INDUCTION OF AZOREDUCTASE FROM *Aeromonas hydrophila* FOR BIOLOGICAL TREATMENT OF DYES IN WASTEWATER

By

HEBA HAMED BAYOMY MAGHRAWY

B.Sc. Agric. Sci., (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 2004

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

MASTER OF SCIENCE

In

Agricultural Sciences

(Agric. Microbiology)

Department of Agricultural Microbiology
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2011

SUPERVISION SHEET

INDUCTION OF AZOREDUCTASE FROM *Aeromonas hydrophila* FOR BIOLOGICAL TREATMENT OF DYES IN WASTEWATER

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Agricultural Microbiology)

By

HEBA HAMED BAYOMY MAGHRAWY
B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2004

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. SAMIR ABD EL WAHED EL GIZAWY
Emeritus Professor of Agricultural Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. REFAE IBRAHIM REFAE
Professor of Agricultural Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. HUSSEIN ABD EL KAREEM AHMED
Researcher Professor of Microbiology, NC for Radiation Research and Technology

APPROVAL SHEET

INDUCTION OF AZOREDUCTASE FROM *Aeromonas hydrophila* FOR BIOLOGICAL TREATMENT OF DYES IN WASTEWATER

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Agricultural Microbiology)

By

HEBA HAMED BAYOMY MAGHRAWY
B.Sc. Agric. Sci. (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., 2004

Approval Committee

Dr. ALI AHMED IBRAHIM HAMMAD.....
Emeritus Researcher Professor of Microbiology, NC for Radiation Research and Technology

Dr. MOHAMED FAYEZ FOUAD.....
Emeritus Professor of Agric. Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. SAMIR ABD EL WAHED EL GIZAWY.....
Emeritus Professor of Agric. Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. REFAE IBRAHIM REFAE.....
Professor of Agric. Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Date: / / 2011

تحفيز إنزيم الآزوردكتيز من بكتريا إيروموناس هيدروفيلا للمعالجة البيولوجية للصبغات فى مياه الصرف

رسالة مقدمة من

هبه حامد بيومى مغراوى

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (بيوتكنولوجى)- كلية الزراعة- جامعة القاهرة، ٢٠٠٤

للحصول على درجة

الماجستير

فى

العلوم الزراعية
(ميكروبيولوجيا زراعية)

قسم الميكروبيولوجيا الزراعية
كلية الزراعة
جامعة القا هرة
مصر

٢٠١١

تحفيز إنزيم الآزوردكتيز من بكتريا إيروموناس هيدروفيلا للمعالجة البيولوجية للصبغات فى مياه الصرف

رسالة ماجستير
فى العلوم الزراعية
(ميكروبيولوجيا زراعية)

مقدمة من

هبه حامد بيومى مغراوى

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (بيوتكنولوجى)- كلية الزراعة- جامعة القاهرة، ٢٠٠٤

لجنة الحكم

دكتور/ علي أحمد إبراهيم حماد .....
أستاذ باحث الميكروبيولوجيا المتفرغ– المركز القومي لبحوث و تكنولوجيا الا شعاع

دكتور/ محمد فايز فؤاد .....
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية المتفرغ – كلية الزراعة – جامعة القا هرة

دكتور / سمير عبد الواحد الجيزاوى .....
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية المتفرغ – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور / رفاعى إبراهيم رفاعى .....
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

التاريخ: / /٢٠١١م

اسم الطالب: هبه حامد بيومي مغراوى **الدرجة: ماجستير**

عنوان الرسالة: تحفيز إنزيم الآزوردكتيز من بكتيريا إيروموناس هيدروفيلا للمعالجة البيولوجية للصبغات في مياه الصرف

المشرفون: دكتور: سميرعبد الواحد الجيزاوي
دكتور: رفاعي إبراهيم رفاعي
دكتور: حسين عبد الكريم أحمد
قسم: المكيروبيولوجيا الزراعية فرع: تاريخ منحة الدرجة:

المستخلص العربي

الهدف من هذا البحث هو تكسير الصبغات الناتجة من مصانع النسيج بواسطة سلالات بكتيرية معزولة من مصادر محلية. تم عزل اثنين وعشرين عزلة من نوع الإيروموناس من مصادر محلية مختلفة. أظهرت سبع سلالات القدرة علي إزالة لون الصبغة فى بيئة بويون مغذى بعد ٤٨ ساعة تحضين، ولكن اظهرت سلالة واحدة فقط معزولة من سمك البلطي قدرة عالية على ازالة اللون (٩٨%). تم تعريف هذه السلالة مورفولوجياً ،فسيولوجياً و بواسطة 16 s r RNA على إنها إيروموناس هيدروفيلا. وقد وجد أن الظروف المثلى لازالة اللزن هى شحيحة الأكسجين ودرجة حرارة ٣٠°م وأس هيدروجيني ٧و تستطيع هذه السلالة ان تزيل لون صبغة الآزو ذات المجموعة الكبريتيه (كونجو حمراء) من ٥٠ جزء في المليون فما فوق. أيضاً هذه السلالة تستطيع إزالة انواع مختلفة من صبغة الآزو بعد ٤٨ ساعة تحضين.

وجد أن زيادة تركيز مستخلص الخميرة فى البيئة كمصدر للنيتروجين اكبر من ٢% لا يعمل بقوة على نحسين من كفاءة عملية ازالة اللون. اثبتت النتائج أن وجود اى نوع من الكربون بتركيزات مختلفة يعمل على تثبيط عملية ازالة اللون نتيجة لتحول الكربون المستهلك الي أحماض عضوية تخفض من قيمة الأس الهيدروجيني للبيئة، وبالتالي تؤثر علي نمو الخلية وكفاءتها في إزالة اللون.

