

Penilaian dan Pengelasan Siderofor yang Dihasilkan oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII

(Evaluation and Classification of Siderophores Produced by *Brevibacterium* sp. isolate NII)

Muhammad Ezzul Faiq Mohd Effendi, Nur 'Izzati Ismail, Nurull Muna Daud & Md Nabil Aizat Junaidi @ Addie*

Jabatan Kejuruteraan Kimia dan Proses, Fakulti Kejuruteraan dan Alam Bina,
 Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

*Corresponding author: nurullmuna.daud@gmail.com/nurullmuna.daud@ukm.edu.my/
nurezatyismail@ukm.edu.my

Received 13 August 2025, Received in revised form 2 March 2026
 Accepted 2 April 2026, Available online 30 August 2026

ABSTRAK

Siderofor ialah molekul pengkelat besi (Fe) yang dihasilkan oleh mikroorganisma dalam keadaan terhad Fe, dan berfungsi membantu mikroorganisma mendapatkan Fe daripada persekitaran. Molekul ini juga mempunyai kepentingan dalam meningkatkan ketersediaan Fe dalam sesuatu sistem. Kajian ini dijalankan untuk menilai keupayaan *Brevibacterium* sp. pencilan NII dalam menghasilkan siderofor serta mengenal pasti kumpulan siderofor yang dihasilkan. Penghasilan siderofor dinilai secara kualitatif menggunakan ujian agar Chrome Azurol S (CAS) dan secara kuantitatif menggunakan ujian CAS cecair selama tujuh hari. Bagi ujian kuantitatif, bacaan penyerapan pada 630 nm digunakan untuk mengira peratusan unit siderofor; bacaan diambil selepas tindak balas supernatan kultur dengan reagen CAS selama 30 minit pada suhu bilik. Pengelasan siderofor pula dilakukan menggunakan ujian FeCl_3 , Arnow dan ujian keasidan, manakala spektroskopi inframerah fourier transformasi (FTIR) digunakan untuk mengesahkan kumpulan berfungsi siderofor. Hasil analisis secara kualitatif menunjukkan berlakunya perubahan warna biru kepada jingga di sekeliling koloni. Ini membuktikan aktiviti pengeluaran siderofor. Dalam analisis secara kuantitatif, ujian CAS cecair menunjukkan peningkatan penghasilan siderofor daripada 24.9% kepada 54.3% sepanjang tempoh tujuh hari, menandakan penghasilan siderofor meningkat seiring penambahan masa pengeraman. Dari segi pengelasan kumpulan siderofor, keputusan positif ujian FeCl_3 (pembentukan warna jingga) menunjukkan siderofor yang dihasilkan berkemungkinan daripada kumpulan hidroksamat, manakala keputusan negatif ujian Arnow (tiada pembentukan warna merah) dan ujian keasidan (pembentukan mendakan yang ketara) menunjukkan tiada petunjuk bagi kumpulan katekolat dan karboksilat dalam sampel. Analisis FTIR turut menunjukkan jalur serapan utama yang konsisten dengan kumpulan hidroksamat, sekali gus menyokong dapatan ujian biokimia. Secara keseluruhan, dapatan ini menunjukkan *Brevibacterium* sp. pencilan NII menghasilkan siderofor kumpulan hidroksamat secara aktif dan memberikan indikasi awal untuk diterokai dalam aplikasi berkaitan ketersediaan Fe, termasuk konteks bioremediasi pada masa hadapan.

Kata kunci: *Brevibacterium* sp. pencilan NII; Chrome Azurol S; katekolat; hidroksamat; karboksilat

ABSTRACT

Siderophores are iron (Fe)-chelating molecules produced by microorganisms under iron-limiting conditions, and they help microbes acquire Fe from the environment. These molecules are also of interest for applications because they can enhance Fe availability in a given system. This study evaluated the ability of *Brevibacterium* sp. isolate NII to produce siderophores and to determine the siderophore group produced. Siderophore production was assessed qualitatively using the Chrome Azurol S (CAS) agar assay and quantitatively using a liquid CAS assay monitored for seven days. For the quantitative assay, absorbance at 630 nm was used to calculate the percentage of siderophore units, readings were taken after the culture supernatant was reacted with the CAS reagent for 30 minutes at room temperature.

*Siderophore classification was carried out using FeCl₃, Arnow, and acid-based tests, while Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy was performed to support functional-group identification. Qualitatively, a distinct color change from blue to orange around the bacterial colonies indicated siderophore secretion. The liquid CAS assay showed an increase in siderophore production from 24.9% to 54.3% over the seven-day period, indicating time-dependent production during incubation. For classification, a positive FeCl₃ reaction (orange coloration) suggested that the siderophores produced were most consistent with the hydroxamate group, whereas negative results from the Arnow and acid-based tests indicated no evidence of catecholate or carboxylate groups in the sample. FTIR analysis further showed major absorption bands consistent with hydroxamate-related functional groups, supporting the biochemical test findings. Overall, these results confirm that *Brevibacterium* sp. isolate NII actively produces hydroxamate-type siderophores and provide an initial indication of potential for further exploration in Fe-related applications, including future bioremediation studies.*

Keywords: *Brevibacterium* sp. isolate NII; Chrome Azurol S; catecholate; hydroxamate; carboxylate

PENDAHULUAN

Besi (Fe) ialah nutrien penting untuk hampir semua organisma, memainkan peranan kritikal dalam proses seperti respirasi, fotosintesis, dan penetapan nitrogen (Xu et al. 2023). Walaupun Fe merupakan unsur yang banyak di kerak bumi, ia selalunya berada dalam bentuk ferik (Fe³⁺), tidak larut di bawah keadaan aerobik dan pH neutral hingga sedikit beralkali, menyebabkan ketersediaannya kepada organisma menjadi sangat terhad (Kuemmerli 2022). Mikroorganisma, khususnya bakteria, telah berevolusi dengan mekanisme canggih untuk mengatasi had ini, terutamanya melalui sintesis siderofor. Molekul pengikat Fe khusus ini memudahkan pemerolehan dan pengangkutan Fe ke dalam sel, sekali gus meningkatkan kelangsungan hidup organisma dalam persekitaran kekurangan Fe (Srivastava et al. 2022).

Penyelidikan sedia ada mengenai siderofor banyak tertumpu pada genera bakteria seperti *Pseudomonas* dan *Bacillus*, yang diketahui menghasilkan banyak siderofor dan mempunyai kebolehsuaian yang luas dalam persekitaran (Ahmed & Holmström 2014). Namun begitu, perhatian bagi genera bakteria *Brevibacterium*, genus bakteria Gram-positif yang telah menunjukkan potensi untuk menghasilkan siderofor dalam keadaan kekurangan Fe amat terhad. Antara kajian paling awal yang direkodkan ialah pada 2006 oleh Noordman et al. (2006).

Setakat pengetahuan, kajian lanjutan bagi genera bakteria *Brevibacterium* hanya dilakukan berikutnya pada tahun 2016 oleh Tamilselvi et al. (2016) dengan tumpuan diberikan kepada aplikasi siderofor bagi rawatan tanah tercemar. Kajian terkini mencadangkan bahawa *Brevibacterium* sp. pencilan NII bukan sahaja menyumbang kepada ketersediaan Fe dalam rizosfera, malah turut berperanan dalam mempromosikan pertumbuhan tumbuhan dan memulihkan tanah yang tercemar (Płociniczak et al. 2016).

