

بیوسنتز نانوذرات آهن توسط باسیلوس مگاتریوم و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن

سپیده غنی^۱(MSc)، بهنام رفیعی^۱(MSc)، داود صادقی^۲(PhD)، مریم احسنی^۲(BSc)

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی
۲- مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشکده و پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین (ع) تهران
۳- گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه اراک

دریافت: ۹۶/۱/۱۳، اصلاح: ۹۶/۲/۲۰، پذیرش: ۹۶/۳/۳۰

خلاصه

سابقه و هدف: روش های شیمیایی که برای سنتز نانوذرات استفاده می گردد معمولا منجر به آلودگی محیط، به جای ماندن مقداری از واکنشگرهای سمی و عدم استفاده از نانوذرات حاصل در کاربرد های زیستی می شود. با توجه به ایجاد آلودگی های زیست محیطی ناشی از سنتز نانوذرات به روش شیمیایی و فیزیکی و همچنین ناسازگاری کاربرد آنها در پزشکی، هدف از این مطالعه سنتز نانوذرات آهن به روش زیستی و بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، باسیلوس مگاتریوم PTCC ۱۶۵۶ در محیط نوترینت براث کشت داده شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی فعال با نسبت ۱ به ۱ با محلول ۰/۱ مولار نیترات آهن ترکیب و سنتز زیستی نانوذرات آهن پس از ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انجام گرفت. سنتز نانوذرات آهن با روش های اسپکتروفتومتر (UV-Vis)، میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، پراش اشعه ایکس (XRD) تایید گردید. سپس بررسی اثرات ضد میکروبی نانوذرات ساخته شده با استفاده از روش های دیسک دیفیوژن و رقت سازی لوله ای (MIC=Minimum inhibitory concentration) بر روی سویه های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس PTCC ۱۴۳۱، باسیلوس سرئوس PTCC ۱۰۱۵ و اشرشیاکلی PTCC ۱۳۹۹، سودوموناس آئروژینوزا PTCC ۱۵۷۱ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: پیک جذبی نانوذرات آهن، در طول موج های ۲۲۰ نانومتر مشاهده شد. نانوذرات آهن سنتز شده مکعبی شکل بودند. میانگین اندازه نانوذرات آهن، در محدوده ۴۰-۶۰ نانومتر بود. MIC به ترتیب برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا برابر با ۰/۰۳۱، ۰/۰۳۱، ۰/۰۷۸، ۰/۰۱۵، ۰/۰۱۵ mg/ml اندازه گیری شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد نانوذرات سنتز شده دارای خاصیت آنتی باکتریایی بر علیه سویه های پاتوژن می باشند. بطوریکه بیشترین قطر هاله عدم رشد توسط نانوذرات زیستی نیترات آهن برای اشرشیاکلی و کمترین قطر هاله عدم رشد برای باسیلوس سرئوس مشاهده شد.

واژه های کلیدی: باسیلوس مگاتریوم، فعالیت ضد باکتریایی، نانوذرات آهن.

مقدمه

نقره از مهم ترین فلزاتی هستند که اکثر مقالات موجود در زمینه سنتز زیستی این دو یون انتشار یافته است (۹). از جمله می توان به سنتز نانوذرات نقره توسط گیاه دارویی بومادران اشاره کرد که روشی کاملا دوستدار طبیعت است (۱۰) همچنین یکی دیگر از شناخته شده ترین تحقیقات انجام شده استفاده از قارچ *Fusarium oxysporum* در سنتز این نانوذرات است (۱۱). در آخرین تحقیقات انجام شده درباره سنتز نانوذرات طلا، از کشت باکتری *Bacillus subtilis* برای احیای یون های سه ظرفیتی طلا از یک محلول کلریدی به نانوذرات پنج تا ۲۵ نانومتری به شکل هرم های چهارضلعی، در دما و فشار محیط استفاده شده است (۱۲). خدمات نانوفناوری به نانوذرات طلا و نقره محدود نشده است، ورود نانوذرات اکسید آهن به علوم زیستی و پزشکی محققین را به تحقیقات در این زمینه واداشته است، به طوریکه سازمان غذا و داروی آمریکا FDA تنها نانوذرات اکسید آهن با روکش دکستران را برای مصارف دارویی و پزشکی تایید نموده است (۱۳). همچنین نانوذرات اکسید آهن به دلیل ویژگی های مغناطیسی مناسب،

