگنتوتاکتیک قادر به سنتز مقدار قابل توجهی نانو ذرات آهن هستند. باکتری های مگنتوتاکتیک اکثراً باکتری های گرم منفی محیط های آبی هستند که دارای اشکال مختلف اعم از کوکسی (Cocoid)، رودو (Rode)، و بیرویو (Vibrioid) و اسپریلی (Spirillum) هستند. این باکتری ها معمولاً متحرک می باشند و معمولاً میکروآیروفیل یا بی هوازی می باشند و در دمای حدود ۲۸ درجه سانتی گراد و pH حدود ۷ دارای رشد بهینه می باشند. این باکتری ها در حضور میدان مغناطیسی به سمت قطب شمال حرکت می کنند، که به این پدیده مگنتوتاکسی می گویند. باکتری های مگنتوتاکتیک، دارای تعدادی کریستال درون سلولی از جنس مواد مغناطیسی معدنی هستند که مگنتوزوم (Magnetosomes) نامیده می شوند (Prashant et al. 2008). این باکتری ها قادر به سنتز مقدار قابل ملاحظه ای کریستال های مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) در درون مگنتوزوم های خود هستند. باکتری های مگنتوتاکتیک دارای جایگاه وسیع زیستی در طبیعت اعم از دریاچه ها، رودخانه ها، مرداب ها، باتلاق ها، تالاب ها و معادن آهن می باشند. ولی فقط چندین گونه ی محدود شامل گونه های *M. magnetotacticum*، *M. gryphiswaldense* و *Magnetospirillum* تا به حال ایزوله و کشت داده شده اند. تنها سویه کوکسی قابل کشت، کوکسی *Magnetotactic* سویه MC-1 می باشد و از باکتری های مگنتوتاکتیک غیرقابل کشت می توان *Magnetobacterium bavaricum* را نام برد (Yanli et al. 2006). بهینه رشد این باکتری ها در

جداسازی باکتری‌ها از سایر ارگانیس‌ها: بعد از یک ماه با قرار دادن یک مغناطیس، در بالای محلول حاوی نمونه، با پی‌پت مقداری از آب موجود در زیر مغناطیس کشیده شد تا باکتری‌های مگنتوتاکتیک از سایر ارگانیس‌های ساکن در آب جدا شود و در محیط کشت جامد تلقیح شد اکسیژن توسط جریان گاز نیتروژن حذف گردید و با قرار دادن گازیپک تولیدکننده شرایط میکروآیروپیل (*Anaerocult C*, Merck) درب پلیت‌ها بسته شده در جار بی‌هوای تحت شرایط میکروآیروپیل برای مدت یک هفته انکوبه شد.

جداسازی کلنی‌ها و کشت در محیط مایع: بعد از یک هفته از کلنی‌های رشد کرده روی محیط کشت جامد برداشت و به محیط کشت مایع انتقال داده شد و برای مدت ۳ هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به صورت میکروآیروپیل انکوبه شد. بعد از سه هفته با قرار دادن یک مگنت در بالای ظرف‌های حاوی نمونه و با کمک پی‌پت از مایع زیر مگنت کشیده شده و بدین وسیله باکتری‌های مگنتوتاکتیک جمع‌آوری شدند. در ظروف حاوی محیط کشت مایع ذرات مگنتیت به وضوح قابل مشاهده بودند.

مواد و ترکیبات و نحوه ساخت محیط کشت: محیط کشت جامد حاوی ۵ میلی‌لیتر از محلول استریل یک لیتری مواد معدنی و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول استریل یک لیتری ویتامین‌ها و ۲ میلی‌لیتر از محلول استریل ۰/۰۱ مولار فریک کوینات (*Ferric quinate*) استریل بود. برای آماده‌سازی محط کشت به صورت جامد ۱۲ گرم پودر آگار (*Agar-agar*) به ازای یک لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه برای ۱۵ دقیقه و پس از سرد شدن به محیط استریل حاوی ویتامین‌ها فیلتر و مواد معدنی و فریک کوینات استریل اضافه شد و pH با NaOH روی ۶٫۸ تثبیت شد.