Walaupun kajian semasa menekankan potensi ekologi dan bioteknologi siderofor, penilaian sistematik terhadap penghasilan dan pengelasan siderofor oleh *Brevibacterium*

sp. pencilan NII masih terhad. Di samping itu, kebanyakan kajian terdahulu lebih memberi tumpuan kepada kaedah kualitatif dan sering mengabaikan analisis kuantitatif serta struktur yang terperinci. Kekurangan ini menghalang pemahaman menyeluruh mengenai kepelbagaian dan fungsi siderofor.

Kajian ini bertujuan untuk menangani jurang tersebut dengan menilai dan mengelaskan siderofor yang dihasilkan oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII. Secara khusus, penyelidikan ini menggabungkan penilaian kualitatif dan kuantitatif menggunakan ujian Chrome Azurol S (CAS) dan kaedah biokimia untuk mengelaskan siderofor kepada kumpulan katekolat, hidroksamat, dan karboksilat. Selain itu, spektroskopi inframerah Fourier transformasi (FTIR) akan digunakan untuk mengesahkan identiti struktur.

Dengan menyediakan rangka kerja metodologi, kajian ini diharap dapat digunakan sebagai salah satu rujukan kepada pengembangan pengetahuan mengenai mikroorganisma penghasil siderofor, yang mempunyai potensi dalam aplikasi pemulihan alam sekitar mahupun pertanian lestari pada masa hadapan.

BAHAN DAN KAEDAH

SUMBER DAN PENYEDIAAN BAKTERIA

Bakteria tunggal *Brevibacterium* sp. pencilan NII diperolehi hasil daripada pemencilan bakteria pada akar tumbuhan *Scirpus grossus* yang terdapat di rumah hijau Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM). Ia telah disaring terlebih dahulu oleh Ismail et al. (2019) dan disimpan dalam stok gliserol pada suhu <0°C.

Bagi persediaan eksperimen, stok gliserol dinyahbeku, dan bakteria diambil lalu diserakkan pada plat agar nutrien (NA) (OXOID, USA) di bawah keadaan aseptik. NA disediakan dengan melarutkan 28 g serbuk NA ke dalam 1 L air suling. pH larutan dilaras kepada 7.3 ± 0.2, dan disterilkan dalam alat autoklaf Model Hiclave HVE-50 (Hirayama, Jepun) pada suhu 121 °C selama 15 minit.

Plat-plat yang mengandungi serakan bakteria dieram pada suhu 30 °C selama 24–48 jam untuk mendapatkan koloni bakteria segar, yang kemudiannya disubkultur dan disimpan pada suhu bilik bagi penggunaan projek ini.

ANALISIS KUALITATIF PENGHASILAN SIDEROFOR

Ujian agar Chrome Azurol S (CAS) digunakan untuk mengesan penghasilan siderofor, berdasarkan kaedah universal CAS agar oleh Schwyn & Neilands (1987) dengan pengubahsuaian penyediaan medium seperti diterangkan oleh Srimathi & Suji (2018). Medium CAS disediakan dengan mencampurkan 60.5 mg pewarna CAS dalam 50 mL air suling, 72.9 mg heksadesiltrimetilammonium bromida (HDTMA) (Chemiz, Malaysia) dalam 40 mL air suling, dan 27 mg ferik klorida heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Chemiz, Malaysia) yang dilarutkan dalam 10 mL asid hidroklorik (HCl) 10 mM (Chemiz, Malaysia). Tiga larutan ini digabungkan untuk membentuk reagen CAS, yang kemudiannya dicampur dengan asas agar nutrien (Srimathi & Suji 2018).

Koloni *Brevibacterium* sp. pencilan NII diserakkan pada plat agar CAS dan dieram dalam inkubator (Protech S1-100D, Malaysia) pada suhu 30 °C selama 24–48 jam. Setiap ujian dijalankan dalam empat ulangan bebas ($n = 4$). Diameter halo jingga diukur menggunakan pembaris (cm) pada dua arah seranjang merentasi pusat koloni (diameter luar-ke-luar halo), dan nilai purata direkodkan bagi setiap ulangan. Pembentukan halo berwarna jingga di sekeliling koloni menunjukkan penghasilan siderofor oleh bakteria (Schwyn & Neilands, 1987).

ANALISIS KUANTITATIF PENGHASILAN SIDEROFOR

Bagi analisis kuantitatif, ujian CAS dalam bentuk cecair dijalankan. Kaldu nutrien terubah suai yang mengandungi 10 g/L pepton, 3 g/L ekstrak yis, dan 5 g/L natrium klorida disediakan, dengan penambahan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sehingga mencapai kepekatan Fe akhir sebanyak 0.01 mM. Medium ini disterilkan pada suhu 121 °C selama 1 jam. Selepas inokulasi *Brevibacterium* sp. pencilan NII, kultur dieram pada suhu 30 °C dan kelajuan 150 rpm selama 48 jam. Bagi penilaian kuantitatif, penghasilan siderofor dipantau selama 7 hari. Pada setiap hari, sampel kultur diambil dan diempar pada 8,000 rpm selama 8 minit untuk memisahkan supernatan daripada endapan sel.

Supernatan yang diperoleh digunakan untuk ujian CAS cecair seperti yang diterangkan berikut. Campuran 0.5 mL reagen CAS dan 0.5 mL supernatan disediakan dalam tabung uji dan dibiarkan bertindak balas pada suhu

bilik selama 30 minit. Nilai penyerapan diukur pada panjang gelombang 630 nm menggunakan spektrofotometer HACH DR6000 (USA), dan penghasilan siderofor dinyatakan sebagai peratusan unit siderofor (Schwyn & Neilands 1987). Tempoh 7 hari dipilih sebagai tempoh saringan untuk menentukan trend awal hingga puncak penghasilan siderofor di bawah keadaan kultur kajian ini diperoleh. Bagi tempoh yang lebih panjang sebagai contoh 15 hari, lazimnya digunakan untuk kajian kinetik jangka panjang.

$$\text{Peratusan Siderofor (\%)} = \frac{A_r - A_s}{A_r} \times 100$$

Dimana A_r ialah penyerapan reagen CAS + kaldu nutrien (tanpa bakteria) manakala A_s ialah penyerapan sampel (CAS + supernatan).

PENGELASAN SIDEROFOR

Beberapa ujian biokimia dijalankan untuk mengelaskan siderofor kepada kumpulan hidroksamat, katekolat, atau karboksilat:

Hidroksamat (Ujian FeCl_3): Ujian FeCl_3 digunakan untuk mengesan siderofor kumpulan hidroksamat dalam supernatan kultur *Brevibacterium* sp. Larutan HCl pada kepekatan 1 N disediakan dengan mencairkan HCl pekat menggunakan air suling. Ferik klorida ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) digunakan sebagai reagen, dengan larutan 5 mM yang disediakan dengan melarutkan 13.5 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dalam 10 mL air suling.

