



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة البصرة - كلية العلوم

قسم علم البيئة

استخدام بعض الفطريات المعزولة من الترب الزراعية والرواسب في محافظة البصرة لإنتاج الإيثانول الحيوي من مخلفات الذرة والشعير

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم - جامعة البصرة

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير

في علم البيئة (التقانات البيئية)

تقدمت بها

أبرار أمير ظاهر

بكالوريوس علم البيئة

2018/2017

بإشراف

أ.د. مصطفى عبد الوهاب نجم

الخلاصة

أجريت الدراسة الحالية لاختبار قابلية الفطريات على إنتاج الإيثانول الحيوي من مخلفات الذرة والشعير، إذ عزلت الفطريات من 7 عينات من الترب مأخوذة من مناطق مختلفة في محافظة البصرة وتم تسجيل 17 نوعاً فطرياً تعود الى تسعة اجناس فضلاً عن الخيوط الفطرية العقيمة، وشكلت الفطريات الكيسية الممتلة للحالة اللاجنسية Anamorphic ascomycetes أكبر مجموعة وبنسبة ظهور 76.4% وتلتها الفطريات الكيسية الممتلة للحالة الجنسية Teleomorphic ascomycetes والفطريات اللاقحية Zygomycota بنسبة ظهور 11.7% لكل منها، وكان الجنسان *Aspergillus* و *Penicillium* الأكثر ظهوراً بنسبة 100%، وسجل النوعان *Aspergillus niger* و *Penicillium sp.1* أعلى نسبة ظهور بلغت 100%.

تضمنت الدراسة اختبار الفعالية الانزيمية لأنواع الفطرية المعزولة لمعرفة المقدرة على افراز انزيمي السليليز واللكنيز، اذ بينت النتائج أن 9 أنواع فطرية تمكنت من افراز انزيم السليليز، في حين أعطت 7 أنواع كشافاً موجباً لإنزيم اللكنيز.

بعد ذلك اجري فحص اولي للفطريات التي اظهرت أعلى قابلية على افراز انزيمي السليليز واللكنيز لإختبار قدرتها على إنتاج الإيثانول الحيوي في الوسط المحتوي على سكر الكلوكوز ولمدة حضن 48 ساعة وبدرجة حرارة 25°م، إذ بينت النتائج أن الفطريات التي اختبرت كانت لها قابلية متفاوتة في الإنتاج وكان أعلى إنتاج للإيثانول الحيوي مع النوعين *Aspergillus flavus* بتركيز 4.8 غم/لتر و *Penicillium sp.1* بتركيز 3.62 غم/لتر.

اختير الفطران *Aspergillus flavus* و *Penicillium sp.1* اللذان اظهرا افضل قابلية على إنتاج الإيثانول الحيوي في الوسط السائل لدراسة قابليتهما على تحليل مخلفات الذرة والشعير ومعرفة قابليتهما على إنتاج الإيثانول الحيوي بصورة عزلات مفردة ولمدة 6 ايام من الحضن وبدرجة حرارة 25°م، إذ قيست تراكيز السكريات المتبقية والإيثانول الحيوي المنتج بعد ثلاث فترات وهي 48 و 96 و 144 ساعة من الحضن، بينت النتائج أن أفضل استهلاك للسكريات مع مخلفات الذرة كان من الفطر *A. flavus* اذ وصل أقل تركيز بمقدار 4.54 ملغم/غم بعد 144 ساعة من الحضن مقارنة مع معاملة السيطرة 10.8 ملغم/غم، بينما مع مخلفات الشعير كان أفضل

الخلاصة

استهلاك للسكريات من الفطر *Penicillium sp.1* إذ وصل أقل تركيز للسكريات المتبقية إلى 1.63 ملغم/غم بعد 48 ساعة من الحضانة مقارنة بمعاملة السيطرة 3.7 ملغم/غم. كان الفطر *A. flavus* هو الأفضل في إنتاج الإيثانول الحيوي مع كلا النوعين من المخلفات إذ وصل أعلى تركيز للإيثانول الحيوي 6.36 غم/لتر مع مخلفات الذرة بعد 96 ساعة من الحضانة، بينما مع مخلفات الشعير كان أعلى تركيز للإيثانول الحيوي 5.57 غم/لتر بعد 96 ساعة من الحضانة.