شناسایی شد. این باکتری میکروآیروپیل بوده و تشکیل مگنتوزوم در آن فقط در فشار پایین اکسیژن میسر می‌باشد (Arakaki et al. 2008; Heyen and Schuler 2003).

محققان، محیط کشتی به نام MSGM که حاوی مواد شیمیایی مورد نیاز برای رشد و جداسازی باکتری *M. Magnetotacticum* سویه MS-1 بود معرفی کردند (Blakemore et al. 1979). در سال ۲۰۱۰ از آب دریای خزر و رودخانه کرخه باکتری‌های مگنتوتاکتیک جدا سازی شد. باکتری‌های به دست آمده گرم منفی و حاوی ذرات مغناطیسی بودند (Farzan et al. 2010). تاکنون هیچ‌گونه تحقیقی در مورد جداسازی باکتری‌های مگنتوتاکتیک از خاک معادن، به خصوص معدن آهن در ایران انجام نگرفته است. هدف از این تحقیق، جداسازی باکتری‌های مگنتوتاکتیک تولیدکننده نانوذرات آهن از خاک معدن آهن ارجین استان زنجان بود.

## روش کار

نمونه برداری: نمونه‌برداری از خاک معدن آهن ارجین استان زنجان انجام شد. (موقعیت جغرافیایی با طول ۴۸.۴۲.۱۹ و عرض ۳۶.۲۳.۵۱). نمونه‌های خاک را از عمق ۳۰ سانتی‌متری سطح خاک که رگه‌ی آهن از آنجا می‌گذشت برداشت شد و به ظرف نمونه‌گیری استریل منتقل شد (Yanli et al. 2006).

بررسی pH نمونه‌های خاک: بررسی pH در یکی از دو رقت اول و یا دوم نمونه‌های خاک انجام گرفت. تمامی نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از معدن آهن ارجین زنجان pH برابر ۷ داشتند.

تهیه رقت متوالی: از خاک معدن رقت متوالی تهیه شد و تا رقت ۰/۰۱ رقیق شد و برای مدت یک هفته در دمای آزمایشگاه و در تاریکی و در حالت سکون نگهداری گردید (Yanli et al. 2006).

همان مواد به کار رفته برای ساخت محیط کشت جامد، بدون داشتن آگار می باشد. (Farzan et al. 2010).

ویتامین ها و بوریک اسید از شرکت SIGMA و فریک کوینات از شرکت FLUKA و سایر مواد شیمیایی به کار رفته از شرکت Merck تهیه شد.

رنگ آمیزی گرم و آنالیز توسط میکروسکوپ نوری از باکتری‌های ایزوله شده توسط لوپ گسترش روی لام تهیه شد و رنگ آمیزی با کریستال ویوله به مدت یک دقیقه صورت گرفت، و سپس با آب مقطر شسته شد و سپس محلول لوگل به مدت ۱ دقیقه اضافه گردید و سپس با استفاده از الکل استن رنگبری صورت گرفت و بلافاصله شستشو با آب مقطر صورت گرفت. سپس با سافرانین به مدت ۳۰ ثانیه رنگ آمیزی صورت گرفت و پس از خشک شدن لام توسط میکروسکوپ نوری Carl Zeiss Axiostar مورد مطالعه قرار گرفت.

آماده سازی نمونه برای شناسایی نوع نانوذرات تولیدی توسط XRD: آنالیز XRD جهت اثبات نوع فلز، به کار می‌رود. برای تهیه‌ی نمونه برای آنالیز XRD از توده‌ی سلولی حاصل از متابولیت باکتری‌ها برداشت شد و سانتریفوژ با دور ۷۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ min شد سپس رسوب به دست آمده با آب مقطر چند بار شسته شد و نمونه را در داخل پلیت شیشه‌ای ریخته شد و داخل فور در دمای ۸۰° درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک شود

(Weijia et al. 2009). سپس نمونه توسط دستگاه PHILIPS Pw 1800 XRD مورد آنالیز قرار گرفت و سپس با نرم افزار X'pert Data Collector گراف‌های حاصل از آنالیز مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