Bagi ujian ini, 0.5 mL supernatan kultur digunakan selepas diemparkan. 0.5 mL larutan FeCl_3 5 mM ditambah ke dalam kuvet yang mengandungi supernatan. Pembentukan warna jingga menunjukkan kehadiran kumpulan hidroksamat. Keamatan warna diukur secara spektrofotometrik pada 420–450 nm untuk mengkuantifikasi kandungan hidroksamat. Kaedah ini menyediakan cara yang boleh dipercayai untuk mengesan siderofor hidroksamat (Schwyn & Neilands 1987).

Katekolat (Ujian Arnow): Reagen nitrit-molibdat disediakan dengan menambah 10 g natrium nitrit (NaNO_2) (Chemiz, Malaysia) dan 10 g natrium molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Chemiz, Malaysia) dan dilarutkan dalam 100 mL air suling. Larutan HCl digunakan pada kepekatan 1 N, yang disediakan dengan mencairkan HCl pekat menggunakan air suling. Natrium hidroksida (NaOH) (Chemiz, Malaysia) disediakan sebagai larutan 1 N dengan melarutkan 4 g NaOH berbutir dalam 100 mL air suling.

Bagi ujian ini, 0.5 mL supernatan kultur dicampur dengan 0.5 mL reagen nitrit-molibdat dalam tabung uji. Kemudian, 1 mL HCl 1 N ditambah untuk mewujudkan

suasana berasid, diikuti dengan 1 mL NaOH 1 N bagi meneutralkan tindak balas. Kehadiran kumpulan katekolat ditunjukkan oleh pembentukan warna merah, yang diukur secara spektrofotometrik pada 510 nm. Kaedah ini memastikan pengesanan siderofor katekolat yang boleh dipercayai (Arnow 1937; Ahmed & Holmström 2014).

Karboksilat (Ujian Keasidan): Ujian keasidan dijalankan untuk mengesan kehadiran siderofor kumpulan karboksilat dengan memerhatikan perubahan keterlarutan dan tingkah laku pada pelbagai tahap pH. Larutan HCl berkepekatan 0.5 M disediakan dengan mencairkan HCl pekat menggunakan air suling.

Dalam ujian ini, 0.5 mL supernatan kultur diisi ke dalam beberapa tabung uji. Sebanyak 0.5 mL HCl 0.5 M ditambah. Selepas pH dilaraskan, sampel diperhatikan untuk sebarang perubahan keterlarutan, pemendakan, atau tindak balas yang kelihatan. Siderofor karboksilat biasanya kekal larut dalam keadaan pH neutral hingga berasid, dan ketiadaan perubahan keterlarutan pada pH ini menunjukkan kehadirannya.

Kaedah ini menawarkan pendekatan tidak langsung tetapi berguna untuk mengesan kehadiran siderofor kumpulan karboksilat. Prinsip asas ujian ini adalah bahawa siderofor kumpulan karboksilat biasanya kekal larut dalam larutan berasid atau neutral. Oleh itu, jika tiada perubahan seperti pemendakan atau kekeruhan berlaku selepas penambahan HCl, ia menunjukkan kemungkinan kehadiran siderofor karboksilat. Walau bagaimanapun, untuk memastikan ketepatan, ujian ini perlu digabungkan dengan kaedah biokimia lain seperti ujian Arnow dan FeCl_3 (Arora & Verma 2017; Schwyn & Neilands 1987)

ANALISIS PENCIRIAN KUMPULAN BERFUNGSI

Spektroskopi inframerah Fourier transformasi (FTIR) digunakan untuk mengenal pasti kumpulan berfungsi yang terdapat dalam siderofor yang dihasilkan oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII (Jamali et al. 2022). Sampel siderofor diperoleh daripada ujian kuantitatif, di mana bakteria dikultur dalam kaldu nutrien terubah suai di bawah keadaan kekurangan besi. Kultur dieram pada suhu 30 °C dan kelajuan 150 rpm selama 48 jam sebelum diemparkan pada 8,000 rpm selama 8 minit untuk memisahkan sel bakteria. Supernatan jernih yang mengandungi siderofor dikumpulkan dan dianalisis.

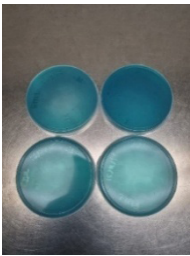
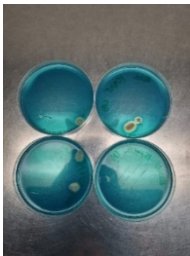
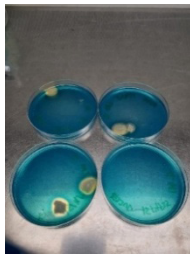
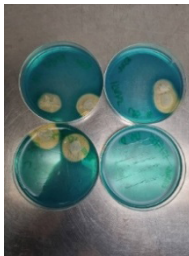
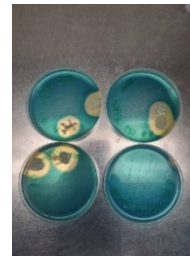
Spektrum FTIR direkodkan dalam julat 400–4000 cm^{-1} dengan resolusi 4 cm^{-1} . Spektrum FTIR dianalisis bagi mengesan jalur penyerapan yang sepadan dengan kumpulan berfungsi utama dalam struktur siderofor seperti hidroksamat ($-\text{C}=\text{O}$), katekolat ($-\text{OH}$ dan $-\text{C}=\text{C}$ aromatik), dan karboksilat ($-\text{COOH}$). Jalur-jalur ini kemudian dibandingkan dengan spektrum rujukan bagi mengesahkan struktur kimia yang dihasilkan oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII. Kehadiran puncak-puncak khas ini memberi gambaran lanjut mengenai sifat kimia dan klasifikasi siderofor yang disintesis (Brick et al. 2025).

KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

ANALISIS KUALITATIF PENGHASILAN SIDEROFOR

Penghasilan siderofor oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII dinilai secara kualitatif menggunakan agar CAS. Seperti yang ditunjukkan dalam Jadual 1, perubahan warna dari biru kepada jingga telah diperhatikan di sekeliling koloni bakteria pada plat CAS yang mengandungi Fe^{3+} bermula dari hari ke-2 hingga hari ke-7. Warna jingga yang terbentuk merupakan hasil kompleks ion Fe^{3+} oleh siderofor, yang memutuskan kompleks biru asal CAS-Fe.

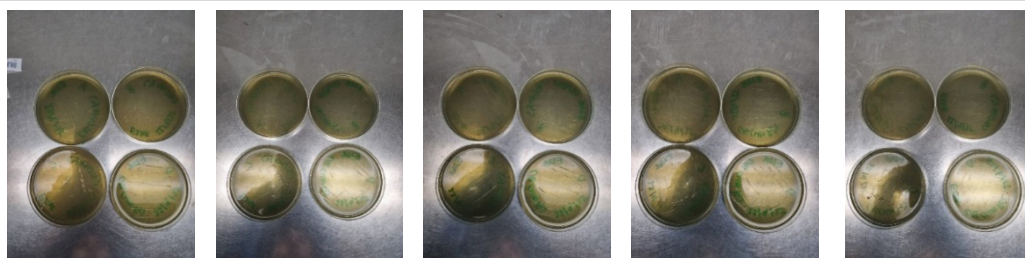
JADUAL 1. Pemerhatian perubahan warna medium agar CAS oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII

Keadaan operasi	Hari				
	Hari-0	Hari-2	Hari-3	Hari-6	Hari-7
CAS dengan Fe^{3+}					

bersambung...

