



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة البصرة - كلية العلوم  
قسم علم البيئة

التخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية من بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa starin mus09* لمعالجة صبغة Congo Red في مياه  
الصرف الصحي

رسالة مقدمة الى  
مجلس كلية العلوم - جامعة البصرة  
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير  
في علم البيئة (التقانات بيئية)

تقدمت بها

**رواء رحيم يالي**

بكالوريوس علم البيئة

كلية العلوم جامعة البصرة 2017/2018

ياشرف

**أ.د. اسيا فاضل عبد الله**      **أ.د. وجدان حسين عبد الصاحب**

شوال 1443 هـ

حزيران 2022م

## الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية عزل خمس عزلات بكتيرية من التربة الملوثة بالنفط الخام ومياه الصرف الصحي. تم تشخيص العزلات بالاختبارات الكيموحيوية باستخدام نظام vitek 2 وغربلت لإنتاج جسيمات الفضة النانوية AgNPs إذ قدرت قابليتها على الانتاج من خلال تغير لون الراشح و اجراء التحليل الطيفي المرئي للأشعة فوق البنفسجية UV-visible spectrophotometer اخضعت العزلة الافضل في الانتاج للتشخيص الجيني من خلال تضخيم الجين 16rDNA واستخدمت هذه العزلة في انتاج جسيمات الفضة النانوية AgNPs و تم اجراء تحليل طيف الاشعة تحت الحمراء Fourier Transform Infrared والفحص بالمجهر الإلكتروني الماسح scanning transmission electron microscope للجسيمات النانوية المنتجة منها , وتم تحسين انتاج الجسيمات النانوية باستخدام بعض العوامل مثل درجة الحرارة والاس الهيدروجيني وتركيز الملح ونوع الوسط الزراعي , واختبرت هذه الدراسة ولأول مرة في العراق قابلية البكتريا وجسيمات الفضة النانوية AgNPs المنتجة منها على تكسير صبغة Congo Red بالتراكيز (0.01,0.1,0.25,0.5) ملي مولاري و قدرت كفاءة التفسير بقياس الامتصاصية الضوئية عند الطول الموجي (500) , كما طبقت المعالجة الحيوية لمياه الصرف الصحي بعد اضافة الصبغة لها في المفاعلات الحيوية , و قدرت جودة المياه من خلال قياس الامتصاصية الضوئية للصبغة وحساب اعداد البكتريا وقياس درجة الحرارة والاس الهيدروجيني والمتطلب الحيوي للأوكسجين والمواد الصلبة العالقة المواد الصلبة الذائبة الكلية .

وأظهرت نتائج تشخيص البكتريا بنظام vitek 2 تشخيص خمس عزلات بكتيرية كانت ثلاث منها تحت النوع *Pseudomonas aeruginosa* والآخرى كانت تحت النوع *Pseudomonas stutziri* و *Acinetobacter bumanni*. كما اظهرت نتائج غربلة العزلات B3,B2,B1 التابعة للنوع *Pseudomonas aeruginosa* لإنتاج جسيمات الفضة النانوية AgNPs قدرتها على الانتاج إذ تغيير لون الراشح البكتيري لجميع العزلات من الأخضر والاصفر إلى البني الغامق والباهت وكانت العزلة B1 هي الأفضل في الانتاج إذ بلغت إنتاجيتها 0.005غم/100 مل و ذروة الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية 420 نانومتر مقارنة بالعزلات الأخرى B4, B5 التي سجلت إنتاجية بمقدار 0.0024 و 0.003 غم/100 مل عند ذروة الامتصاص 410 و 365 نانومتر على التوالي . و أظهرت نتائج التشخيص الجيني للعزلة الافضل انتاجية B1 أن العزلة كانت ايضا تحت النوع *Pseudomonas aeruginosa* إذ اظهرت تطابقا بنسبة 99% مع العزلة المسجلة في بنك الجينات *Pseudomonas aeruginosa* strain MUS09 و اظهر تحليل طيف

الاشعة تحت الحمراء لراشح هذه العزلة وجود العديد من المجاميع الفعالة التي ساهمت في اختزال ايونات الفضة الى الجسيمات النانوية منها مجاميع OH و C-N الدالة على وجود البروتينات والتي ساهمت في استقرارها كما اظهر التصوير بالمجهر الالكتروني الماسح ان الجسيمات النانوية كانت كروية وتراوح حجمها بين (46.91-48.69) نانومتر.

أظهرت نتائج تحسين انتاج AgNPs بواسطة العزلة *Pseudomonas aeruginosa* strain MUS09 ان الوسط الزراعي Nutrient broth و تركيز ملح نترات الفضة 3 ملي مولاري ودرجة حرارة 34 م° والاس الهيدروجيني 9 هي الافضل في الانتاج اذ سجلت اوزان بلغت 0.05,0.072,0.083,0.07 غرام على التوالي .