آماده سازی نمونه‌ها برای میکروسکوپ الکترونی SEM: از نمونه محیط کشت حاوی باکتری‌های

محلول تهیه شده از مواد معدنی شامل ۰/۶۸ گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  و ۰/۱۲ گرم  $\text{NaNO}_3$  و ۰/۳۷ گرم تار تاریک اسید (Tartaric acid) و ۰/۳۷ گرم سوکسینگ اسید (Succinic acid) و ۰/۰۵ گرم استات سدیم (Sodium acetate) و ۱/۵ گرم نیتریلوتری استیک اسید (Nitrilotriacetic acid) و ۳ گرم  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و ۰/۵ گرم  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Manganese II sulfate) و ۱ گرم  $\text{NaCl}$  و ۰/۱ گرم  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Iron II sulfate heptahydrate) و ۰/۱ گرم  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Cobalt II chloride hexahydrate) و ۰/۱ گرم  $\text{CaCl}_2$  (Calcium chloride) و ۰/۱ گرم  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Zinc sulfate heptahydrate) و ۰/۰۱ گرم  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Cupric Sulfate) و ۰/۰۱ گرم  $\text{ALK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  و  $\text{H}_3\text{BO}_3$  و ۰/۰۱ گرم  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Boric acid) و ۰/۰۱ گرم (Sodium molybdate dihydrate) حل شده در یک لیتر آب مقطر استریل بود.

محلول ویتامین‌ها شامل ۲ میلی گرم بیوتین (Biotin)، ۲ میلی گرم فولیک اسید (Folic acid)، ۱۰ میلی گرم پیروکسین هیدروکلراید، ۵ میلی گرم تیامین هیدروکلراید (Thiamine Hydrochloride)، ۵ میلی گرم ریبوفلاوین (Riboflavin)، ۵ میلی گرم نیکوتینیک اسید (Nicotinic acid)، ۵ میلی گرم کلسیم -D پانتوتنات (Chalcium D-panthotenate)، ۰/۱ میلی گرم ویتامین  $\text{B}_{12}$  و ۵ میلی گرم پاراآمینوبنزوئیک اسید (PABA) حل شده در یک لیتر آب مقطر استریل بود و در نهایت ۱۰ میلی لیتر از محلول یک لیتری ویتامین‌ها توسط سیستم فیلترینگ استریل و به محیط کشت اصلی اضافه شد.

محلول فریک کوینات حاوی ۰/۲۷ گرم  $\text{FeCl}_3$  و ۰/۱۹ گرم Quinic acid در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر بود مواد تشکیل دهنده محیط مایع، در حقیقت

با تخمیر سوبسترا مشاهده نشد و همگی آنها میکروآیروپیل بودند، که با سایر یافته های پیشین در مورد باکتری های مگنتوتاکتیک کاملاً مطابقت داشت. همچنین pH خاک معدن آهن معادل ۷ بود. باکتری های مگنتوتاکتیک میکروآیروپیل بوده و تشکیل مگنتوزوم در آن فقط در فشار پایین اکسیژن میسر می باشد (Arakaki et al. 2008; Heyen and Schuler 2003). در تحقیق حاضر نیز تولید نانوذرات آهن در شرایط میکروآیروپیل امکان پذیر بود. همچنین، این باکتری ها در مجاورت میدان مغناطیسی دارای مگنتوتاکتیسی بوده و به سمت قطب شمال حرکت می کنند (Love Lonnie et al. 2005). پس از تعریف گرادیان های مختلف دمایی از ۲۵ درجه سانتی گراد تا ۳۵ درجه سانتی گراد، مشخص شد که بالاترین میزان رشد در حدود ۳۰ درجه سانتی گراد می باشد. نتایج حاصل از آنالیز گراف کریستالوگرافی اشعه X (XRD) نشان داد که نانوذرات تولیدی توسط این باکتری ها، نانوذرات مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) بودند. عکس های میکروسکوپ الکترونی SEM اثبات می کند که باکتری های ایزوله شده از معدن آهن ارجین استان زنجان، رودو شکل (Rode) هستند که یکی از انواع شکل های رایج این باکتری می باشد، در کل این باکتری ها دارای اشکال مختلف اعم از کوکسی (Cocoid)، رودو (Rode)، و ویبریو (Vibrioid) و اسپریلی (Spirillum) هستند (Prashant et al. 2008). همچنین در عکس های میکروسکوپ الکترونی SEM تجمعات خارج سلولی نانوذرات آهن توسط باکتری ها به وضوح قابل مشاهده می باشد، که نشانگر توانایی ترشحی و خارج سلولی بودن نانوذرات تولیدی توسط باکتری های ایزوله شده از معدن آهن ارجین استان زنجان می باشد، که به علت نداشتن مراحل تخلیص و جداسازی، به انواع نانوذرات آهن تولیدی درون سلولی ارجعیت دارد. سایر نانوذرات آهنی که توسط این باکتری ها تولید می

