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, soheilaghaee@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 manganese oxide nanoparticles including morphology, size, and chemical structure using

* Corresponding author

2322-5181/ © The Authors.
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

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.

زیســـــت‌شناســـــی میکروارگانیســـــم‌هـــــا
ســـال دوازدهـــم، شـــماره ۴۵، بهـــار ۱۴۰۲ ، صـــفحه ۶۳ – ۵۱
تـاریخ دریافـت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۹ – تـاریخ پـذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۳

مقاله پژوهشی

غربالگری و شناسایی مولکولی استرپتومیست بومی تولیدکنندهٔ نانوذرات اکسید منگنز از خاک معدن منگنز قم

عطیه سادات حسینی انـواری: دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران، hosseini.anvari0082@gmail.com
ســـید ســـهیل آقـــایی*: اســـتادیار گروه میکروبیولـــوژی، دانشـــکدهٔ علـــوم پایه،دانشـــگاه آزاد اســـلامی، قـــم، ایـــران، soheilaghaee@yahoo.com
محمدرضـــا زنـــد منفـــرد: مربـــی گـــروه شـــیمی، دانشـــکدهٔ علـــوم پایه،دانشـــگاه آزاد اســـلامی، قـــم، ایـــران، zand.monfared@gmail.com

چکیده

مقدمه: نانوذرات اکسـید منگنـز بـه دلایـل اقتصـادی و داشـتن خصوصـیات فیزیکـی و شـیمیایی خـاص، بـه‌عنـوان مـاده استراتژیک در صنایع مختلـف ماننـد بـاتری‌سـازی، تصـفیه آب و فاضـلاب، صـنایع دارویـی و غیـره کـاربرد دارد. تولیـد نانوذرات اکسید منگنز جزء متابولیت‌های ثانویه در باکتری‌ها است و با توجه به اینکه معدن منگنز ونارچ اسـتان قـم، یکـی از مهم‌ترین منابع تأمین‌کنندهٔ منگنز برای میکروارگانیسم‌های اکسیدکنندهٔ منگنز است، این پـروژه بـرای نخسـتین‌بـار روی خاک‌های این معدن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۰ نمونه خاک از مناطق مختلف معدن منگنز جمع‌آوری و در محیط غنی‌کنندهٔ انتخـابی K تلقیح و در انکوباتور شیکردار گرماگذاری شد. سویه‌هـای بـه‌دسـت‌آمـده از کشـت در محـیط حـاوی منگنـز توسـط آزمایش بنزدین برای ارزیابی توانایی اکسیداسیون منگنز بررسی شدند و ویژگی‌های نـانوذرات اکسـید منگنـز ازجملـه مورفولوژی، اندازه و ساختار شـیمیایی آن توسـط تکنیـک‌هـای تأییـدی شـامل UV-VIS، FTIR، XRD، FESEM و TEM تعیین شدند. با استفاده از نمودار هیستوگرام FESEM اندازه نـانوذرات در محـدوده ۱۰ نـانومتر مشـخص شـد و سویه منتخب شناسایی مولکولی شد.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © The Authors.
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

نتایج: برای نخستین‌بار یک سویه اکتینومیست بومی با توانایی اکسیداسیون منگنز و تولید نانوذرات به‌صورت خارج سلولی از معدن منگنز ونارچ 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 ونارچ قم منبع بسیار مهمی برای میکروارگانیسم‌های اکسیدکنندهٔ منگنز است، این پژوهش برای نخستین‌بار 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 اکسیدکنندهٔ منگنز، نانوذرات اکسید منگنز، معدن منگنز استان قم

مقدمه

فناوری نانو یا نانوتکنولوژی 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 به‌دلیل 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 منحصربه‌فردی را نسبت به حالت توده‌ای آنها سبب می‌شود (۳). یکی از مشکلات زیست‌محیطی آلودگی آب‌های زیرزمینی با آرسنیک[1] است. اکسید منگنز قادر به اکسیداسیون آرسنیکIII به آرسنیکV 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. ازجمله 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 دربارهٔ 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 سنتزشده به روش شیمیایی، تمیز، غیرسمی و دوستدار محیط زیست، مصرف انرژی کمتر نسبت به روش‌های سنتز فیزیکی و شیمیایی، تولید