نانوتکنولوژی یکی از علوم ظهور یافته مهم در قرن ۲۱ است. تحقیق و توسعه در این رشته خیلی سریع در سراسر جهان رشد کرده است. یکی از محصولات مهم این حوزه نانوذرات فلزی است و در اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر تعریف می شود. نانوذرات فلزی به دلیل خواص نوری منحصر به فرد، خاصیت کاتالیتیک، کاربرد های الکتریکی و مغناطیسی مورد توجه قرار گرفته اند (۱). نانوتکنولوژی علوم مختلف را تحت تاثیر قرار داده و محصولات فراوانی را عرضه کرده است بطوریکه این علم وارد حوزه زیست شناسی و پزشکی گردیده و در این عرصه تاثیرات فراوانی از جمله کاستن از اثرات جانبی داروهای شیمی درمانی گذاشته است (۲). نانوتکنولوژی همچنین برای حل مشکل اساسی در میکروبیولوژی، یعنی مقابله با میکروارگانیسم های مقاوم به آنتی بیوتیک نیز وارد عمل شده است. امروزه خواص ضد میکروبی نانوذرات نقره به اثبات رسیده و به صورت محصولات تجاری عرضه گردیده است (۳-۸). در میان روش های مختلف بیوسنتز نانوذرات، استفاده از باکتری ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است. طلا و

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۹۴۵۹۱ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک می باشد.

*مسئول مقاله: سپیده غنی

آدرس: اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان. تلفن: ۰۸۶-۳۴۱۳۲۴۵۱-۹

E-mail: sepideh.ghani@yahoo.com

الکترونی SEM ریخته شد و پس از خشک شدن توسط میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین خاصیت آنتی باکتریایی

روش دیسک دیفیوژن: در بررسی خاصیت آنتی باکتریایی، سویه های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس PTCC ۱۴۳۱، باسیلوس سوئوس PTCC ۱۰۱۵ به عنوان باکتریهای گرم مثبت و اشرشیاکلی PTCC ۱۳۹۹، سودوموناس آئروژینوزا PTCC ۱۵۷۱ به عنوان باکتری های گرم منفی به کار برده شدند. از هر باکتری با غلظت نیم مک فارلند، ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. در این روش برای هر ۴ باکتری، ۴ پلیت حاوی ۴ دیسک به شرح زیر در نظر گرفته شد: یک دیسک استریل به قطر ۶ میلی متر آغشته به ۶ میکرولیتر محلول ۰/۱ مولار نیترات آهن به منظور بررسی اثر آهن، یک دیسک استریل آغشته به ۶ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی نانو ذره سنتز شده توسط باسیلوس مگاتریوم، یک دیسک استریل آغشته به ۶ میکرولیتر از نانوذره شیمیایی آهن و یک دیسک استریل آغشته به ۶ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری باسیلوس مگاتریوم به عنوان شاهد استفاده گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای بهینه رشد باکتری قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد به عنوان شاخص خاصیت ضد باکتریایی نمونه ها بر اساس میلی متر اندازه گیری و ثبت شد. جهت جلوگیری از احتمال وقوع خطا در کلیه مراحل کار، این آزمایش ها ۳ بار تکرار گردید و نتایج با یکدیگر مقایسه گردید.

روش رقت سازی لوله ای MIC: در روش رقت سازی لوله ای میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری (MIC)، در محیط کشت (Tryptic Soy TSB=Broth) به این صورت انجام گردید که به ۴ مجموعه ۱۰ تایی لوله که حاوی ۱ سی سی محیط TSB استریل بود، به لوله اول ۱ سی سی محلول نانو ذره نیترات آهن اضافه گردید. پس از هم زدن ۱ میلی لیتر از لوله اول به لوله دوم و سپس ۱ میلی لیتر از لوله دوم به لوله سوم و به همین ترتیب تا لوله آخر اضافه شد و سرانجام ۱ میلی لیتر از لوله آخر به بیرون ریخته شد. به تمامی لوله ها ۰/۱ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری فعال اضافه گردید که مطابق با لوله نیم مک فارلند استاندارد شده بود اضافه گردید. در کنار هر سریال رقتی از یک لوله حاوی باکتری و محیط کشت جهت کنترل مثبت و یک لوله حاوی محیط کشت و محلول نانو ذره نیترات آهن جهت شاهد در نظر گرفته شد. تمامی لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای مناسب قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت با توجه به کدورت در لوله ها میزان MIC تعیین گردید (۲۱).