ایزوله شده مقداری برداشته و روی گرید مخصوص SEM که با هوای تمیز، پاک شده بود قرار داده شد و در آن ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه فیکس شد و سپس با لایه نازکی از طلا روکش شد و توسط دستگاه S-4160 HITACHI مورد بررسی قرار داده شد.

## نتایج

بررسی های میکروسکوپ نوری و رنگ آمیزی گرم از باکتری های ایزوله شده نشان داد که همه این باکتری ها گرم منفی هستند (شکل ۱). جدول حاصل از آنالیز کریستالوگرافی اشعه X (XRD) نشان داد که ذرات تولیدی  $Fe_3O_4$  هستند (شکل ۲). در تصاویر شکل ۳ (الف، ب، ج و د)، عکس های میکروسکوپ الکترونی SEM نشان داد که همه این باکتری ها رودو شکل (Rode form) هستند و همچنین تجمعات نانوذرات مگنتیت خارج سلولی در اطراف این باکتری ها قابل مشاهده می باشند در نهایت اندازه و شکل ظاهری نانوذرات را مشخص کردند. نانوذرات آهن به طور واضح قابل مشاهده اند. و گراف های SEM تشکیل نانو ذرات آهن در اندازه حدود ۱۰ نانو متر را بیان می دارند (شکل ۳).

## بحث

باکتری های مگنتوتاکتیک قادر به سنتز مقدار قابل توجهی نانوذرات آهن هستند. این باکتری ها دارای تعدادی کریستال درون سلولی از جنس مواد مغناطیسی معدنی هستند که مگنتوزوم (Magnetosomes) نامیده می شوند (Prashant et al. 2008). این باکتری ها قادر به سنتز مقدار قابل ملاحظه ای کریستال های مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) در درون مگنتوزوم های خود هستند (Schuler 1999). باکتری های مگنتوتاکتیک ایزوله شده از معدن آهن ارجین استان زنجان، گرم منفی بودند و هیچ موردی

محیط‌های کشت موجود، کشت امکان پذیر نمی باشد (Yanli et al. 2006).