مواد جانبی کمتر و زیست سازگاری بسیار بالا است. میکروارگانسیم‌های متفاوتی می‌توانند یون‌های فلزی سمی را به نانوذرات احیا[۲] 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 به‌عنوان محصول جانبی تولید می‌کند که نسبت به فلزات مقاومت دارند و همین سویه‌های مقاوم به‌عنوان 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 به‌صورت درون سلولی و تعداد کمی به‌صورت 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 اکسیدشدن منگنز در اثر قلیایی‌شدن[۵] است و مکانیسم دوم، شامل اکسیداسیون مستقیم منگنز است که بیشتر توسط آنزیم‌های اکسیدکنندهٔ منگنز صورت می‌گیرد. مکانیسم دقیق با بررسی‌های ژنتیکی آشکار می‌شود. نانوذرات اکسید منگنز تا به امروز بیشتر ازطریق شیمیایی تولید می‌شوند و روش‌های شیمیایی نیز برای محیط زیست مخرب‌اند. همچنین اکسیدکننده‌های منگنز به‌دلیل 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 تولیدکنندهٔ نانوذرات اکسید منگنز به‌منظور تولید نانوذرات دوستدار محیط زیست با کاربرد صنعتی از خاک معدن منگنز ونارچ استان قم است که برای نخستین‌بار در کشور انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و غربالگری باکتری‌های تولیدکنندهٔ اکسید منگنز: با توجه به زیستگاه طبیعی میکروارگانیسم‌های اکسیدکنندهٔ منگنز و وجود عناصر منگنز احیاشونده، نمونه‌برداری از خاک‌های ۳ منطقه مختلف معدن منگنز ونارچ 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 k (0/001 gr KH_2PO_4، 0/002 gr $MgSO_4$، 0/008 gr $(NH_4)_2SO_4$، 0/01 gr MnSO و 0/005 gr Yest Extract) ریخته شد. سپس ارلن‌ها به‌منظور 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 به‌منظور غنی‌سازی ثانویه نمونه‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک به ارلن دیگری منتقل شد که حاوی

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 ته‌نشین‌شدن 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 اکسیدکنندهٔ منگنز پیوسته به محیط‌های کشت تازه اختصاصی K منتقل شدند. غربالگری اولیه باکتری‌های اکسیدکنندهٔ منگنز براساس تشکیل کلنی قهوه‌ای و آزمون بنزیدین صورت گرفت (۱۱).

شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی: سویه خالص‌شده بعد از نشان‌دادن توانایی اکسید منگنز با استفاده از آنالیزهای بیوشیمیایی آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، اوره و H_2S و آزمون رشد بی‌هوازی (طبق کتاب راهنمای باکتریولوژی سیستماتیک برجی[۶]) و آزمون‌های مورفولوژیک، رنگ‌آمیزی 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 ایجادشده در سوسپانسیون اولین نشانه در تولید نانوذره اکسید منگز بود. رسوبات قهوه‌ای رنگ ایجادشده در محیط کشت، توسط دستگاه لیوفیلیز با استفاده از خلأ و سرما خشک شدند (۱۳).

تعیین ویژگی‌ها و خواص نانوذرات اکسید منگنز تولیدشده توسط سویه منتخب: خصوصیات نوری نانوذرات سنتزشده 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 فالکون 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 استفاده‌شده 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 پراش‌سنج پرتوی X مدل pw1730 با استفاده از داده‌های به‌دست‌آمده از آنالیز

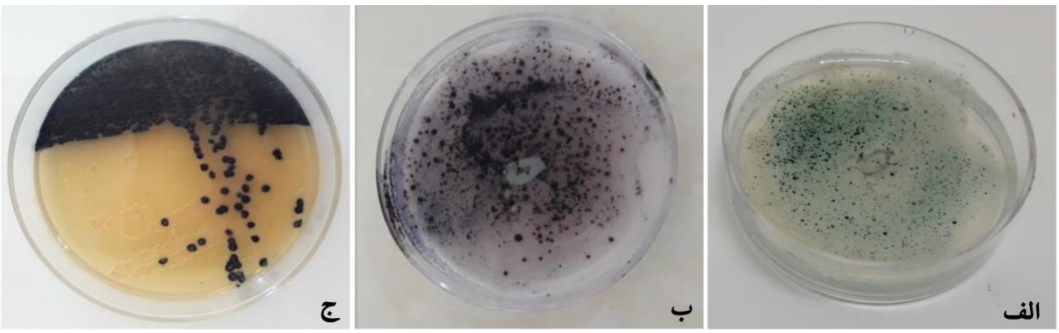
XRDاندازه نانوبلوک‌ها از معادله شرر محاسبه شد.