اجري اختباران لدراسة تأثير كل من المصدر النيتروجيني والاس الهيدروجيني على نمو الفطرين وقابليتهما على إنتاج الإيثانول الحيوي، إذ بينت النتائج أن الاس الهيدروجيني 5.5 والمصدر النيتروجيني نترات الصوديوم هما الأفضل لنمو الفطرين وإنتاج الإيثانول الحيوي مع كل من مخلفات الذرة والشعير، إذ سجل أعلى تركيز للإيثانول الحيوي عند الأس الهيدروجيني 5.5 مع مخلفات الذرة من الفطر *Aspergillus flavus* بمقدار 7.01 غم/لتر بعد 144 ساعة من الحضانة، ومع مخلفات الشعير بمقدار 5.96 غم/لتر بعد 144 ساعة من الحضانة. أما بالنسبة للمصدر النيتروجيني نترات الصوديوم فعند استعمال مخلفات الذرة كان أعلى إنتاج للإيثانول الحيوي من الفطر *A. flavus* بتركيز 7.1 غم/لتر بعد 144 ساعة من الحضانة، بينما مع مخلفات الشعير بتركيز 5.98 غم/لتر بعد 96 ساعة من الحضانة.

طبقت الظروف المثلى للنمو على الفطرين لدراسة قابليتهما على إنتاج الإيثانول الحيوي في الأوساط السائلة المحتوية على مخلفات الذرة أو الشعير وقيست التراكيز للسكريات المتبقية والإيثانول الحيوي المتكون. بينت النتائج أن أفضل استهلاك للسكريات مع مخلفات الذرة كان من الفطر *Penicillium sp.1* إذ وصل أقل تركيز للسكريات المتبقية إلى 1.14 ملغم/غم بعد 96 ساعة مقارنة بمعاملة السيطرة 10.22 ملغم/غم بينما كان أعلى إنتاج للإيثانول الحيوي من مخلفات الذرة من الفطر *Aspergillus flavus* بتركيز 8.04 غم/لتر بعد 96 ساعة، وكان أفضل استهلاك للسكريات مع مخلفات الشعير وأعلى إنتاج للإيثانول الحيوي من الفطر *Penicillium sp.1* إذ وصل أقل تركيز للسكريات المتبقية إلى 0.67 ملغم/غم مقارنة بمعاملة السيطرة 3.95 ملغم/غم وكان أعلى تركيز للإيثانول الحيوي 9.38 غم/لتر بعد 144 ساعة.

تم مزج النوعين *Aspergillus flavus* و *Penicillium sp.1* وتنميتهم تحت الظروف المثلى السابق ذكرها لتحفيز النمو لكل فطر لدراسة قابلية المزيج الفطري على إنتاج الإيثانول

الخلاصة

الحيوي، بينت النتائج أن المزيج الفطري لم يحسن من انتاج الإيثانول الحيوي مع مخلفات الذرة مقارنة مع العزلة المفردة للفطر *Aspergillus flavus* كعزلة مفردة بينما باقي المعاملات كان المزيج الفطري هو الأفضل إذ كان أعلى تركيز للإيثانول الحيوي عند استعمال المزيج الفطري 7.02 غم/لتر بعد 144 ساعة، بينما حسن المزيج الفطري من انتاج الإيثانول الحيوي من مخلفات الشعير مقارنة مع العزلات المفردة للفطرين إذ كان أعلى تركيز للإيثانول الحيوي 10.7 غم/لتر بعد 144 ساعة.

تم تحفيز الفطرين بخميرة *Saccharomyces cerevisiae* في الجزء الأخير من الدراسة لدراسة تأثيرها على انتاج الإيثانول الحيوي، إذ بينت النتائج أن إضافة الخميرة قد حسن من إنتاج الإيثانول الحيوي سواء مع مخلفات الذرة أو الشعير، وكان أعلى تركيز للإيثانول الحيوي 19.14 غم/لتر بعد 96 ساعة من الحضانة مع مخلفات الذرة بينما مع مخلفات الشعير بلغ أعلى تركيز للإيثانول الحيوي 20.63 غم/لتر بعد 144 ساعة من الحضانة.

ولتأكيد الانتاج للإيثانول الحيوي من قبل المزيج الفطري للفطرين مع الخميرة، قيست بعض العينات بجهاز (HPLC) High performance liquid chromatography إذ كان التركيز للإيثانول الحيوي المنتج مع مخلفات الذرة عند استخدام المزيج الفطري مع الخميرة 41.43 غم/لتر بينما مع مخلفات الشعير 32.91 غم/لتر.

Summary

The current study conducted to test the ability of fungi to produce bioethanol from corn and barley wastes, fungi were isolated from seven soil samples taken from different areas in Basra governorate. Seventeen fungal species belonging to nine genera in addition to sterile mycelia have been recorded from it. The anamorphic ascomycetes showed the highest percentage of appearance with 76.4%, followed by teleomorphic ascomycetes and Zygomycetes with a percentage of appearance 11.7% for each group. The genera *Aspergillus* and *Penicillium* were showed the highest percentage of appearance with 100%, and the species *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp.1 were showed the highest percentage of appearance with 100%.