یافته‌ها

اسپکتروفتومتر (UV-Vis): در آنالیز نانو ذرات آهن با اسپکتروفتومتری UV-Vis، پیک جذبی، در طول موج ۲۲۰ نانو متر مشاهده شد که بیانگر وجود نانو ذرات آهن در محلول واکنش است (شکل ۱). بر اساس منابع معتبر، بیشینه پیک جذبی نانو ذرات آهن، در طول موج های ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر می باشد (۲۲).

پراش اشعه ایکس (XRD): در ادامه پژوهش، آنالیز XRD به منظور اثبات تشکیل نانو ذرات آهن انجام گرفت. بر اساس یافته های به دست آمده از ویرایش اشعه ایکس در زاویه 2θ و در درجه به دامنه ۱۰-۶۰° پیک را در درجه های ۳۰/۴، ۳۵/۴۸، ۴۳/۵، ۵۴/۵۹، ۵۶/۸۳ نشان داد که به ترتیب با سطوح ۲۰۰، ۳۱۱،

سمیت اندک، سازگاری زیستی بالا سهولت نسبی سنتز نسبت به نانو ذرات دیگر بیشتر مورد توجه محققین بوده اند (۱۵و۱۴). این ترکیبات دارای خواص ضد میکروبی نیز هستند و گزارشات متعددی مبنی بر اثرات ضد میکروبی این نانو ذرات علیه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت و قارچ ها وجود دارد (۱۸-۱۶). تعدادی از روش های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برای توسعه نانوذرات فلزی به کار برده شده اند (۱۹). روش های شیمیایی که برای سنتز نانو ذرات استفاده می گردد معمولاً منجر به آلودگی محیط، به جای ماندن مقداری از واکنشگرهای سمی و عدم استفاده از نانو ذرات حاصل در کاربردهای زیستی می شود، همچنین روش های شیمیایی و فیزیکی بسیار گران و خطرناک هستند و ممکن است اثر ناسازگاری در کاربرد پزشکی داشته باشند. بنابراین سنتز نانو ذرات با استفاده از روش های بیولوژیک می توانند به حل این مشکل کمک کنند (۲۰و۱۹). بنابراین هدف از این مطالعه بیوسنتز نانو ذرات آهن توسط باسیلوس مگاتریوم و بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات آهن بر علیه باکتری های گرم منفی و گرم مثبت می باشد.

مواد و روش‌ها

مواد و دستگاهها: در این مطالعه کلیه محیط های کشت میکروبی مورد استفاده ساخت شرکت مرک - آلمان بود، همچنین کلیه سویه های باکتریایی استاندارد مورد استفاده از مرکز کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی و عفونی سازمان علمی پژوهشی و صنعتی ایران تهیه و تست های تایید سنتز نانوذرات شامل SEM، Uv vis و XRD در مرکز تحقیقات دانشگاه جامع امام حسین (ع) انجام پذیرفت.

سنتز نانو ذره آهن: در این مطالعه تجربی باسیلوس مگاتریوم (Bacillus megaterium) PTCC1656 در محیط کشت نوترین برات کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از اطمینان از رشد باکتری، سوسپانسیون باکتریایی بدست آمده با محلول نیترات آهن ۰/۱ مولار با نسبت ۱ به ۱ ترکیب گردید، سنتز نانوذره در دمای اتاق در طی زمان ۲۰ دقیقه انجام گرفت. سوسپانسیون حاوی باکتری و نانوذرات آهن را ابتدا از کاغذ صافی واتمن عبور داده و سپس با استفاده از فیلتر میکروبیال ۰/۲۲ میکرون استریل شد.

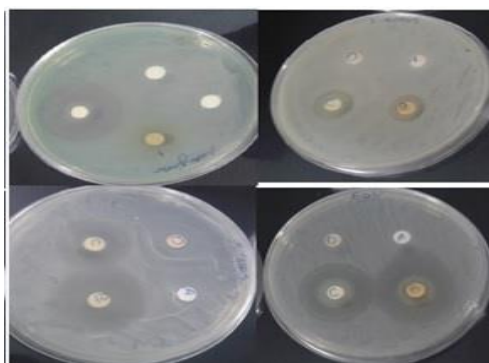
تعیین ویژگی های نانو ذره آهن

Uv-vis: طیف جذبی نانو ذرات سنتز شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب Uv-vis (SERIES8000CECIL) انجام شد. میزان جذب نانو ذرات آهن در محدوده طول موج ۲۰۰-۷۰۰ نانومتر بررسی شد.