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.

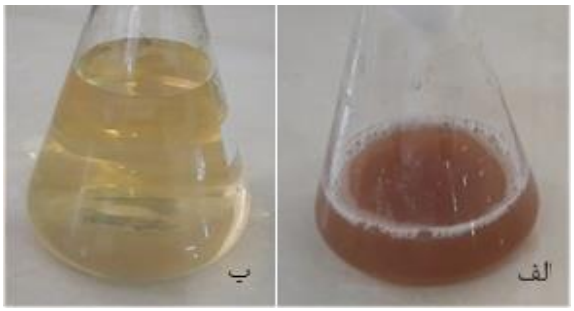
شناسایی مولکولی سویه منتخب تولیدکنندهٔ نانوذرات اکسید منگنز: ماده ژنتیکی با استفاده از روش جوشاندن، استخراج و با دستگاه نانودراپ ازنظر غلظت بررسی شد. از پرایمرهای یونیورسال[۷] برای تکثیر قطعه ژنی *16S rRNA* با طول ۲۰ جفت‌باز (طول کل ۴۰ جفت‌باز) استفاده شد؛ پرایمر F27 -5'–Forward) AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و پرایمر R1492 (Reverse-5'- GGGTTACCTTGTTACGACTT-3'). ترکیب 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 سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه دناتوراسیون به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال مجدد به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، گسترش به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. فرایند توالی‌یابی در مؤسسه توپاز ژن (کرج، ایران) انجام شد. توالی به‌دست‌آمده برای شناسایی مولکولی سویه منتخب در سایت NCBI بلاست شد (۱۴). سپس توالی‌های فوروارد و ریورس تولیدشده با استفاده از نرم‌افزار Bioedit نسخه ۷٫۲ ترکیب شدند و توالی نهایی در سایت NCBI به‌عنوان سویه جدید ثبت شد. با استفاده از نرم‌افزار MegaX درختچه فیلوژنتیکی براساس پیوست همسایگی رسم شد.

نتایج

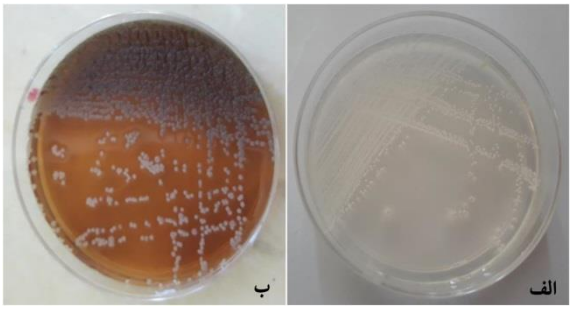
جداسازی و غربالگری اولیه: با توجه به زیستگاه طبیعی باکتری‌های اکسیدکنندهٔ منگنز از بین ۱۰۰ نمونه خاک جمع‌آوری‌شده از نواحی مختلف سرپوشیده و باز معدن منگنز ونارچ قم، ۲۰ عدد از باکتری‌های رشدیافته در محیط‌های کشت افتراقی و انتخابی توانایی اکسیداسیون منگنز را از خود نشان دادند. این نمونه‌ها روی محیط‌های کشت در مدت ۲ الی ۳ هفته توانستند منگنز محیط را اکسید کنند. از میان سویه‌های فوق تنها یک سویه توانایی بیشتری در اکسایش منگنز داشت که به‌عنوان 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 رشدیافته 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 نشان‌دهندهٔ توانایی اکسیداسیون منگنز توسط سویه منتخب است. سایر نمونه‌ها به‌دلیل ضعف اکسیدکنندگی منگنز در آزمایشات بعدی حذف شدند. تصاویر ماکروسکوپی کلنی‌های تیره‌شدهٔ سویه منتخب در شکل ۱ آورده شده‌اند. شکل ۲- الف، محیط کشت مایع K حاوی سویه منتخب رشدیافته و شکل ۲- ب، محیط کشت مایع فاقد باکتری را نشان می‌دهد.