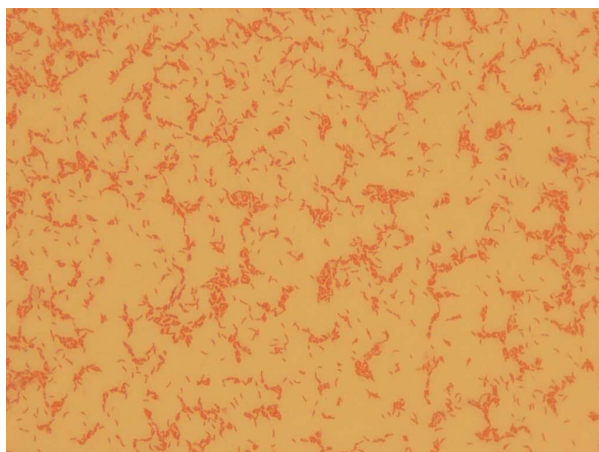
### نتیجه گیری

هدف از پژوهش حاضر، جداسازی باکتری های مگنتوتاکتیک تولید کننده نانوذرات آهن بود که برای اولین بار در ایران، از خاک معدن آهن با موفقیت انجام گرفت و با کمک کریستالوگرافی اشعه X (XRD) نوع نانوذرات سنتز شده توسط باکتری ها و با کمک میکروسکوپ الکترونی SEM وجود این باکتری ها، (Rode form) و همچنین اندازه نانوذرات آهن تولیدی توسط این باکتری ها اثبات شد. با توجه به اینکه در کشورمان، ایران تا به حال جداسازی باکتری های مگنتوتاکتیک تولید کننده نانوذرات آهن از خاک معدن آهن صورت نگرفته است، امید است که این تحقیق به عنوان سر آغازی برای بومی سازی تولید بیولوژیک نانوذرات آهن باشد و با شناسایی سویه و بهینه سازی آن بتوان به حجم صنعتی تولید این نانوذرات رسید.

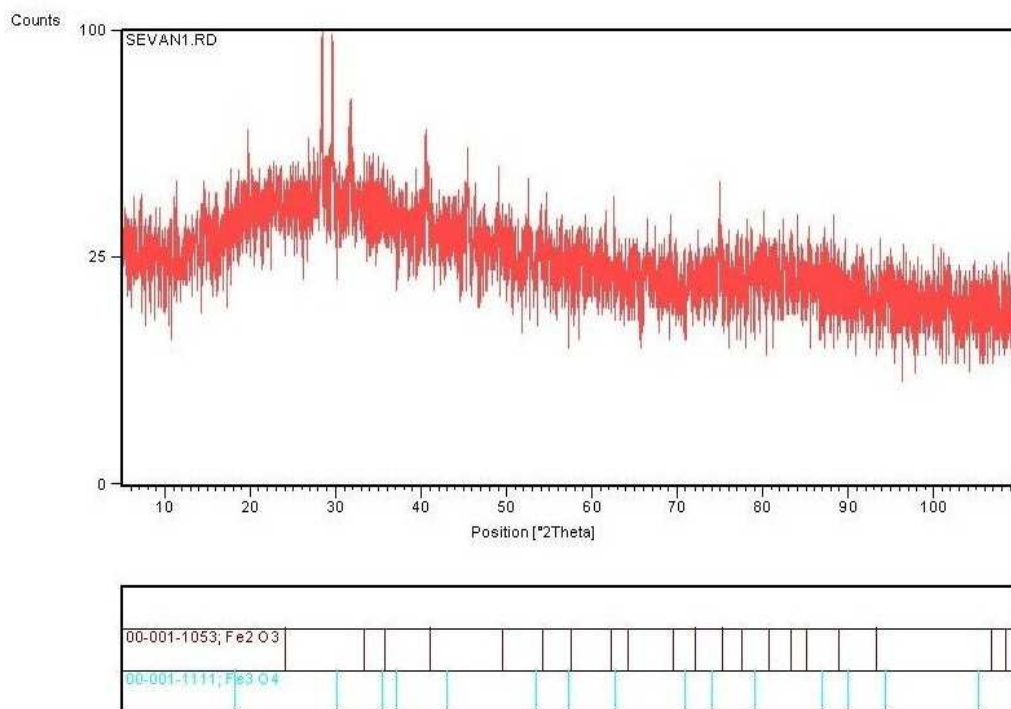
### تشکر و قدردانی

از معاون محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان جناب آقای دکتر مهدی رهنما و همچنین استاد گرانقدر گروه میکروبیولوژی دانشکده بهداشت علوم پزشکی تهران سرکار خانم دکتر دورقی، به خاطر رهنمود های شایسته شان و از آزمایشگاه SEM لایه‌های نازک دانشکده برق و الکترونیک دانشگاه تهران، آزمایشگاه های پژوهشکده مواد و انرژی، انرژی اتمی کرج، به خاطر همکاری شایسته شان در انجام پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می شود.