...sambungan

Kawalan
tanpa Fe^{3+}



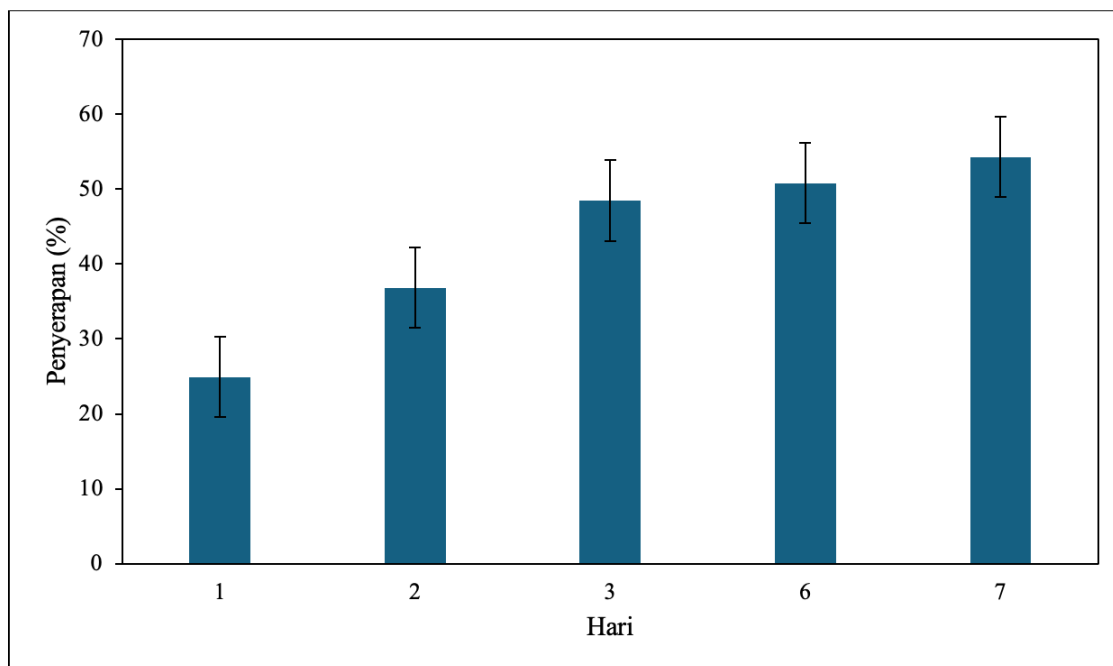
Dalam kajian ini, zon jingga yang terbentuk di sekitar koloni *Brevibacterium* sp. pencilan NII menunjukkan diameter kira-kira 2.5 hingga 3.0 cm ($n = 4$; diukur menggunakan pembaris sebagai diameter luar-ke-luar halo), menunjukkan penghasilan siderofor yang aktif. Sebaliknya, plat kawalan tanpa ion Fe^{3+} tidak menunjukkan sebarang perubahan warna, membuktikan bahawa interaksi tersebut berlaku khusus akibat pengikatan Fe^{3+} oleh siderofor yang dirembes oleh bakteria.

Pemerhatian ini menunjukkan bahawa *Brevibacterium* sp. pencilan NII menghasilkan siderofor secara aktif dalam persekitaran yang mengandungi besi. Kajian ini disokong oleh Fuadi et al. (2022), yang melaporkan bahawa *Providencia* terpenkil daripada akar nanas menghasilkan zon jingga yang jelas pada medium CAS dengan Fe^{3+} , manakala tiada perubahan diperhatikan pada plat kawalan tanpa Fe.

Kajian oleh Bagmare et al. (2019) turut menunjukkan keputusan yang serupa bagi strain *Pseudomonas fluorescens* dan *Azospirillum lipoferum*, memperkukuh bahawa zon warna jingga adalah petunjuk visual penghasilan siderofor kumpulan hidroksamat. Oleh itu, keputusan ini membuktikan pencapaian objektif kajian, iaitu mengenal pasti keupayaan penghasilan siderofor secara kualitatif oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII.

ANALISIS KUANTITATIF PENGHASILAN SIDEROFOR

Analisis kuantitatif kepekatan siderofor yang dirembeskan oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII telah dijalankan menggunakan ujian CAS cecair. Peratusan penyerapan siderofor (% *siderophore* unit) dihitung berdasarkan penurunan nilai penyerapan berbanding kawalan (blank), dan hasil purata dari replikasi R1 dan R2 ditunjukkan dalam Rajah 2.



RAJAH 2. Peratusan penyerapan siderofor yang dihasilkan oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII dari hari-1 hingga hari-7

Daripada hari ke-1 hingga hari ke-7, nilai penyerapan meningkat secara progresif daripada 24.9% sehingga mencapai 54.3%. Arah aliran peningkatan ini menunjukkan bahawa *Brevibacterium* sp. pencilan NII mula menghasilkan siderofor pada peringkat awal pengeraman (hari pertama) dan mencapai kadar maksimum pada hari ke-7. Corak ini lazim dalam biosintesis metabolit sekunder seperti siderofor, di mana penghasilan meningkat ketika fasa pertumbuhan dan memuncak apabila kepekatan mikroba dan keperluan terhadap besi meningkat. Nilai ini menunjukkan *Brevibacterium* sp. pencilan NII tergolong dalam kumpulan penghasil siderofor yang aktif. Keputusan ini adalah sejajar dengan kajian literatur seperti ditunjukkan pada Jadual 2.

Walaupun bagaimanapun, perbandingan penghasilan siderofor antara spesies perlu ditafsir dengan berhati-hati kerana variasi nilai sangat dipengaruhi oleh beberapa

faktor. Antaranya ialah (i) perbezaan spesis dan regulasi genetik biosintesis siderofor (Song et al. 2024), (ii) kumpulan siderofor yang dihasilkan serta afiniti pengkelatan Fe^{3+} (Hider & Kong 2010), (iii) keadaan kultur seperti komposisi medium (sumber karbon/nitrogen), tahap kekurangan besi, pH, suhu, aerasi/agitasi, serta tempoh pengeraman dan fasa pertumbuhan (Sarvepalli et al. 2023), dan (iv) perbezaan kaedah kuantifikasi (contohnya format CAS cecair berbanding mikrotiter), isipadu sampel serta pendekatan pengiraan % siderofor (Arora & Verma 2017). Oleh itu, variasi yang ditunjukkan dalam Jadual 2 lebih mencerminkan perbezaan organisma dan keadaan eksperimen, dan nilai 24.9%–54.3% yang dicapai oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII masih menunjukkan keupayaannya sebagai penghasil siderofor yang aktif dalam keadaan asas kajian ini.