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 اکسیدکنندهٔ منگنز در محیط اختصاصی K بعد از گذشت ۲ هفته از انجام کشت



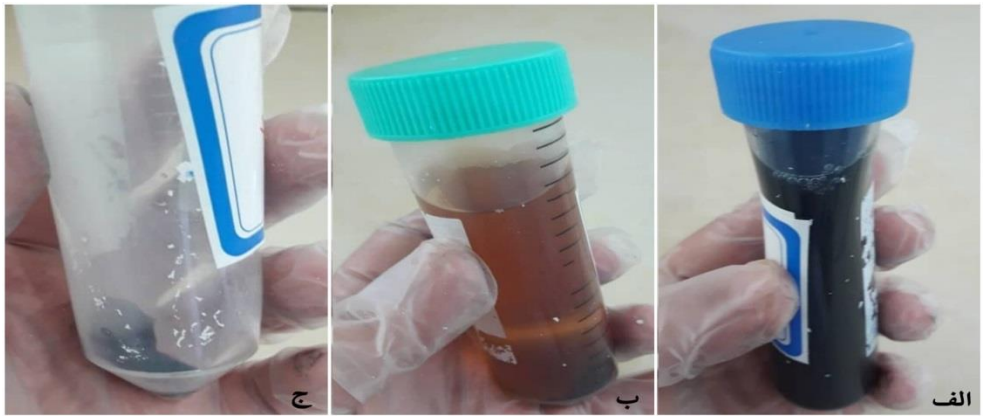
شکل ۲- الف، محیط کشت K حاوی سویه‌های باکتریایی رشدیافته؛ ب، محیط کشت K فاقد سویه باکتریایی رشدیافته



شکل ۳- الف، سویه منتخب رشدکرده در محیط نوترینت آگار؛ ب، سویه منتخب رشد کرده در محیط TSA

شناساسی 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 اکتینومیست‌ها است. تصاویر رشد سویه منتخب در محیط‌های کشت نوترینت آگار و TSA در شکل ۳ آورده شده‌اند.

سنتز 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 مذبور 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.

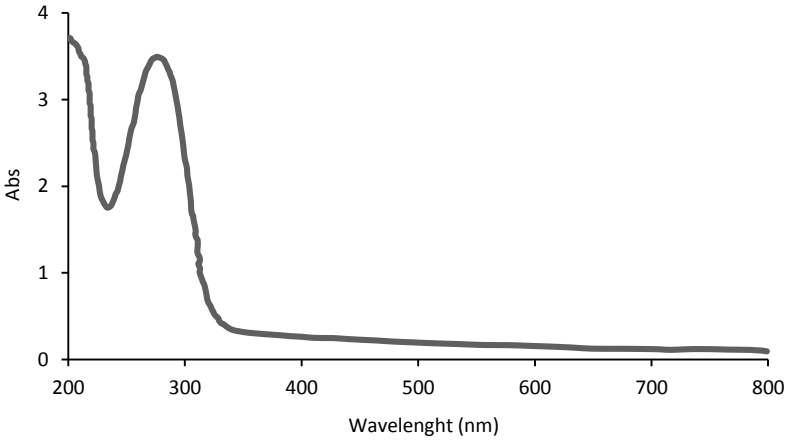


شکل ۴- الف، نانوذره اکسید منگنز تولیدشده توسط سویه منتخب؛ ب، نانوذره اکسید منگنز سانترفیوژشده؛ ج، نانوذره اکسید منگنز پس از حذف محیط کشت