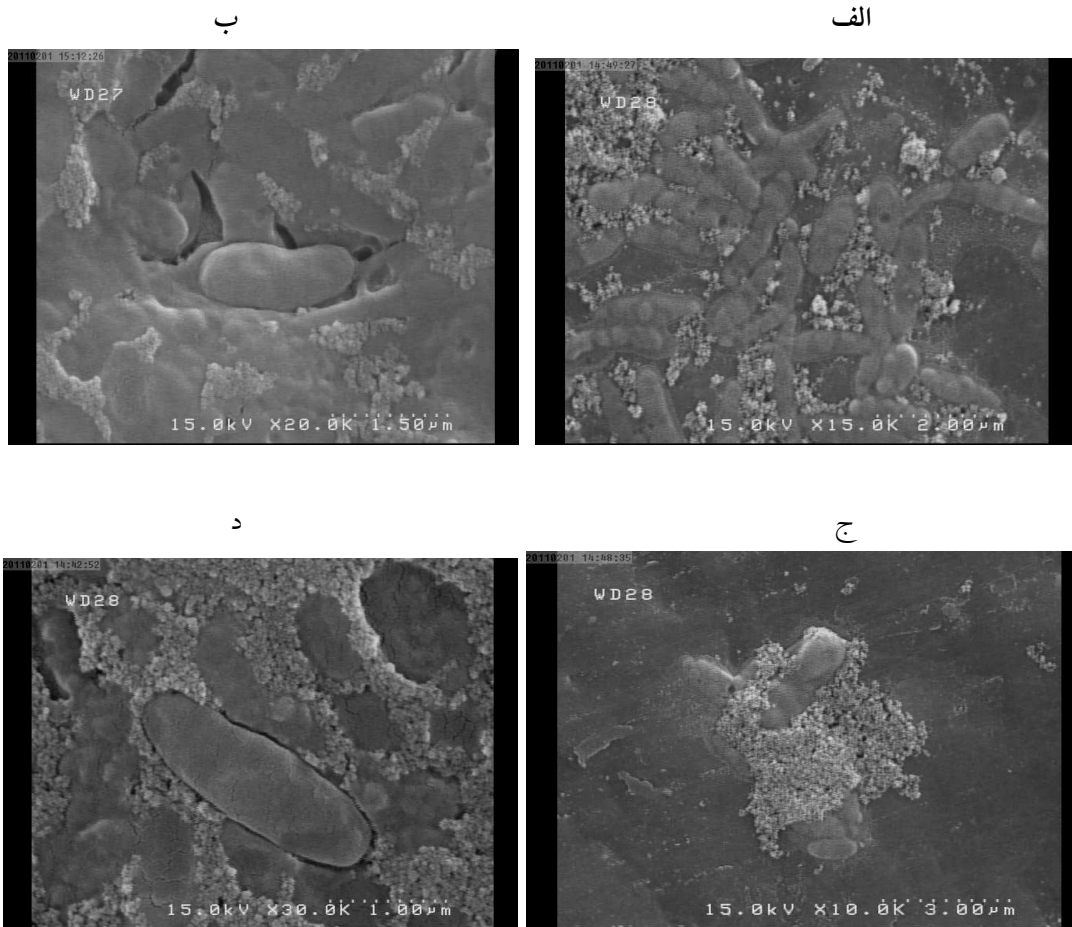
شود در حدود ۱۰ نانومتر بود. توزیع اندازه ها و همچنین شکل تمام نانوذرات سنتز شده توسط باکتری ها یکسان بود که نشانگر سیستم کنترلی بسیار دقیق باکتری برای تولید نانوذرات آهن می باشد (Schuler 2002). شایان ذکر است که اولین بار جداسازی باکتری های مگنتوتاکتیک از خاک معدن آهن در چین از معدن آهن Tieshan در سال ۲۰۰۶ صورت پذیرفت (Yanli et al. 2006). در ایران تاکنون تحقیقی دال بر جداسازی باکتری‌های مگنتوتاکتیک از خاک معدن آهن صورت نگرفته است. از مهم‌ترین تحقیقات می‌توان به جداسازی باکتری‌های مگنتوتاکتیک در سال ۲۰۱۰ از آب دریای خزر و رودخانه کرخه اشاره کرد که باکتری‌های به دست آمده گرم منفی و حاوی ذرات مگنتیت بودند (Farzan et al. 2010). از محدودیت‌های جداسازی این باکتری‌ها می‌توان به دیر رشد و سخت رشد بودنشان اشاره کرد و همچنین نیازمند محیط غنی شده و ترکیبی مخصوص باکتری‌های مگنتوتاکتیک می باشد که حتما باید حاوی آهن III و II ظرفیتی و فریک کوینات (Ferric quinate) باشد (Blakemore et al 1979). از دیگر محدودیت های کار با این باکتری ها، می توان به احتمال بالای آلودگی نمونه ها با قارچ‌های ساپروفیت خاک اشاره کرد، چون نمونه خاک معمولا حاوی اسپور قارچ‌ها و ساپروفیت‌ها می باشد و شاید استفاده از قارچ کش هایی نظیر سیکلوهاگزامید، در جلوگیری از آلودگی‌های قارچی موثر واقع شود. همچنین مشخص گردید که بهترین pH برای رشد این باکتری‌ها معادل ۶٫۸ می باشد. از دیگر محدودیت‌های کار با باکتری‌های مگنتوتاکتیک، غیر قابل کشت بودن خیلی از سویه‌های شناسایی شده می‌باشد که با توجه به امکانات آزمایشگاهی و