JADUAL 2. Perbandingan kuantitatif penghasilan siderofor antara kajian ini dan literatur

Organisma	Julat Penghasilan Siderofor (%)	Kaedah	Jenis Medium	Hari	Kumpulan Siderofor	Rujukan
<i>Brevibacterium</i> sp. pencilan NII	24.92 – 54.30	CAS Cecair	Kaldu Nutrien	7	Hidroksamat	Kajian ini
<i>Pseudomonas monteilii</i>	80.36	CAS Cecair	Kaldu Suksinat	3	-	Srivastava et al. (2022)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	49 – 73	CAS Cecair	Grimm-Allen	15	Hidroksamat	Chowdappa et al. (2020)
PGPR rizosfera	23 – 69	Mikrotiter	Kaldu Luria	2	Pelbagai	Arora & Verma (2017)
<i>Escherichia coli</i>	10 – 75	CAS Cecair	Suksinat	1.25	Hidroksamat	Jenifer et al. (2015)

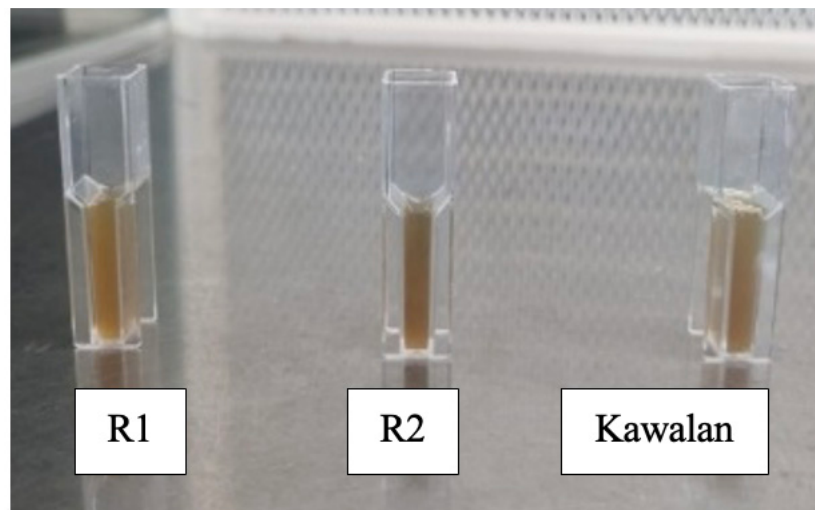
PENGELASAN SIDEROFOR

Secara umum, siderofor bakteria boleh dikelaskan kepada empat kelas utama berdasarkan kumpulan pengkelat Fe^{3+} , iaitu katekolat bersama fenolat, hidroksamat, karboksilat dan siderofor campuran (Timofeeva et al. 2022). Dalam kajian ini, pengelasan dibuat pada peringkat saringan menggunakan ujian kolorimetrik yang lazim. Disebabkan kumpulan fenolat lazimnya dikategorikan sebagai subkelas katekolat, oleh itu, hanya tiga kumpulan utama dianalisis melalui ujian FeCl_3 (indikator hidroksamat), ujian Arnow (indikator katekolat), dan ujian keasidan (indikator karboksilat). Kategori campuran (*mixed-type*) lazimnya disimpulkan apabila lebih daripada satu kumpulan pengkelat dikesan serentak (contohnya lebih daripada satu ujian menunjukkan keputusan positif) atau melalui analisis struktur lanjut seperti LC–MS/NMR (Timofeeva et al. 2022).

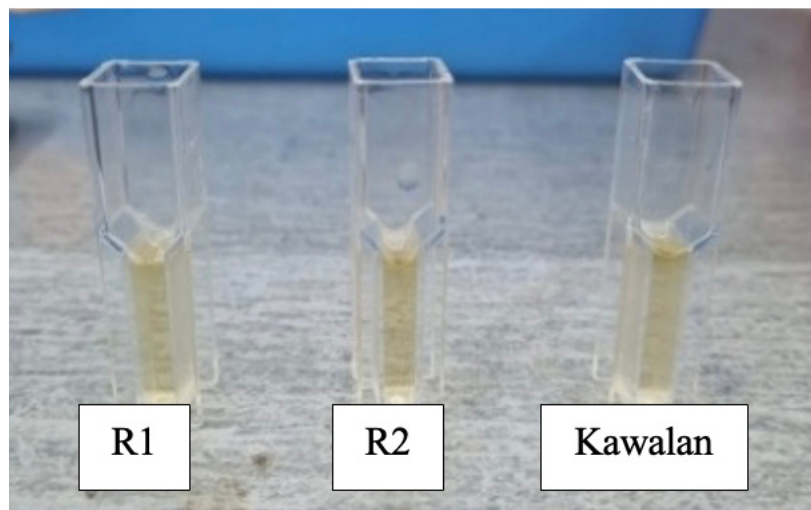
Rajah 3 hingga 5 menunjukkan hasil pemerhatian bagi pengelasan siderofor dan diringkaskan seperti dalam Jadual

3. Memandangkan keputusan kajian ini hanya menunjukkan petunjuk positif bagi hidroksamat (FeCl_3) manakala ujian Arnow dan keasidan tidak menyokong kumpulan lain, siderofor yang dihasilkan diklasifikasikan sebagai daripada kumpulan hidroksamat. Oleh itu, kategori campuran tidak ditunjukkan oleh data saringan ini.

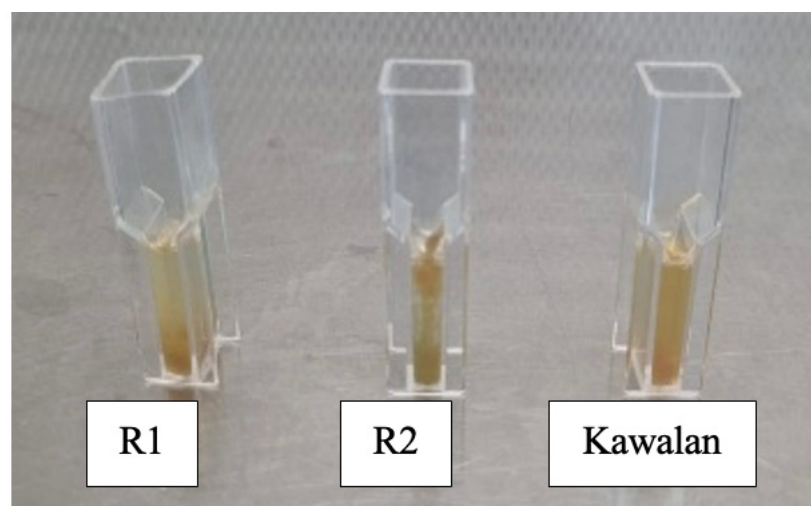
Dalam ujian FeCl_3 , seperti yang dilihat di Rajah 3, sampel R1 dan R2 menunjukkan perubahan warna yang jelas kepada jingga serta nilai penyerapan yang tinggi (43.7 – 45.5%), yang menandakan kehadiran kumpulan hidroksamat. Kawalan tanpa Fe hanya menunjukkan perubahan warna jingga yang samar dengan nilai penyerapan yang rendah (3.8%), mengesahkan bahawa tindak balas hanya berlaku apabila ion Fe^{3+} hadir dan membentuk kompleks stabil dengan hidroksamat. Warna jingga ini terbentuk hasil daripada kompleks antara kumpulan asid hidroksamik dalam struktur hidroksamat dengan ion Fe^{3+} , yang menyerap pada julat gelombang 420–450 nm (Schwyn & Neilands, 1987).