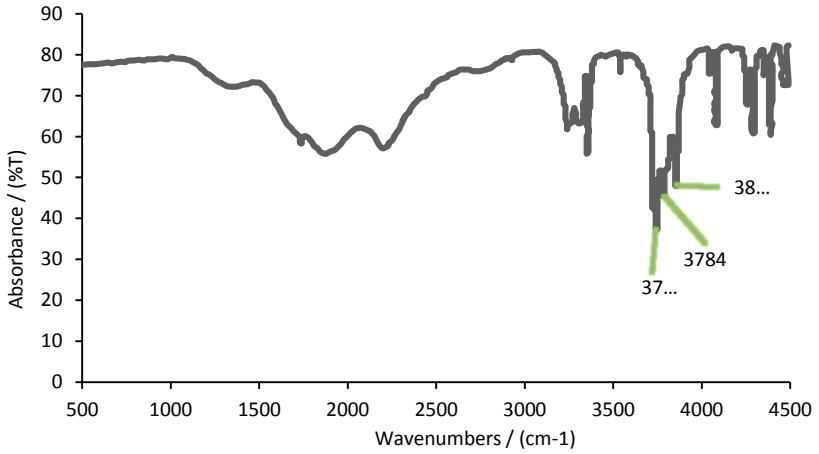
تعیین ویژگی‌ها و خواص نانوذرات سنتزشده: شکل ۵ نتیجه حاصل از طیف‌سنجی در محدوده طول موج ماورای بنفش و نور مرئی را نشان می‌دهد. طیف تولیدشده نشان می‌دهد نانوذرات اکسید منگنز سنتزشده توسط سویه منتخب بیشترین جذب را در محدوده ۳۰۰ نانومتر دارند.

نتایج طیف‌سنجی مادون قرمز از رسوبات قهوه‌ای اکسید منگنز تولیدشده در محیط کشت K برای شناسایی بیومولکول‌های درگیر در تولید نانوذرات اکسید منگنز در شکل ۶ مشاهده می‌شوند؛ حضور یک شیفت بزرگ از 3742 cm-1 به 3850 cm-1 نشان دهندهٔ باند C-N متعلق به گروه آمین است.

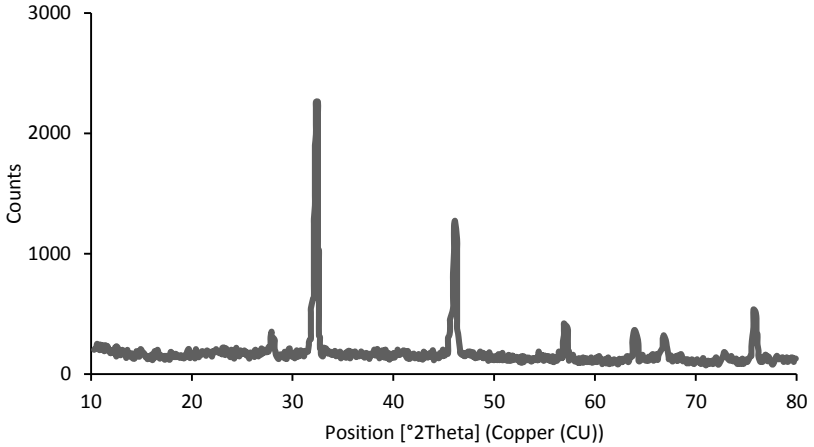
الگوی انرژی تفرق اشعه ایکس از نانوذرات اکسید منگنز تولیدشده توسط سویه منتخب در شکل ۷ نشان داده شده است. طیف مدنظر پیک‌های کریستالین دارد که با توجه به موقعیت پیک‌ها ترکیب شیمیایی رسوبات دارای فرمول مولکولی Mn_2O_3 تشخیص داده شد.



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

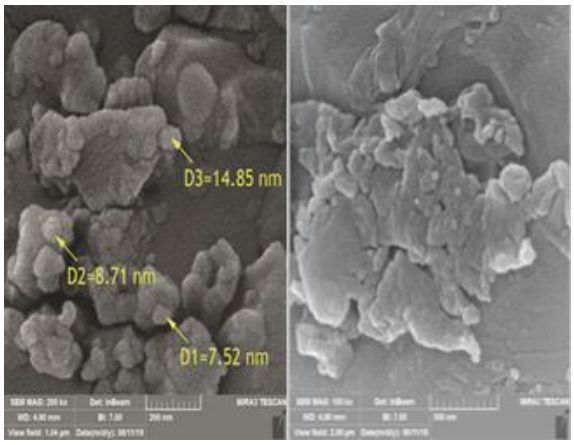


شکل ۶- طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه نانوذرات سنتزشده توسط سویه منتخب