شکل ۱- عکس رنگ آمیزی گرم از باکتری های مگنتوتاکیک جدا شده از معدن آهن ارجین استان زنجان نشان می دهد که همه ی این باکتری ها گرم منفی هستند



شکل ۲- جدول آنالیز کریستالوگرافی اشعه ی X (XRD) نشان می دهد که نانو ذرات تولید شده توسط باکتری ها، نانوذرات مگنتیت (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) هستند.



شکل ۳ (الف، ب، ج و د)- تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM از باکتری های مگنتوتاکتیک جدا شده از معدن آهن ارجین زنجان نشان می دهد که باکتری های مگنتوتاکتیک جدا شده از معدن آهن ارجین استان زنجان رودو شکل (Rode form) هستند و همچنین تجمعات نانوذرات مگنتیت خارج سلولی در ابعاد ۱۰ نانومتر در اطراف این باکتری ها قابل مشاهده می باشند.

## References

- Arakaki, A., Nakazawa, H., Nemoto, M., Mori, T. and Matsunaga, T., 2008. Formation of magnetite by bacteria and its application, *Journal of the Royal society Interface*, 5, pp. 977-999.
- Blakemore, R.P., Maratea, D. and Wolfe, R.S., 1979. Isolation and Pure Culture of a Freshwater Magnetic Spirillum in Chemically Defined Medium, *Journal of Bacteriology*, **140**(2), pp. 720-729
- Brazylnski, D.A. and Frankel, R.B., 2004. Magnetosome formation in prokaryotes, *NATURE review*, 22 microbiology, pp. 217-230
- Farzan, F., Shojaosadati, S.A. and Abdul Tehrani, H., 2010. Preliminary report on the isolation and identification of Magnetotactic bacteria from Iran environment, *Iranian Journal of Biotechnology*, 8, pp. 98-102
- Frankel, R.B. and Buseck, P.R., 2000. Magnetite biomineralization and ancient life on Mars, *Chemical Biology*, 4, pp. 171-176
- Gao, J., Xie, J., Ding, J., Kang, J., Cheng, H. and Qiu, G., 2006. Extraction and purification of magnetic nanoparticles from strain of *Leptospirillum ferriphilum*, *Transaction of Nonferrous Metals Society of China*, 16, pp. 1417-1420
- Heyen U. and Schuler D., 2003. Growth and magnetosome formation by microaerophilic *Magnetospirillum* strains in a oxygen-controlled fermentor, *Appl Microbiol Biotechnol Springer-Verlag*, 61, pp. 536-544.
- Huey, A., Guandong, Z., Cullen, D. and Baker, I., 2008. Synthesis and Characterization of Iron Composite Nanoparticles for Cancertherapy, *Center for Nanomaterials research Dartmouth*, pp. 1-10.
- Love Lonnie, J., Yeary Lucas, W., Moon, J.W., Phelps J. and Rondinone Adam, J., 2005. Characterization of Bio-synthesized Magnetic Nanoparticles, *DARPA Biomagnetics program for U.S. dept. of Energy under contract DE-AC05-00OR22725*.
- Narayanan Kannan, B. and Sakthivel, N., 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, *Advance in Colloid and Interface science*, 156, pp. 1-13.
- Petri-Fink, A., Chastellain, M., Juillerat-Jeabbret, L., Ferrari, A. and Hofmann, H., 2004. Development of functionalized super paramagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells, *Biomaterials*, 26, pp. 2685-2694.
- Prashant, M., Nisha, K.R. and Sudeh Kumar, Y., 2008. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications, *Journal of nanopart Res*, 10, pp.507-517.
- Schuler, D., 1999. Formation of magnetosomes in Magnetotactic bacteria, *Molec. Microbiol. Biotechnol*, 1, pp.79-86
- Schuler, D., 2002. The biomineralization of magnetosomes in *Magnetospirillum gryphiswaldense*, *Springer Int Microbiology*, 5, pp. 209-214
- Shamsipor, F., Zamani, A.H. and Ghodsi, R., 2009. Conjugation of Nanoparticles for Monoclonal Antibodies to Super Paramagnetic Iron oxide Detection of HER2/neu antigen on Breast cancer cell lines, *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 1, pp. 1-31.