RAJAH 3. Hasil ujian FeCl_3 (Siderofor hidroksamat)



RAJAH 4. Hasil ujian Arnow (Siderofor katekolat)



RAJAH 5. Hasil ujian keasidan (Siderofor karboksilat)

JADUAL 3. Ringkasan keputusan bagi ujian FeCl_3 , Arnow dan keasidan

Sampel	Ujian FeCl_3		Ujian Arnow	Ujian keasidan
	Kawalan tanpa Fe	Tiada pembentukan warna jingga (Peratus penyerapan: 3.81%)	Tiada pembentukan warna merah	Tiada pembentukan mendakan
R1		Perubahan warna kepada jingga (Peratus penyerapan: 45.45%)	Tiada pembentukan warna merah	Terdapat pembentukan mendakan
R2		Perubahan warna kepada jingga (Peratus penyerapan: 43.65%)	Tiada pembentukan warna merah	Terdapat pembentukan mendakan
Rumusan		<i>Brevibacterium</i> sp. pencilan NII menghasilkan siderofor kumpulan hidroksamat	<i>Brevibacterium</i> sp. pencilan NII tidak menghasilkan siderofor kumpulan katekolat	<i>Brevibacterium</i> sp. pencilan NII tidak menghasilkan siderofor kumpulan karboksilat

Dalam ujian Arnow pula, tiada pembentukan warna merah diperhatikan selepas penambahan reagen nitrit-molibdat (Rajah 4), menunjukkan ketiadaan kumpulan katekolat dalam supernatan (Arnow 1937). Ujian keasidan (Rajah 5) menggunakan larutan HCl 0.1 M pula menunjukkan pembentukan mendakan yang ketara dalam sampel R1 dan R2, yang menandakan ketidakstabilan pada pH rendah. Siderofor kumpulan hidroksamat diketahui stabil dalam julat pH yang lebih luas (pH 4–10) berbanding karboksilat yang kekal larut dalam pH berasid (Ferreira et al., 2019). Oleh itu, keputusan ini mengesahkan bahawa siderofor yang dihasilkan oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII adalah daripada kumpulan hidroksamat.

Perbandingan dengan kajian literatur menyokong penemuan ini. Amsaveni et al. (2016) melaporkan bahawa *Aeromonas hydrophila* menghasilkan siderofor kumpulan hidroksamat berdasarkan keputusan positif ujian FeCl_3 dan tindak balas tetrazolium, hasil daripada sistem sintase bukan ribosomal (NRPS).

Chowdappa et al. (2020) pula mengesahkan kehadiran hidroksamat dalam *Penicillium chrysogenum* berdasarkan pembentukan warna positif dalam ujian FeCl_3 , Csaky dan tetrazolium, yang menunjukkan kehadiran kumpulan N–OH dan struktur khas siderofor kumpulan ini. Sujatha dan Ammani (2013) turut melaporkan bahawa majoriti *Pseudomonas fluorescens* terpenkil menghasilkan siderofor kumpulan hidroksamat sebagai penyesuaian kepada kekurangan zat besi di persekitaran rizosfera.

Maheshwari et al. (2019) mendapati bahawa bakteria Gram-positif seperti *Streptomyces* juga cenderung menghasilkan hidroksamat. Kajian oleh Fuadi et al. (2022) menunjukkan corak yang serupa pada *Providencia* spp. yang menghasilkan warna jingga pada medium CAS, tetapi tidak menunjukkan tindak balas dalam ujian Arnow. Oleh kerana kurangnya kajian lepas yang mengkaji penghasilan siderofor oleh spesies *Brevibacterium*, oleh itu perbandingan terus sukar dilakukan. Jadual 4 menunjukkan perbandingan hasil pengelasan siderofor kajian ini dan kajian lepas.

JADUAL 4. Perbandingan pengelasan siderofor. (Tanda diwakili oleh (+): hadir; (–): tiada, (±): tidak konsisten)

Organisma	Gram	Katekolat	Hidroksamat	Karboksilat	Rujukan
<i>Brevibacterium</i> sp. pencilan NII	Positif	-	+	-	Kajian ini
<i>Providencia</i> sp.	Negatif	-	+	-	Fuadi et al. (2022)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Tiada	-	+	-	Chowdappa et al. (2020)
<i>Cicer arietinum</i> / <i>Pisum sativum</i>	Positif/negatif	±	+	-	Maheshwari et al. (2019)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Negatif	-	+	-	Amsaveni et al. (2016)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Negatif	±	+	-	Sujatha & Ammani (2013)

PENCIRIAN KUMPULAN BERFUNGSI

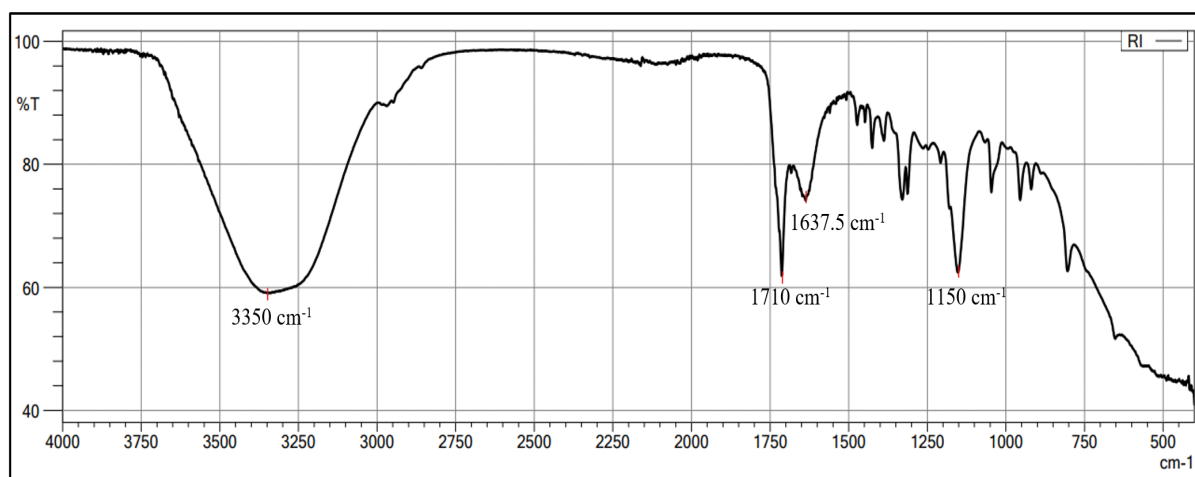
Spektrum FTIR bagi ekstrak siderofor daripada *Brevibacterium* sp. pencilan NII menunjukkan beberapa jalur serapan utama yang menandakan kehadiran kumpulan fungsi hidroksamat, seperti ditunjukkan dalam Rajah 6. Jalur serapan lebar sekitar $3,350\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan

kehadiran kumpulan O–H atau N–H, yang sering terdapat dalam struktur asid hidroksamik dan menunjukkan ikatan hidrogen. Ini disokong oleh kajian Brick et al. (2025) yang melaporkan puncak serupa sekitar $3,420\text{ cm}^{-1}$.