شکل ۷- الگوی تفرق اشعه X به‌دست‌آمده از نانوذرات سنتزشده توسط سویه منتخب

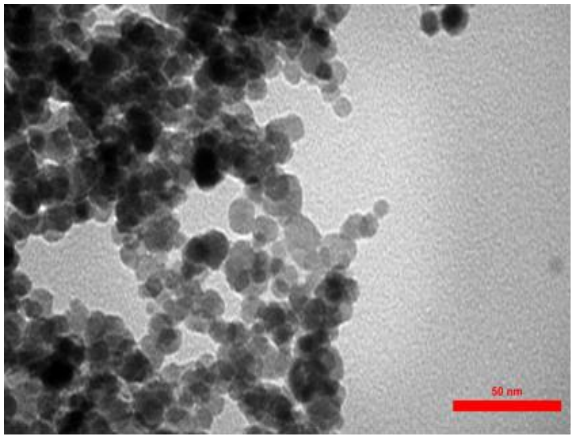
ارزیابی و آنالیز ترکیبات و مورفولوژی رسوبات حاصل از فرایند آماده‌سازی نانوذرات خارج سلولی با میکروسکوپ الکترونی روبشی و همچنین استفاده از نمودار هیستوگرام میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی نشان داد نانوذرات خارج سلولی سنتزشده توسط سویه منتخب دارای اندازه‌های در بازه ۱۰ نانومتر و بیشتر به شکل کروی و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



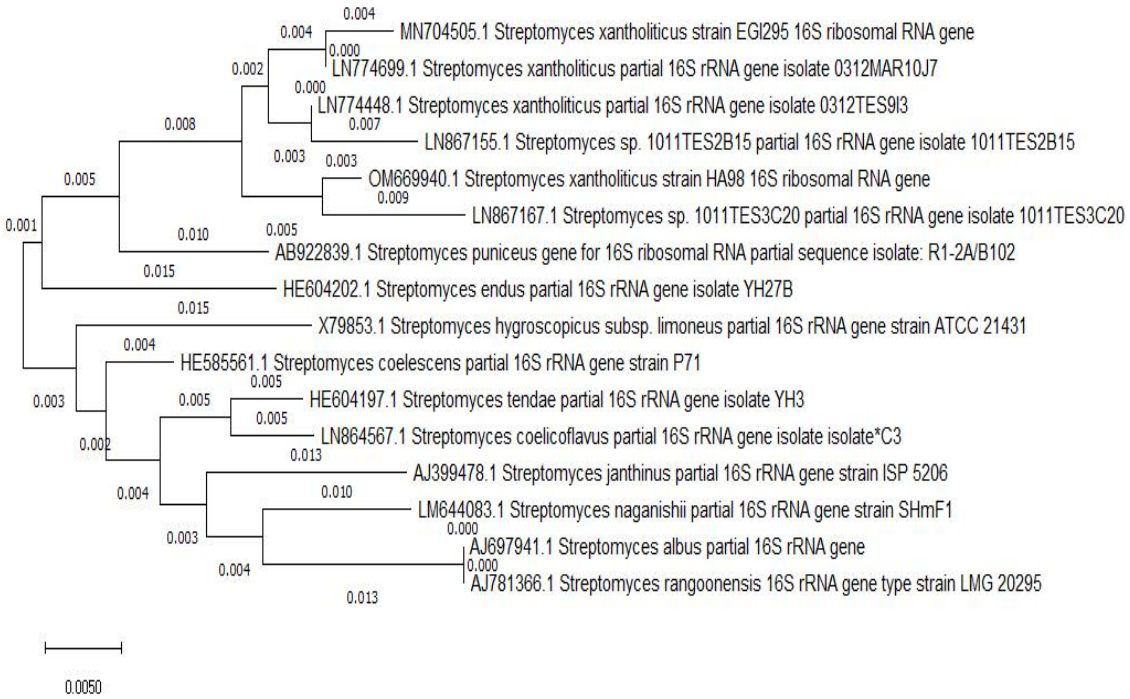
شکل ۸- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از اندازه و نحوه قرارگیری نانوذرات اکسید منگنز سنتزشده