XRD: محلول حاوی نانو ذرات ساخته شده، با دور (۱۲۰۰۰rpm) سه مرتبه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله در آون برای خشک شدن نگهداری شد. سرانجام پودر خشک شده نانوذرات آهن برای بررسی نانو ذرات کریستالی با دستگاه XRD مورد بررسی قرار گرفت.

SEM: با استفاده از دستگاه SEM مدل HITACHI S-4500 شکل و اندازه نانو ذرات آهن سنتز شده مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که ۱۵ میکرولیتر از محلول نانو ذرات آهن بر روی گرید های مخصوص میکروسکوپ

نشان دادند. اما در مورد باکتری اشرشیاکلی خاصیت ضد باکتریایی نانو ذرات زیستی و شیمیایی با هم برابر بود و قطر هاله عدم رشد در هر دو مورد برابر با ۲۳ میلی متر بود (شکل ۴).



شکل ۴. هاله عدم رشد باکتری ها در برابر نانو ذرات آهن

جدول ۱. نتایج آزمون آنتی باکتریال (میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری)

بakteri	باسیلوس مگاتریوم (میلی متر)	نانو ذره شیمیایی (میلی متر)	نانو ذره آهن (میلی متر)	نیترات آهن (میلی متر)
B.cereus	۰	۲۶	۱۴	۰
p.aeruginosa	۰	۰	۲۰	۰
S. aureus	۰	۱۳	۱۵	۰
E.coli	۰	۲۳	۲۳	۰

حد اقل غلظت (Minimum inhibitory concentration=MIC)

بازدارندگی: کمترین مقدار MIC توسط نانو ذرات زیستی آهن برای باکتری اشرشیاکلی به دست آمد که با نانو ذره شیمیایی برابر و مقدار آن ۰/۰۰۷۸ mg/ml بود و بیشترین مقدار MIC توسط نانو ذرات زیستی آهن در مورد استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس به دست آمد که مقدار آن برابر ۰/۰۳۱ mg/ml بود. همچنین میزان MIC حاصل از نانو ذره شیمیایی آهن بر روی سودوموناس آئروژینوزا برابر صفر می باشد که دقیقاً با نتایج حاصل از تست دیسک دیفیوژن همخوانی و مطابقت دارد (جدول ۲).

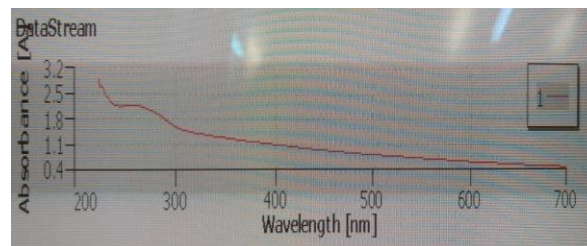
جدول ۲. نتایج حاصل از MIC برای ۴ سویه باکتریایی پاتوژن

بakteri	غلظت نانو ذره زیستی آهن mg/ml	نانو ذره شیمیایی آهن mg/ml
B.cereus	۰/۰۳۱	۰/۰۰۳۹
P. aeruginosa	۰/۰۱۵	۰
S.aureus	۰/۰۳۱	۰/۰۳۱
E.coli	۰/۰۰۷۸	۰/۰۰۷۸

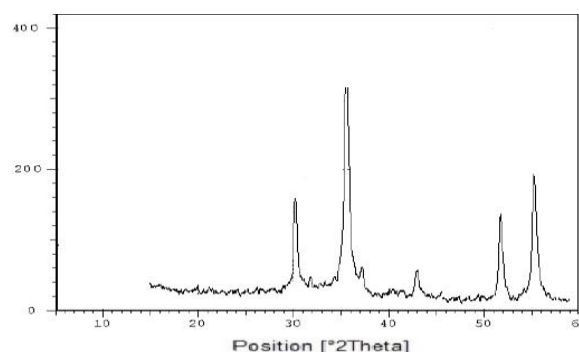
بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد که باکتری باسیلوس مگاتریوم قدرت سنتز نانوذرات آهن را دارد و این نانوذرات زیستی دارای فعالیت ضد باکتریایی هستند. نانو ذرات نقره نیز از طریق میکروارگانیسمها از قبیل قارچ ها، باکتری ها و یا

۴۰۰، ۴۲۲ و ۵۱۱ مرتبط بودند که با الگوی پراش اشعه ایکس ماده (Fe₃O₄) تطابق داشته و فاز جانبی دیگری مشاهده نمی شود (شکل ۲).