Puncak tajam pada $1,710\text{ cm}^{-1}$ dikaitkan dengan regangan C=O daripada kumpulan amida atau hidroksamat, manakala puncak $1,637.5\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan kehadiran

regangan C–N atau N–O. Serapan sederhana pada $1,150\text{ cm}^{-1}$ pula mungkin mewakili ikatan C–O atau N–O, yang juga biasa ditemui dalam struktur hidroksamat (Patel et al. 2009). Secara keseluruhan, hasil ini mengesahkan

kehadiran kumpulan fungsi hidroksamat dalam sampel yang dikaji dan menyokong keputusan ujian biokimia FeCl_3 sebelum ini.



Rajah 6: Spektrum FTIR bagi supernatan menunjukkan jalur serapan utama pada 3350 cm^{-1} (regangan O–H/N–H), 1710 cm^{-1} (regangan C=O), 1637.5 cm^{-1} (regangan C–N/N–O), dan 1150 cm^{-1} (regangan C–O/N–O)

POTENSI SIDEROFOR HIDROKSAMAT

Brevibacterium sp. PENCILAN NII

Kajian lepas menunjukkan keberjayaan penggunaan siderofor dalam pelbagai bidang. Secara umum, potensi aplikasi siderofor banyak dipengaruhi oleh kumpulan penderma yang menentukan kekuatan ikatan Fe^{3+} , kestabilan kompleks dan kesesuaian dalam persekitaran tertentu. Siderofor kumpulan katekolat lazimnya mempunyai afiniti Fe^{3+} yang sangat tinggi (contohnya *enterobactin*), justeru sesuai untuk situasi perebutan besi yang ekstrem serta sering menjadi asas kepada strategi perubatan seperti “Trojan-horse” penghantaran antibiotik melalui sistem pengangkutan besi bakteria (Liu et al. 2023).

Sebaliknya, siderofor kumpulan hidroksamat membentuk kompleks Fe^{3+} yang stabil dan meluas dihasilkan oleh pelbagai bakteria. Sifat ini menjadikannya praktikal untuk aplikasi seperti peningkatan ketersediaan Fe kepada tumbuhan dan biokawalan (melalui persaingan besi dengan patogen), serta turut relevan dalam aplikasi alam sekitar seperti penjerapan logam tertentu (Timofeeva et al. 2022).

Siderofor kumpulan karboksilat pula umumnya lebih hidrofilik dan dalam beberapa keadaan menunjukkan tingkah laku pengkelatan yang lebih ketara pada pH berasid, dan sering dilaporkan mempunyai afiniti Fe yang lebih rendah berbanding hidroksamat/katekolat. Oleh itu, kumpulan ini biasanya dikaitkan dengan mikroorganisma atau persekitaran berasid dan boleh relevan untuk konteks tanah berasid (Chand et al. 2025). Oleh kerana siderofor

Brevibacterium sp. pencilan NII dikenal pasti sebagai kumpulan hidroksamat, perbincangan aplikasi seterusnya memfokuskan kepada kekuatan kumpulan ini dalam pertanian, alam sekitar dan kesihatan.

Bagi siderofor hidroksamat, sifatnya yang mampu membentuk kompleks stabil dengan ion Fe^{3+} (dan dalam sesetengah keadaan dengan logam lain) membolehkan ia berpotensi untuk digunakan sebagai pembawa molekul bioaktif/terapeutik dan untuk penghantaran ke sasaran tertentu melalui mekanisme pengangkutan berkaitan besi, termasuk dalam konteks rawatan kanser (Al Shaer et al. 2020).

Dalam bidang pertanian, siderofor hidroksamat berperanan dalam meningkatkan ketersediaan zat besi kepada tumbuhan, terutamanya dalam keadaan kekurangan zat besi. Brick et al. (2025) melaporkan bahawa siderofor yang dihasilkan oleh *Synechococcus mundulus* dapat meningkatkan pengambilan zat besi dan pertumbuhan anak benih jagung dalam persekitaran kekurangan zat besi. Ia menunjukkan potensi siderofor sebagai alternatif mesra alam kepada pengkelat sintetik dalam pertanian.

Dalam konteks kajian ini, penggunaan siderofor hidroksamat *Brevibacterium* sp. pencilan NII dalam proses bioremediasi tanah dan air ingin diterokai dengan lebih lanjut. Kajian oleh Majewska et al. (2024) menunjukkan bahawa bakteria penghasil siderofor yang diasingkan dari tanah di Spitsbergen, Norway mampu mengikat logam berat seperti Cd^{2+} , Co^{2+} , dan Zn^{2+} , menjadikannya berpotensi untuk digunakan dalam pemulihan tanah yang tercemar. Bukti keupayaan ini dan sifat *Brevibacterium* sp.

pencilan NII sendiri sebagai penghasil siderofor hidroksamat, menunjukkan potensi awal bakteria ini dalam pemulihan tanah yang tercemar dengan logam berat.

KESIMPULAN

Kajian ini difokuskan kepada keupayaan bakteria *Brevibacterium* sp. pencilan NII dalam menghasilkan siderofor, iaitu sejenis molekul pengkelat Fe serta kumpulan siderofor yang dirembes. Analisis kualitatif yang dilakukan pada agar CAS telah mengesahkan aktiviti penghasilan siderofor oleh *Brevibacterium* sp. pencilan NII. Dalam analisis kuantitatif pula, pendedahan *Brevibacterium* sp. pencilan NII dalam nutrien kaldu dengan penambahan kepekatan Fe sebanyak 0.01 mM memberikan penghasilan siderofor sebanyak 24.92-54.30% sepanjang tempoh tujuh hari pendedahan. Kajian ini juga telah berjaya membuktikan bahawa bakteria *Brevibacterium* sp. pencilan NII menghasilkan siderofor hidroksamat berdasarkan penilaian menyeluruh yang dilakukan. Hasil kajian ini boleh digunakan bagi tujuan kajian-kajian akan datang memandangkan aplikasi siderofor daripada bakteria spesies *Brevibacterium* masih lagi terhad. Aplikasi siderofor *Brevibacterium* sp. pencilan NII dalam strategi bioremediasi bagi mengekstrak logam berat seperti kadmium dan plumbum daripada tanah tercemar boleh dimanfaatkan dalam penerokaan pada masa hadapan.

PENGHARGAAN

Setinggi-tinggi penghargaan dan terima kasih kepada Kementerian Pendidikan Tinggi (KPT) di bawah Skim Geran Penyelidikan Fundamental (FRGS) dengan kod projek FRGS/1/2024/TK05/UKM/02/10 dan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM) atas sokongan terhadap aktiviti-aktiviti penyelidikan ini

PENGISYTIHARAN KEPENTINGAN BERSAING

Tiada.