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

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



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؛ به‌طوری‌که 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 منحصربه‌فرد فیزیکی و شیمیایی و کاربردهای بالقوه‌ای که در کاتالیست‌ها، تبادل یونی، جذب مولکولی و حسگرهای زیستی دارند، به شدت مورد علاقهٔ پژوهشگران قرارگرفته‌اند (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 ضرروی 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 ازجمله قارچ‌ها، باکتری‌ها، مخمرها، عصاره‌های گیاهی و غیره در سنتز نانوذرات فلزی و شبه‌فلزی پرداختند. باوجود تمام پژوهش‌های انجام‌شده، رسیدن به دانش کافی برای استفاده کاربردی و روزانه از نانوذارت 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 اکسیدکنندهٔ منگنز سعی شده است از تمام مناطق سرباز و سرپوشیده معدن منگنز نمونه‌برداری 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 اکسیدکنندهٔ 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 جداشده از رسوبات دریایی فعالیت کرده و از کلرید منگنز به‌عنوان ماده کربنی برای شناسایی باکتری‌های اکسیدکنندهٔ منگنز استفاده کرده‌اند. نتایج پژوهش نشان دادند اسنیتوباکترهای جداشده توانایی مصرف کلرید منگنز و تولید نانوذرات اکسید منگنز به‌صورت 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؛ درنتیجه، 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 ایجادشده، در پژوهش‌های آینده در یک فرایند مشترک نانوذرات فلزی را با استفاده از باکتری‌های جذب‌کننده و اکسیدکنندهٔ فلزات می‌توان تولید کرد.

باکتری‌های اکسیدکنندهٔ منگنز در محیط کشت اختصاصی K، کلنی‌های قهوه‌ای تا سیاه رنگ ایجاد می‌کنند که تست بنزیدین به‌دلیل 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 نانوذارت اکسید منگنز تولیدشده در محدوده طول موج ۳۰۰ نانومتر با حداکثر جذب مشخص شدند.

ویلالوبوس[۱۰] و همکاران در سال ۲۰۰۳، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی رسوبات اکسید منگنز تولیدشده توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا*[۱۱] را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و تکنیک تفرق اشعه ایکس مطالعه کردند. آنها پس از بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی به‌دست‌آمده 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 Mn (II) را در توالی *16S rRNA* خود دارند (۱۸).

در این پژوهش بعد از نمونه‌برداری از خاک معدن منگنز ونارچ استان قم و غنی‌سازی آنها با استفاده از تست بنزدین و با تولید کلنی‌های رنگی، شناسایی اولیه باکتری‌های تولیدکنندهٔ 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، طیف‌سنجی نور ماورای بنفش و نور مرئی و تصویربرداری الکترونی عبوری و روبشی استفاده شد که درنهایت تولید نانوذرات اثبات شد.

با توجه به اینکه نانوذرات ساختارهای سطحی و میان‌کنش‌های متفاوت و فعال‌تری نسبت به ذرات با اندازه‌های بزرگ‌تر 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

دوستدار محیط زیست با استفاده از باکتری اکتینومیست[۱۳] (استرپتومیست[۱۴]) برای نخستین‌بار انجام گرفت. همچنین به‌دلیل کاربردهای وسیع نانوذرات اکسید فلزی به‌ویژه نانوذرات اکسید منگنز ازجمله استفاده از آنها در ترکیبات آلی منگنزدار شامل آفت‌کش‌ها و متیل سیکلوپنتادین تری‌کربونیل[۱۵] (MMT) و مواد افزودنی به سوخت، پژوهشگران مطالعه حاضر امیدوارند منابع غنی از میکروارگانیسم‌های اکستریم[۱۶] در کشور مانند معدن منگنز ونارچ قم بیشتر پژوهش و بررسی شود. این پژوهش برای نخستین‌بار در کشور موفق به جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی سویه تولیدکنندهٔ اکسید منگنز از معدن منگنز ونارچ استان قم شد.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم معدن منگنز ونارچ 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, 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 Mn 2 O 3) Nanoparticle by Isolated Acinetobacter sp. *Journal of Current Microbiology*, *63*(3), 300-305.

(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.

[1]- Arsenic
[2]- Reduction
[3]- Metal nanoparticles
[4]- Metallic nanoparticles
[5]- Alkalization
[6]- Bergey's
[7]- Universal
[8]- Ding
[9]- Butterfield
[10]- Villalobos
[11]- *Pseudomonas putida*
[12]- Takahashi
[13]- Actinomist
[14]- Streptomyces
[15]- Methylcyclopentadenylcarbonyl
[16]- Extreme