اظهرت نتائج التفسير الحيوي لصبغة كونغوريد باستخدام البكتيريا كفاءة عالية في التفسير عند التركيز 0.01 ملي مولاري اذ انخفضت قيم الامتصاصية الضوئية من 1.526 الى 0.115 نانومتر مقارنة مع عينة السيطرة من 1.585 الى 1.061 نانومتر وبلغت النسبة المئوية لأزاله اللون 92% مقارنة مع التراكيز الاخرى وعينة السيطرة التي اظهرت نسب قليلة في التفسير حيث بلغت 5% و 1% و 11% عند التركيز 0.5 و 0.25 و 0.1 ملي مولاري على التوالي . في حين سجلت AgNPs انخفاضاً كبيراً في القيم الامتصاصية الضوئية اذ سجل اقل انخفاض لها من 5.766 الى 0.912 عند التركيز 0.5 ملي مولاري مقارنة مع عينة السيطرة وسجلت نسب عالية في ازالة اللون للصبغة بلغت 96% و 91% و 89% و 82% عند التراكيز 0.01 و 0.1 و 0.25 و 0.5 ملي مولاري على التوالي مقارنة مع عينة السيطرة التي سجلت اعلى نسبة لإزالة اللون 52% عند التركيز 0.25 ملي مولاري . كما أظهرت نتائج تطبيق المعالجة الحيوية في المفاعلات الحيوية تحسين في جودة المياه اذ سجلت انخفاضاً في قيم الامتصاصية الضوئية في المفاعل الحيوي لل AgNPs من 0.311 إلى 0.164 نانومتر مع نسبة إزالة اللون 53% مقارنة بالمفاعلات الحيوية الأخرى خلال 14 يوماً من الحضان . اما العدد الكلي للبكتيريا فقد انخفضت معنوياً  $p \leq p0.05$  من  $499 \times 10^7$  الى  $3 \times 10^3$  في مفاعل الجسيمات النانوية في حين ارتفعت الاعداد من  $3029 \times 10^7$  الى  $5445 \times 10^8$  في مفاعل البكتيريا وفي مفاعل السيطرة من  $478 \times 10^7$  الى  $634 \times 10^8$  . اما درجة الحرارة والاس الهيدروجيني فقد ارتفعت معنوياً  $p \leq p0.05$  في مفاعل الجسيمات النانوية من 31.9 الى 35.2 م° و الاس الهيدروجيني من 8.3 الى 8.7 خلال 14 يوماً من الحضان مقارنة مع مفاعل البكتيريا و مفاعل السيطرة . وانخفضت قيم المتطلب الحيوي للأوكسجين معنوياً  $p \leq p0.05$  في مفاعل الجسيمات النانوية من 22.5 ملغم /لتر الى 17 ملغم /لتر في حين ارتفع الى 51 و 29 ملغم / لتر في مفاعل البكتيريا ومفاعل السيطرة على

التوالي .اما المواد الصلبة العالقة الكلية فقد انخفضت معنويا  $p \leq p0.05$  في مفاعل الجسيمات النانوية من 97 ملغم /لتر الى 41 ملغم / لتر في حين ارتفعت في مفاعل البكتيريا ومفاعل السيطرة الى 125 و 118 ملغم / لتر على التوالي , اما المواد الصلبة الذائبة الكلية ارتفعت معنويا  $p \leq p0.05$  في مفاعل الجسيمات النانوية من 2419 ملغم /لتر الى 2852 ملغم / لتر وانخفضت في مفاعل البكتيريا والسيطرة الى 1973 و 2298 ملغم / لتر على التوالي .

### Summary

The current study included isolated five bacterial isolates from soils contaminated with crude oil and sewage water. The isolates were diagnosed by biochemical tests using vitek 2 system and screened to produce silver nanoparticles AgNPs, which estimated by changing the color of the free cell supernatant and performing UV-visible spectrophotometer. the FT-IR spectroscopy and SEM examination were performed for AgNPs produced by the isolate that showed the best productivity,. The production of nanoparticles was improved by using some factors such as temperature, pH, salt concentration and the type of culture medium, This study tested, for the first time in Iraq, the ability of bacteria and silver AgNPs nanoparticles produced from them to break down the Congo Red dye at concentrations (0.01,0.1,0.25,0.5)mM, the degradation efficiency was estimated by measuring the optical absorbance at the wavelength (500nm) the biological treatment by bacteria and nanoparticales of wastewater was also applied after adding the dye to bioreactors , the water quality was estimated by measurement of optical density of dye ,Total Count of bacteria, measuring the temperature, pH, the biological requirement for oxygen, suspended solids, and total dissolved solids.