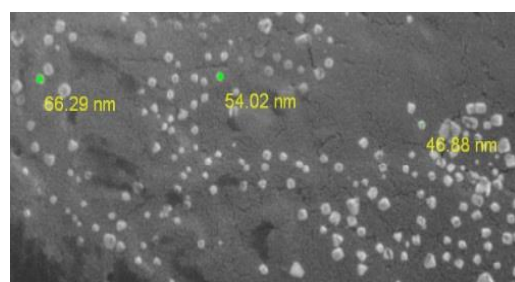


شکل ۱. طیف جذبی UV-vis نانو ذرات آهن



شکل ۲. الگوی XRD از نانو ذرات Fe₃O₄

میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM): تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، نانو ذرات آهن سنتز شده در شکل ۳ نمایش داده شده است. از این شکل برای تایید مورفولوژی و اندازه نانو ذره آهن استفاده می شود. با توجه به تصاویر SEM نانو ذرات آهن دارای شکل مکعبی بودند و اندازه نانو ذرات در بزرگمایی ۲۰۰ nm بین ۴۰ تا ۶۰ نانومتر است که در محدوده اندازه نانو ذرات می باشد.



شکل ۳. تصاویر SEM نانو ذرات مکعبی آهن

دیسک دیفیوژن: پس از سنتز نانو ذرات و بررسی ساختاری آنها، فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات آهن مورد بررسی قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد در روش دیسک گذاری برای ۴ سویه استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا اندازه گیری شد. براساس این نتایج بیشترین خاصیت ضد میکروبی نانوذره زیستی آهن بر روی اشرشیاکلی با قطر هاله عدم رشد ۲۳ میلی متر اندازه گیری گردید و همچنین کمترین میزان خاصیت ضد میکروبی نانوذره زیستی آهن در مورد باسیلوس سرئوس با قطر هاله عدم رشد ۱۴ میلی متر اندازه گیری شد (جدول ۱). همچنین در مورد باسیلوس سرئوس نانو ذرات شیمیایی خاصیت آنتی باکتریایی بیشتری را نسبت به نانو ذرات زیستی آهن

ماکروارگانسیم ها مانند گیاهان، جلبک ها و غیره سنتز می شود، به طوریکه در سال ۲۰۱۰ سنتز نانو ذره نقره با استفاده از سیانوباکتر، *Spirulina platensis* و اکتینوباکتر *Streptomyces spp. 211A* انجام گرفت، که نتایج سنتز نانو ذره نقره در محدوده (۱۶-۷ نانومتر) را نشان داد (۲۳) این در حالیکه در مطالعه حاضر سایز نانوذرات سنتز شده به روش زیستی در محدوده ۴۰-۶۰ نانومتر بود که به نظر می رسد نوع میکروارگانسیم ها و همچنین نوع ماده فلزی اولیه در این زمینه تاثیر گذار است. در مطالعه ای توسط Natarajan و همکارانش سنتز میکروبی نانو ذرات نقره با استفاده از باکتری اشرشیاکلی انجام گرفت، سنتز نانو ذرات نقره با تست uv در ۴۰۰ nm تایید شد (۲۴).

همچنین در مطالعه ای که توسط Rahimi و همکاران انجام گرفت سنتز نانوذرات نقره با استفاده از سه گونه جلبک دریایی خلیج فارس بررسی گردید که نتایج نشان داد هر سه گونه جلبک قادر به سنتز نانو ذرات نقره هستند (۲۵) که این دو مطالعه تایید کننده قدرت و توانایی باکتری ها و جلبک ها در سنتز نانوذرات فلزی می باشد. نتایج مطالعه Pantidos و همکاران بیان کرد که روشهای سبز سنتز نانو ذرات انرژی کمتر و هزینه پایینتری نیاز دارند، همچنین روشهای سبز دوستدار محیط زیست هستند (۲۶) طی مطالعاتی که توسط Pattanayak و همکاران و Eftekhari و همکارانش انجام گرفت، پیک جذبی نانوذرات آهن سنتز شده برابر با ۲۲۰ نانومتر بود (۲۷ و ۲۸) که با تحقیق حاضر همخوانی داشت. در مطالعه دیگری که توسط Awwad و همکارش، سنتز نانوذرات آهن با استفاده از عصاره برگ نارگیل انجام گرفت، پیک جذبی نانوذرات برابر ۲۳۳ نانومتر بود و اندازه ذرات ۵-۸ نانومتر گزارش شده است (۲۹)، که از لحاظ پیک جذبی با مطالعه ما تقریباً هم خوانی دارد ولی سایز نانوذرات متفاوت می باشد که قطعاً با تکنیک ساخت با استفاده از عصاره گیاهی بی ارتباط نمی باشد. در Behera و همکاران، نانوذرات اکسید آهن به روش شیمیایی ساخته شد و خواص ضد میکروبی آن سنجیده شد، بطوریکه نانوذراتی با سایز نامنظم ۱۲۰-۱۰۰ نانومتر ساخته شد و بیشترین خاصیت ضد میکروبی این نانوذرات بر روی باسیلوس لیگنی فورمیس بود و بر روی دو باکتری سودوموناس آئروژینوزا و شیگلا فلکسنری هیچ فعالیت ضد میکروبی گزارش نشد، این در حالی است که سایز نانوذرات حاصل از تحقیق ما منظم تر (۶۰-۴۰ نانومتر) بود (۳۰) و همچنین در مطالعه ما نیز نانوذرات