The study included testing the enzymatic activity of the isolated fungal species to determine their ability to secrete the two enzymes the cellulase and lignase, the results have showed that nine fungal species were able to secrete the cellulase enzyme, while seven fungal species were able to secrete lignase enzyme.

After that, a preliminary test was conducted for the fungi that showed the highest ability to secrete the cellulase and lignase enzymes to find out their ability to produce bioethanol in the liquid medium containing glucose sugar for 48h of incubation, and at a temperature of 25 °C. The results showed that the fungi which were tested had a varying ability to produce bioethanol and the highest bioethanol production was by *Aspergillus flavus* at a concentration of 4.8 g/l and *Penicillium* sp.1 at a concentration of 3.62 g/l.

Summary

The fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp.1 which have showed the best ability to produce bioethanol in liquid media were chosen to study their ability to degrade corn and barley wastes and find out their ability to produce bioethanol as single isolates for 6 days of incubation at a temperature of 25°C. Where the concentrations of residual sugars and bioethanol produced were measured after three periods, which were 48, 96 and 144h of incubation. The results have showed that the best consumption of sugars with corn wastes was by *A. flavus*, where the lowest concentration was reached to 4.54 mg/g after 144 h of incubation compared with 10.8 mg/g for the control, while with barley wastes, the best consumption of sugars was by the *Penicillium* sp.1, as the concentrations of residual sugars reached to 1.63mg/g after 48h of incubation compared with 3.7 mg/g for the control. The fungus *A. flavus* was the best in the production of bioethanol with both types of wastes, the highest concentration of bioethanol was 6.36 g/l with corn wastes after 96h of incubation, while with barley wastes, the highest concentration of bioethanol was 5.57 g/l after 96h of incubation.

Two tests were conducted to study the effect of the nitrogen source and pH on the growth of the two fungi, and their ability to produce bioethanol. The results have showed that the pH 5.5 and the nitrogen source sodium nitrate were the best for the growth of the fungi and the production of bioethanol with corn and barley wastes. Where the highest bioethanol production was recorded by *Aspergillus flavus* at pH 5.5 with corn wastes was 7.01 g/l after 144h of incubation and with barley wastes were 5.96 g/l after 144h of incubation. As for the nitrogen source, when use corn wastes the highest concentration of bioethanol was recorded by *A. flavus* 7.1 g/l

Summary

after 144h of incubation and with barley wastes was 5.98 g/l after 96h of incubation.

The optimal growth conditions were applied for both fungi to study their ability to produce bioethanol in liquid media containing corn or barley wastes, the concentrations of the residual sugars and bioethanol were measured. The results showed that the best consumption of sugars with corn wastes was by the fungus *Penicillium* sp.1, in which the lowest concentration of residual sugars reached to 1.14 mg/g after 96h compared with 10.22 mg/g for the control, and the highest bioethanol production was appeared by the fungi *Aspergillus flavus* in a concentration of 8.04 g/l after 96h. As for barley wastes the best consumption of sugars and the highest production of bioethanol was by the fungus *Penicillium* sp.1, where the lowest concentration of residual sugars reached to 0.67 mg/g compared with 3.95 mg/g for the control, and the highest concentration of bioethanol was 9.38 g/l after 144h.

The two fungi were mixed together and the above optimal conditions were applied for the growth of fungi to study the ability of the mixed fungi to produce bioethanol. The results showed that the fungal mixture did not improve the production of bioethanol from corn wastes compared with the single isolate of the fungus *Aspergillus flavus*, while for the rest of the treatments the fungal mixture was the best, as the highest concentration of bioethanol was 7.02 g/l after 144h. While with barley wastes, the fungal mixture improved bioethanol production compared with the single isolates of the fungi, as the highest concentration of bioethanol was 10.7 g/L after 144 hours.

Summary

The fungi were stimulated with *Saccharomyces cerevisiae* to study its effect on bioethanol production. The results showed that the addition of this yeast improved the production of bioethanol, whether with corn or barley wastes, in which the highest concentration of bioethanol was 19.14 g/l after 96h of incubation with corn wastes, while barley wastes the highest concentration of bioethanol was 20.63 g/l after 144h of incubation.

Some samples were measured by High performance liquid chromatography (HPLC) to confirm the production of bioethanol, in which the concentration of bioethanol produced by the fungal mixture of the two fungi with *Saccharomyces cerevisiae* from corn wastes was 41.43 g/l, while with barley wastes was 32.91 g/l.

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of Basrah

College of Science- Department of Ecology



Use of some fungi isolated from agricultural soils and sediments in Basrah Governorate to produce bioethanol from corn and barley wastes

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

(Ecotechnology)

By

Abrar Ameer Dahir

B.Sc. in Ecology

2017/2018

Supervised by

Prof. Dr.

Mustafa A. Najim

May 2022

Shawaal 1443