تستطيع السلالة إزالة اللون عند عدة تركيزات مختلفة من كلوريد الصوديوم (١٠ جم/لتر) فما فوق. تم استخدام UV- Vis, IR, TLC لاثبات أن الإزالة تمت عن طريق التكسير.

وجد أن إنزيم الآزوريدكتيز مستحث، ويفرز خارج الخلية، وهو من نوع فلافوبروتين، ويستخدم NADH كمعطي للإلكترونات اثناء عملية التكسير. ووجد ان المعالجة المثالية للازالة الكاملة لصبغات الازو هى المعاملة تحت الظروف شحيحة الأكسيجين تليها مرحلة معالجة تحت ظروف هوائية وفيزيائية (إشعاع).

أثبتت دراسة السمية على بذور الفول بأنه تم تكسير صبغة الكونغو الحمراء الى مركبات غير سامة بواسطة الأيروموناس هيدروفيلاً.

الكلمات الدالة: إيروموناس هيدروفيلا- الكونجو الحمراء – تكسير الصبغة – الازوردكتيز – اختبار السمية على النبات

Name of Candidate: Heba Hamed Bayomy Maghrawy **Degree:** M.Sc.
Title of Thesis: Induction of Azoreductase from *Aeromonas hydrophila* for Biological Treatment of Dyes in Wastewater
Supervisors: Dr. Samir Abd-El Wahed El Gizawy
Dr. Refae Ibrahim Refae
Dr. Hussein Abdel Kareem Ahmed
Department: Agricultural Microbiology
Approval : / / 2011

ABSTRACT

The aim of this work is to evaluate textile dyes degradation by novel bacterial strains isolated from different local sources. Twenty two isolates of *Aeromonas* species were isolated from different local sources. Among those, seven showed the ability to decolorize Congo red in nutrient broth medium after 48 h incubation. The only one isolate from fish (AF) showed the highest efficiency in decolorization (98%). This isolate was identified as *Aeromonas hydrophila* (AF) based on Gram staining, morphology characters, biochemical tests and the 16S rRNA sequencing. Color removal was highest in microaerophilic culture of pH 7 at 30 ^{o}C. The isolate was able to decolorize sulphonated azo dye (Congo red) in a wide range (up to 50 ppm). This isolate could also decolorize the medium containing different types of azo dyes after 48 h incubation. High concentration of yeast extract (as a N-source) did not enhance strongly the decolorization efficiency. Similarly, carbon source inhibited decolorization activity because the consumed carbon was converted to organic acids that might decrease the pH of the culture medium, thus inhibiting the cell growth and decolorization activity. The isolate was capable to decolorize in the presence of NaCl concentrations up to 10 g/l. The biodegradation was monitored by UV–vis, IR spectroscopy and TLC. Azoreductase has shown to be inducible extracellular, flavoprotein and use NADH as electron donor. Sequential microaerophilic, aerobic and physical (radiation) treatment seemed the most logical strategy for the complete removal of azo dyes in biological systems. The phytotoxicity study revealed the degradation of Congo red into non-toxic product by *Aeromonas hydrophila* (AF).

Key words: *Aeromonas hydrophila*, Congo red, degradation of azo dyes, azoreductase, phytotoxicity.

ACKNOWLEDGMENT

First, I thank "GOD", the Beneficent, the Merciful, for my success in the completion of this work.

My sincere gratitude is due to Dr. Samir El Gizawy Professor of Agricultural Microbiology, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his kind assistance, support, patience, sincere advices, encouragement and helpful supervision. Deeply thanks to Dr. Refae I. Refae Professor of Microbiology, Faculty of Agriculture, Cairo University, for his assistance, kind support, helpful supervision, valuable discussion during all stages of fulfillment of the thesis, encouragement and continuous guidance. I wish to express my sincere thanks and gratitude to Dr. Hussein Abd El Kareem Professor of Microbiology, National Center for Radiation Research and Technology (NCRRT), for supervising the present work, great encouragement, continuous guidance, invaluable advices and valuable critical reading and revising the manuscript. I also like to thank him for giving me the chance to learn. I am deeply grateful also to Dr. Ola Mohammed Gomma Assistant Professor of Microbiology, National Center for Radiation Research and Technology (NCRRT), who suggested the point of research, for her effective supervision, fruitful discussion and valuable advice. She has guided me into this field and continuously helped and encouraged during the whole work.

I'm deeply grateful to my colleagues in (NCRRT).

Also I would like to thank my colleague Fatma Hemaia, Researcher Assistant, NRC, Giza for her kind help.

Sincere thanks to all the members of Microbiology Department, Faculty of Agriculturae, Cairo University. Great thanks to every one who offered me help and assistance.

تحفيز إنزيم الآزوردكتيز من بكتريا إيروموناس هيدروفيلا للمعالجة البيولوجية للصبغات فى مياه الصرف

رسالة ماجستير
فى العلوم الزراعية
(ميكروبيولوجيا زراعية)

مقدمة من

هبه حامد بيومى مغراوى

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (بيوتكنولوجى)- كلية الزراعة- جامعة القاهرة، ٢٠٠٤

لجنة الإشراف

الدكتور / سمير عبد الواحد الجيزاوى
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية المتفرغ - كلية الزراعة- جامعة القاهرة

الدكتور / رفاعى إبراهيم رفاعى
أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية- كلية الزراعة- جامعة القاهرة

الدكتور / حسين عبد الكريم أحمد
أستاذ باحث الميكروبيولوجيا – المركز القومي لبحوث وتكنولوجيا الاشعاع

CONTENTS

LIST OF FIGURES