RUJUKAN

- Ahmed, E., & Holmström, S. J. 2014. Siderophores in environmental research: Roles and applications. *Microbial Biotechnology* 7(3): 196-208. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117?urlappend=%3Futm_source%3Dresearchgate.net%26utm_medium%3Darticle
- Al Shaer, D., Al Musaimi, O., de la Torre, B.G., & Albericio, F. 2020. Hydroxamate siderophores: Natural occurrence, chemical synthesis, iron binding affinity and use as Trojan horses against pathogens. *European Journal of Medicinal Chemistry* 208: 112791. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112791>
- Amsaveni, R., Sureshkumar, M., Mary, J.R., Indra, U., & Vivekanandhan, G. 2015. Screening of multi-drug and metal resistant *Aeromonas* species from diverse sources. *American Journal of Infectious Diseases* 11(2): 41. <https://doi.org/10.3844/ajidsp.2015.41.47>
- Arnou, L. E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *Journal of Biological Chemistry* 118(2): 531-537. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)74509-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)74509-2)
- Arora, N. K., & Verma, M. 2017. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotech* 7(6): 381. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1008-y>
- Bagmare, R. R., Ismail, S., Ingole, A. J., & Bagmare, P. A. 2019. Siderophore production by plant growth promoting microorganisms. *J Pharmacogn Phytochem* 8: 1450-1452. 8-4-184-162.pdf
- Brick, M. B., Hussein, M. H., Mowafy, A. M., Hamouda, R. A., Ayyad, A. M., & Refaay, D. A. 2025. Significance of siderophore-producing cyanobacteria on enhancing iron uptake potentiality of maize plants grown under iron-deficiency. *Microbial Cell Factories* 24(1): 3. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02618-4>
- Chand, U., Hegde, G., & Mesta, R. 2025. The potential of siderophores in biological control in plant diseases. *Asia Pacific Biofertilizers and Biopesticides Information Platform* 1(1): 1-25. <https://doi.org/10.56669/HGRS2291>
- Chowdappa, S., Jagannath, S., Konappa, N., Udayashankar, A. C., & Jogaiah, S. 2020. Detection and characterization of antibacterial siderophores secreted by endophytic fungi from *Cymbidium aloifolium*. *Biomolecules* 10(10): 1412. <https://doi.org/10.3390/biom10101412>
- Ferreira, C.M., López-Rayó, S., Lucena, J.J., Soares, E. V., & Soares, H.M. 2019. Evaluation of the efficacy of two new biotechnological-based freeze-dried fertilizers for sustainable Fe deficiency correction of soybean plants grown in calcareous soils. *Frontiers in Plant Science* 10: 1335. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01335>
- Fuadi, H. 2022. Isolation and selection of siderophore-producing bacteria from roots of Simadu pineapple (*Ananas comosus*) in Subang District, West Java. *Menara Perkebunan* 90(2): 160-167. <https://doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v90i2.502>
- Hider, R.C., & Kong, X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* 27(5): 637-657. <https://doi.org/10.1039/B906679A>
- Ismail, N.I., Abdullah, S.R.S., Idris, M., Hasan, H.A., Halmi, M.I.E., AL Sbani, N.H., Jehawi, O.H. 2019. Simultaneous bioaccumulation and translocation of iron and aluminium from mining wastewater

- by *Scirpus grossus*. *Desalination and Water Treatment* 163: 133-142. <https://doi.org/10.5004/dwt.2019.24201>
- Jamali, A.R., Batool, M., Asghar, S.A., Akhter, F., Hussain, F. & Khurshid, S. 2022. Synthesis of green metaloxide nanoparticles using aloe-barbadensis leaf extract (acid red 28) for dye removal applications. *Jurnal Kejuruteraan* 34(5): 801-805. [https://doi.org/10.17576/jkukm-2022-34\(5\)-05](https://doi.org/10.17576/jkukm-2022-34(5)-05)
- Jenifer, C. A., Sharmili, A. S., Anbumalarmathi, J., Umamaheswari, K., & Shyamala, K. 2015. Studies on siderophore production by microbial isolates obtained from aquatic environment. 5(10): 41-45.
- Liu, Z., Huang, T., Shi, Q., Deng, Z., & Lin, S. 2023. Catechol siderophores framed on 2, 3-dihydroxybenzoyl-L-serine from *Streptomyces varsoviensis*. *Frontiers in Microbiology* 14: 1182449. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1182449>
- Maheshwari, R., Bhutani, N., & Suneja, P. 2019. Screening and characterization of siderophore producing endophytic bacteria from *Cicer arietinum* and *Pisum sativum* plants. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 7(5): 7-14. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70502>
- Majewska, M., Słomka, A., & Hanaka, A. 2024. Siderophore-producing bacteria from Spitsbergen soils—novel agents assisted in bioremediation of the metal-polluted soils. *Environmental Science and Pollution Research* 31(22): 32371-32381. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33356-0>
- Noordman, W.H., Reissbrodt, R., Bongers, R.S., Rademaker, J.L., Bockelmann, W., & Smit, G. 2006. Growth stimulation of *Brevibacterium* sp. by siderophores. *Journal of Applied Microbiology* 101(3):637-46. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02928.x>
- Patel, A. K., Deshattiwar, M. K., Chaudhari, B. L., & Chincholkar, S. B. 2009. Production, purification and chemical characterization of the catecholate siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus* spp. *Bioresource Technology* 100(1): 368-373. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.008>
- Płociniczak, T., Sinkkonen, A., Romantschuk, M., Sułowicz, S., & Piotrowska-Seget, Z. 2016. Rhizospheric bacterial strain *Brevibacterium casei* MH8a colonizes plant tissues and enhances Cd, Zn, Cu phytoextraction by white mustard. *Frontiers in plant science* 7: 101. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00101>
- Sarvepalli, M., Velidandi, A., & Korrapati, N. 2023. Optimization of siderophore production in three marine bacterial isolates along with their heavy-metal chelation and seed germination potential determination. *Microorganisms* 11(12): 2873. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122873>
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 160(1): 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Song, Y., Wu, X., Li, Z., Ma, Q.Q., & Bao, R. 2024. Molecular mechanism of siderophore regulation by the *Pseudomonas aeruginosa* BfmRS two-component system in response to osmotic stress. *Communications Biology* 7(1): 295. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-05995-z>
- Srimathi, K., & Suji, H.A. 2018. Siderophores detection by using blue agar CAS assay methods. *Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences Vol 5: 6*. <https://doi.org/10.26438/ijrsbs/v5i6.180185>
- Srivastava, P., Sahgal, M., Sharma, K., Enshasy, H. A. E., Gafur, A., Alfarraj, S., ... & Sayyed, R. Z. 2022. Optimization and identification of siderophores produced by *Pseudomonas monteilii* strain MN759447 and its antagonism toward fungi associated with mortality in *Dalbergia sissoo* plantation forests. *Frontiers in Plant Science* 13: 984522. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.984522>
- Sujatha, N., & Ammani, K. 2013. Siderophore production by the isolates of fluorescent *Pseudomonads*. *International Journal of Current Research and Review* 5(20): 1. International Journal of Current Research and Review
- Tamilselvi, S.M., Thiyagarajan, C., & Uthandi, S. 2016. Calcite dissolution by *Brevibacterium* sp. SOTI06: A futuristic approach for the reclamation of calcareous sodic soils. *Frontiers on Plant Science* 7: 1-10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01828>
- Timofeeva, A.M., Galyamova, M.R., & Sedykh, S.E. 2022. Bacterial siderophores: classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. *Plants* 11(22): 3065. <https://doi.org/10.3390/plants11223065>
- Xu, Y.-C., Li, N., Yan, X., & Zou, H.-X. 2023. DFT-based analysis of siderophore-metal ion interaction for efficient heavy metal remediation. *Environmental Science and Pollution Research* 30: 91780–91793. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-28854-6>