شیمیایی هیچ تاثیر ضد باکتریایی روی سودوموناس آئروژینوزا نداشت که با تحقیق مذکور همسو می باشد ولی از طرفی نانوذرات سنتز شده به روش زیستی دارای خاصیت ضد میکروبی بر روی سودوموناس آئروژینوزا بود، لذا می توان نتیجه گرفت نانوذرات زیستی آهن در مقایسه با نانوذرات شیمیایی آهن در مقابل سودوموناس آئروژینوزا دارای خاصیت ضد باکتریایی قابل توجهی هستند. در مطالعه حاضر خاصیت آنتی باکتریایی نانو ذرات آهن سنتز شده در برابر باکتری *E. coli* بیشتر از سایر باکتری ها بود اما نتایج حاصل از پژوهشی که توسط Mohamed و همکاران انجام شد، نانو ذرات آهن بر روی باسیلوس سوبتیلیس خاصیت آنتی باکتریایی بیشتری را نسبت به *S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa* نشان دادند، این درحالی است که نانوذرات ساخته شده توسط Azzam و همکاران در سال ۲۰۱۵ با استفاده از قارچ آلترناریا سنتز گردیده است و همچنین سایز نانوذرات ساخته شده در محدوده ۹-۳ نانومتر می باشد که از این لحاظ با مطالعه حاضر متفاوت می باشد (۳۱).

در این مطالعه سنتز نانو ذرات آهن با استفاده از باکتری باسیلوس مگاتریوم انجام گرفت. پیک جذبی نانو ذرات آهن، در طول موج ۲۲۰ نانومتر مشاهده شد، نانو ذرات آهن سنتز شده دارای شکل مکعبی بودند. میانگین اندازه نانوذرات آهن، ۶۰-۴۰ نانومتر بود. در این مطالعه با استفاده از تست XRD از وجود و سنتز نانو کریستال های آهن توسط باکتری اطمینان حاصل شد. تمام نمونه ها با الگوی پراش اشعه ایکس ماده (Fe₃O₄) تطابق داشته و فاز جانبی دیگری مشاهده نشد (۳۲ و ۳۳). در این مطالعه، باسیلوس سرئوس نانو ذرات شیمیایی خاصیت آنتی باکتریایی بیشتری را نسبت به نانو ذرات زیستی آهن نشان دادند اما در مورد باکتری اشرشیاکلی خاصیت آنتی باکتریایی نانو ذرات زیستی و شیمیایی با هم برابر بود. در مورد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا خاصیت آنتی باکتریایی نانو ذرات زیستی بیشتر از نانو ذرات شیمیایی بود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان واحد اراک جهت حمایت از این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

Biosynthesis of Iron Nano-Particles by *Bacillus Megaterium* and Its Anti-Bacterial Properties

S. Ghani (MSc)*¹, B. Rafiee (MSc)¹, D. Sadeghi (PhD)², M. Ahsani (BSc)

1.Young Researchers and Researchers Club, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, I.R.Iran

2.Biology Research Center, Faculty of Science & Basic Sciences, Imam Hossein University of Technology, Tehran, I.R.Iran

3.Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Arak University, Arak, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(7); Jul 2017; PP: 13-19

Received: Apr 9th 2017, Revised: May 10th 2017, Accepted: Jun 20th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: According to the environmental pollution caused by chemical and physical methods of synthesis of nanoparticles and their incompatibility in medical, The aim of this study is biosynthesis of iron nano particles and its antibacterial activity.