The results of diagnosing bacteria using vitek 2 system showed the identification of five bacterial isolates, three of which were under the Species of *Pseudomonas aeruginosa* and the other was under the type *Pseudomonas stutziri* and *Acinetobacter bumanni*. the results of screening isolates under the species of *Pseudomonas aeruginosa* for production AgNPs showed change the color of free cell supernatant of all isolates were change from green and yellow to dark and light brown, isolate B1 was the best in production, with a productivity of 0.005g/100ml and an

## Summary

---

absorption peak of 420nm compared with other isolates B4 and B5, which recorded a productivity of 0.0024 and 0.003g/100ml at the absorption peaks 410nm and 365nm respectively. The results of genetic diagnosis of the best-productive isolate B1 showed that the isolate was also under the species of *Pseudomonas aeruginosa*, with identity of 99% with the strain *Pseudomonas aeruginosa* MUS09 recorded in the gene bank. the FT-IR spectroscopy of free cell supernatant of *Pseudomonas aeruginosa* MUS09 showed many active groups that contribute of reduction  $\text{Ag}^+$  to AgNPs including OH and C-N groups indicating the presence of proteins, which contributed to AgNPs stability. The scanning electron microscope imaging showed that the nanoparticles were spherical and their size ranged between (46.91-48.69nm). While the results of improving AgNPs production by isolate *Pseudomonas aeruginosa* strain MUS09 showed that Nutrient broth, silver nitrate salt concentration 3 mM, temperature 34 °C and pH 9 were the best for productivity, with weights of 0.05,0.072and 0.083-0.07 g, respectively. The results of the biodegradation of Congo Red dye using bacteria showed high degraded efficiency at a concentration of 0.01mM, as the optical absorbance values decreased from (1.526) to (0.115) compared with the control sample from (1.585) to (1.061), and the percentage of decolorization was 92. % compared with the other concentrations and control sample that showed low percentage of degrade 5%, 1% and 11% at the concentration of 0.5, 0.25 and 0.1 mM, respectively. While AgNPs recorded decrease in the optical absorbance values, as the lowest decrease was recorded from (5.766) to (0.912)nm at concentration (0.5)Mm compared with the control, the high percentage of decolorization were recorded, 96%, 91%, 89% and 82% at concentrations 0.01, 0.1, 0.25 and 0.5 Mm, respectively, compared with the control, which recorded (52%) at concentration ( 0.25)Mm . The results of

## Summary

---

biological treatment in bioreactors showed an improvement in water quality, where recorded decrease for the values of optical density in bioreactor of AgNPs which decrease from (0.311 ) to (0.146) with percentage decolorization ( 53% ) compared with other bioreactors during 14 days of incubation also the total bacterial numbers, decreased from  $499 * 10^6$  to  $3 * 10^6$  in bioreactor of AgNPs, while the numbers increased from  $3029 * 10^7$  to  $5445 * 10^7$  in bioreactor of bacteria and from  $478 * 10^7$  to  $634 * 10^7$  in bioreactor of control. The temperature and pH were significantly increased in the bioreactor of AgNPs from 31.9 to 35.2 C , the pH from 8.3 to 8.7 during compared with bioreactor of bacteria and bioreactor of control. The BOD decrease in bioreactor of AgNPs from 22.5 to 17 mg/L, while increased in bioreactor of bacteria to 51 mg/L and 29 mg/L in bioreactor of control respectively. As for the total suspended solids, it significantly decreased  $\leq P 0.05$  in bioreactor of AgNPs from 97 mg/L to 41 mg/L, while increased in bioreactor of bacteria and bioreactor of control to 125 and 118 mg/L, respectively, whereas the total soluble solids increased significantly  $p \leq 0.05$  In bioreactor of AgNPs from 2419 mg/L to 2852 mg/L and decreased in bioreactor of bacteria and bioreactor of control to 1973 and 2298 mg/L, respectively.

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of Basrah

College of Science- Department of Ecology



**Biosynthesis of silver nanoparticles from *Pseudomonas aeruginosa* strain mus09 for the treatment of Congo red dye in wastewater**

**A Thesis**

**Submitted to the Council of the College of Science -University of Basrah**

**in partial fulfillment of the requirements for the Degree of**

**Master of Science in Ecology**

**(Eco Technologies)**

**By**

**Rawaa Rahim Yali**

**B.Sc. in Ecology 2018**

**Supervised by**

**Prof. Dr. Asia Fadhile Al-Mansoori**

**Asst. Dr. Wijdan Hussein Abdul-sahib**

**June 2022**

**Shawwal 1443**