Silveira, T.S., Martins, J.L., Silva K.T., Abreu F. and Lins U., 2007. Microscopy studies on uncultivated magnetotactic bacteria, *Modern Research and Educational Topics in Microscopy, FORMATEX*, pp. 111-121.

Weijia, Z., Wen, H. and Xudong Z., 2009. Biosynthesis of iron phosphate nanopowders, *Powder Technology*, 194, pp. 106–108

Yanli, L. Meiyong, G., Shunying, D., Kefang, P. and Rongfen, J., 2006. Characterization of magnetotactic bacteria and their magnetosomes isolated from Tieshan iron ore in Hubei provine of China, *Materials science and engineering C*, 26, pp.597-601.

## Isolation of iron nanoparticle-producing magnetotactic bacteria from Arjin ore in Zanjan Province, Iran

*Avadisians, S.*, MSc. Student, Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

*Salouti, M.*, Ph.D. Assistant Professor, Department of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

*SoltanDalal, M.M.*, Ph.D. Professor, Department of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran-Corresponding author: [soltanirad34@yahoo.com](mailto:soltanirad34@yahoo.com)

*Bakhtiari, R.*, MSc. Department of Microbiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: Sep 16, 2011

Accepted: Jan 10, 2012

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Iron nanoparticles are broadly used in medical science, particularly in synthesis of fluorescence biomarkers, cancerous tumor therapy by hyperthermia, and as a contrast agent in MRI. Physical and chemical synthesis methods currently used to produce nanoparticles cause environmental contamination. Certain bacteria are capable of synthesizing significant amounts of iron nanoparticles, quite in conformity with the principles of green chemistry. The objective of this study was to isolate iron nanoparticle-producing magnetotactic bacteria from Arjin ore in Zanjan Province, Iran

**Materials and Methods:** Serial dilutions were prepared from the soil of iron ore and inoculated on a combined solid agar culture medium specifically used to isolate magnetotactic bacteria. This was followed, after incubation at 30 degree for a week, by transferring samples of colonies to special liquid culture media. After three weeks of incubation, the samples were examined by Gram staining, XRD and of scanning electron microscope (SEM).

**Results:** The existence of iron nanoparticles was confirmed by analysis of XRD graphs. Furthermore, scanning electron microscopy pictures proved the shape of bacteria and extracellular accumulation of iron nanoparticles produced by them.

**Conclusion:** Magnetotactic bacteria isolated from Arjin ore in Zanjan Province, Iran are capable of biosynthesizing iron nanoparticles.

**Key words:** Biosynthesis, Iron Nanoparticles, Magnetotactic Bacteria, Iron ore