METHODS: In this experimental study, *Bacillus megaterium* PTCC1656 was cultured in nutrient broth medium, Then bacterial suspension was combined at a ratio of 1:1 with 0.1 M iron nitrate. Synthesis of iron nanoparticles confirmed with Uv-vis, XRD and SEM techniques. Antibacterial properties of nanoparticles were evaluated by disk diffusion method and dilution tube MIC (Minimum inhibitory concentration) on standard strains of *Staphylococcus aureus* PTCC 1431, *Bacillus cereus* 1015 PTCC and *Escherichia coli* PTCC 1399, *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1571.

FINDINGS: The peak of absorbtion for iron nanoparticle was 220 nm. Iron nanoparticles was cuboid shape. The average size of the nanoparticles was 40-60 nm. MIC was measured for *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* 0.031, 0.031, 0.0078, 0.015 mg/ml respectively.

CONCLUSION: Results showed iron nanoparticle have antibacterial effect on pathogenic bacteria. The highest inhibition zone diameter by biological iron nitrate nanoparticles was observed for *E. coli* and the minimum diameter of inhibition was observed for *Bacillus cereus*.

KEY WORDS: *Bacillus Megaterium*, Anti-Bacterial Activity, Iron Nanoparticles.

Please cite this article as follows:

Ghani S, Rafiee B, Sadeghi D, Ahsani M. Biosynthesis of Iron Nano-Particles by *Bacillus Megaterium* and Its Anti-Bacterial Properties. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(7):13-19.

* Corresponding author: S.Ghani (MSc)

Address: Young Researchers Club, Islamic Azad University, Arak, I.R.Iran

Tel: +98 86 34132451-9

E-mail: sepeideh.ghani@yahoo.com

References

1. 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. *J Nanosci Nanotechnol*. 2005;5(10):1665-71.
2. Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Sci*. 1998;279(5349):377-80.
3. Gopinath V, MubarakAli D, Priyadarshini S, Priyadharsshini NM, Thajuddin N, Velusamy P. Biosynthesis of silver nanoparticles from Tribulus terrestris and its antimicrobial activity: A novel biological approach. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;(96):69-74.
4. Prabhu S, Poulouse EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett*. 2012;2(1):1-10.
5. Rai M, Deshmukh S, Ingle A, Gade A. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol*. 2012;112(5):841-52.
6. Bankura K, Maity D, Mollick M, Mondal D, Bhowmick B, Bain M, Chakraborty A, Sarkar J, Acharya K, Chattopadhyay D. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium. *Carbohydr Polym*. 2012;89(4):1159-65.
7. Zhang H, Smith JA, Oyanedel-Craver V. The effect of natural water conditions on the anti-bacterial performance and stability of silver nanoparticles capped with different polymers. *Water Res*. 2012;46(3):691-9.
8. Yang G, Xie J, Hong F, Cao Z, Yang X. Antimicrobial activity of silver nanoparticle impregnated bacterial cellulose membrane: Effect of fermentation carbon sources of bacterial cellulose. *Carbohydr Polym*. 2012;87(1):839-45.
9. Konishi Y, Nomura T, Tsukiyama T, Saitoh N. Microbial preparation of gold nanoparticles by anaerobic bacterium. *Trans Mater Res Soc Jpn*. 2004;29:2341-3.
10. Karimi J, Mohsenzade S. Plant synthesis of silver nanoparticles by achillea wilhelmsii Pharmaceutical plant. *R J Med Sci*. 2013;20(111):64-9. [In Persian]
11. Fayaz AM, Girilal M, Venkatesan R, Kalaichelvan PT. Biosynthesis of anisotropic gold nanoparticles using Maduca longifolia extract and their potential in infrared absorption. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;88(1):287-91.
12. Dubey S, Lahtinen M, Sillanpaa M. Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of Rosa rugosa. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2010;364(1):34-41.
13. Viota JL, Arroyo FJ, Delgado AV, Horno J. Electrokinetic characterization of magnetite nanoparticles functionalized with amino acids. *J Colloid Interface Sci*. 2010;344(1):144-49.
14. Ge YQ, Zhang Y, Xia JG, Ma M, He SY, Nie F, Gu N. Effect of surface charge and agglomerate degree of magnetic iron oxide nanoparticles on KB cellular uptake in vitro. *Colloid Surface B*. 2009;73(2):294-301.
15. Colombo M, Carregal-Romero S, Casula MF, Gutiérrez L, Morales MP, Böhm IB, Heverhagen JT, Prosperi D, Parak WJ. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem Soc Rev*. 2012;41(11):4306-34.
16. Ramteke C, Ketan Sarangi B, Chakrabarti T, Mudliar S, Satpute D, Avatar Pandey R. Synthesis and broad spectrum antibacterial activity of magnetite ferrofluid. *Curr Nanosci*. 2010;6(6):587-91.
17. Grumezescu AM, Mihaiescu DE, Mogosanu DE, Chifiriuc MC, Lazar V, Calugarescu I, Traistaru V. In vitro assay of the antimicrobial activity of Fe₃O₄ and CoFe₂O₄ / oleic acid -core/shell on clinical isolates of bacterial and fungal strains. *Optoelectron Adv Mat*. 2010;4(11):1798-1801.
18. Chifiriuc C, Lazar V, Bleotu C, Calugarescu I, Grumezescu AM, Mihaiescu DE, Mogosanu DE, Buteica AS, Buteica E. Bacterial adherence to the cellular and inert substrate in the presence of Cofe₂O₄ and Fe₃O₄/Oleic Acid - Core/Shell. *Dig J Nanomater Bios*. 2011;6(1):37-42.

- 19.Chandran SP, Chaudhary M, Pasricha R, Ahmad A, Sastry M. Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnol Prog.* 2006;22(2):577-83.
- 20.Roy N, Barik A. Green synthesis of Silver nanoparticles from the unexploited weed resources. *Int J Nanotechnol.* 2010;7(6):1131-9.
- 21.Nasiri A, Malakootian M, Tamaddon F. Synthesis Nano ZnO Assisted by Ultrasound Irradiation and Evaluation of Antimicrobial Properties. *J Tooloo Behdasht.* 2014;46(4):115-128.[In Persian].
- 22.Jagtap UB, Bapat VA. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* lam. Seed extract and its antibacterial activity. *Indust Crop Pro.* 2013;46:132-7.
- 23.Tsibakhashvili N, Kalabegishvili T, Gabunia V, Gintury E, Kuchava N, Bagdavadze N, Pataraya D, Gurielidze M, Gvarjaladze D, Lomidze L. Synthesis of silver nanoparticles using bacteria. *Nano Stu,* 2010;2:179-82.
- 24.Natarajan K, Selvaraj S, Murty VR. Microbial production of silver nanoparticles. *Digest J Nanomat Biostruct.* 2010;5(1):135-40.
- 25.Rahimi Z, Yusefzadi M, Noori M, Akbarzadeh A. synthesis of silver nanoparticles using three species of macro algae of Persian Gulf. *Oceanography.* 2014;5(19):71-8.[In Persian]
- 26.Pantidos N, Horsfall LE. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. *J Nanomed Nanotechnol.* 2014;5(5):1-10.
- 27.Pattanayak M, Nayak PL. Ecofriendly green synthesis of iron nanoparticles from various plants and spices extract. *Int J Plant.* 2013;3(1):68-78.
- 28.Eftekhari K, Pasha K, Tarigopula M, Mounica S, Sura M, Daddam J. Biosynthesis and characterization of silver and iron nanoparticles from *Spinacia oleracea* and their antimicrobial studies. *Int J Plant.* 2015;5(1):116-21.
- 29.Awwad A, Salem N. A green and facile approach for synthesis of magnetite nanoparticles. *Nanosci Nanotechnol.* 2012;2(6):208-13.
- 30.Behera SS, Patra JK, Pramanik K, Panda N, Thatoi H. Characterization and evaluation of antibacterial activities of chemically synthesized iron oxide nanoparticles. *World J Nano Sci Engine.* 2012;2(4):196-200.
- 31.Mohamed YM, Azzam AM, Amin BH, Safwat NA. Mycosynthesis of iron nanoparticles by *Alternaria alternate* and its antibacterial activity. *African J of biotechnol.* 2015;14(4):1234-41.
- 32.Velineni S, Brahmaprakash GP. Survival and phosphate solubilizing ability of *Bacillus megaterium* in liquid inoculants under high temperature and desiccation stress. *J Agr Sci. Tech.* 2011;13(5):795-802.
- 33.Mahdavi M, Namvar F, Ahmad MB, Mohamad R. Green biosynthesis and characterization of magnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles using seaweed (*Sargassum muticum*) aqueous extract. *Molecules.* 2013;18(5):5954-64.