



جامعة الموصل  
كلية العلوم

# عزل وتشخيص الأركيا المولدة للميثان ودورها في انتاج الغاز الحيوي من فضلات الابقار والدجاج

سحر سالم بطرس داؤود النقار

اطروحة دكتوراه  
علوم الحياة/ احياء مجهرية

باشراف  
الاستاذ الدكتورة

ادبية يونس شريف حمو النعمان

2011م

1432هـ

University of Mosul  
College of Sciences



## الخلاصة

تم إنشاء وحدات مختبرية (سعة 5 لتر) لإنتاج الغاز الحيوي من عملية الهضم اللاهوائي لستة نماذج من روث الأبقار وخمسة نماذج من فضلات الدجاج بنظام الدفعة (المتقطع) ، عند درجتي حرارة 50°م و 30°م وزمن مكوث 10 ايام .  
أجري التحليل الكيميائي و البكتريولوجي للنماذج . أظهرت نتائج تحليل روث الأبقار أن معدل النسب المئوية لمحتواها من الرطوبة بلغ 78.2% ، والمادة الصلبة الكلية Total Solid(TS) 21.8% ، والمادة الصلبة المتطايرة Volatile Solid (VS) 72.7% ، والكربون العضوي 39.7% ، والنيتروجين الكلي 2.2% (بلغ معدل النسب المئوية للنيتروجين العضوي 1.84% ، ونيتروجين الأمونيوم 0.36%) والفسفور 1.75% ، والبوتاسيوم 1.7% . وبلغ معدل نسبة الكربون : النيتروجين (1:19.2) . كما أظهرت النتائج إحتواء 50% من نماذج روث الأبقار على بكتريا الـ Salmonella .

أظهرت نتائج تحليل فضلات الدجاج أن معدل النسب المئوية لمحتواها من الرطوبة بلغ 79.6% ، والمادة الصلبة الكلية 20.4% ، والمادة الصلبة المتطايرة 55.2% ، والكربون العضوي 30.7% ، والنيتروجين الكلي 3.9% (بلغ معدل النسب المئوية للنيتروجين العضوي 3.1% ، ونيتروجين الأمونيوم 0.94%) ، والفسفور 1.98% ، والبوتاسيوم 2.3% . بلغ معدل نسبة الكربون : النيتروجين (1:7.8) . كما إحتوت 60% من نماذج فضلات الدجاج على بكتريا الـ Salmonella .

كانت إنتاجية الغاز الحيوي للهاضمات اللاهوائية لأنموذجين من روث الأبقار أعلى عند درجة حرارة 50°م إذ بلغت 309.5 و 373.0 لتر / كغم (VS) ، في حين بلغت 185.3 و 246.7 لتر / كغم (VS) عند درجة حرارة 30°م . وبلغت إنتاجية الهاضمات اللاهوائية للنماذج الأربعة الأخرى المعاملة عند درجة حرارة 50°م ما كميته 329.4 و 421.6 و 357.2 و 302.4 لتر/ كغم (VS) . وكان بدء احتراق الغاز الحيوي وبلهب ازرق في الأيام (9-11) و(12-14) عند تشغيل الهاضمات عند درجة حرارة 50°م و 30°م على التوالي . اظهر تحليل الغاز الحيوي باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الغاز GC احتواءه على 75% و 68% من غاز الميثان عند التشغيل بدرجة حرارة 50°م و 30°م على التوالي في فترة استقرار الهاضمات ، وازدادت هذه النسبة في نهاية مرحلة التشغيل لتصل أكثر من 90% لجميع الهاضمات اللاهوائية .

كانت إنتاجية الغاز الحيوي للهاضمات اللاهوائية لأنموذجين من فضلات الدجاج أعلى عند درجة حرارة 50°م إذ بلغت 442.0 و 374.9 لتر/ كغم (VS) ، في حين بلغت 335.3 و

308.8 لتر/ كغم (VS) عند درجة حرارة 30°م. وبلغت إنتاجية الهاضمات اللاهوائية للنماذج المتبقية المعاملة عند درجة حرارة 50°م ما مقداره 438.9 و 340.3 و 431.5 لتر/ كغم (VS). بدأ احتراق الغاز الحيوي في الأيام (6-8) و(9-10) عند تشغيل الهاضمات عند درجة حرارة 50°م و 30°م على التوالي . وبلغت النسبة المئوية لغاز الميثان في مرحلة استقرار الهاضمات 64% و 60% عند درجتي الحرارة 50°م و 30°م على التوالي .

قلت كمية الغاز الحيوي المنتجة عند تعريض أحد الهاضمات للضوء . جمع الغاز الحيوي في قناني معدنية مفرغة من الهواء بواسطة ضاغطه وأستعمل في تشغيل مولد كهربائي تم تحويله محلياً ليعمل بالغاز .

تم الكشف عن الأحماض الدهنية المتطايرة باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل العالي الأداء HPLC لعينات من محتوى الهاضمات اللاهوائية. وأظهرت النتائج ارتفاع النسبة المئوية لحامض البروبيونيك عند درجة حرارة 50°م ، وارتفاع النسبة المئوية لحامض الخليك عند درجة حرارة 30°م لعينات من محتوى الهاضمات اللاهوائية لروث الأبقار . فيما بينت ارتفاع النسبة المئوية لحامض البيوتريك لعينات من محتوى الهاضمات اللاهوائية لفضلات الدجاج المعاملة عند درجتي حرارة 50°م و 30°م.

أجريت التحليلات الكيميائية للفضلات الناتجة من عملية الهضم اللاهوائي . وأظهرت النتائج أن معدل النسب المئوية للنتروجين الكلي بلغ 1.3% و 1.45% (النتروجين العضوي 0.55% و 0.9% ، ونتروجين الأمونيوم 0.75% و 0.55%) ، وللفسفور 1.65% و 1.45% ، وللبوتاسيوم 1.7% و 1.7% لنواتج عملية الهضم اللاهوائي لأنموذجي روث الأبقار المعاملة عند درجتي حرارة 50°م و 30°م على التوالي . وان معدل النسب المئوية لنواتج عملية الهضم اللاهوائي لنماذج روث الأبقار الأخرى المعاملة عند درجة حرارة 50°م بلغ 2.08% نتروجين كلي (1.13% نتروجين عضوي و 0.95% نتروجين امونيوم) 1.7% فسفور، و 1.88% بوتاسيوم. كما أظهرت خلو نواتج عملية الهضم من بكتريا الـ Salmonella.

كما أظهرت نتائج التحليلات ان معدل النسب المئوية للنتروجين الكلي بلغ 2.9% و 3% (1.05% و 1.55% نتروجين عضوي ، و 1.85% و 1.45% نتروجين امونيوم)، و 1.65% و 1.5% فسفور، و 2.05% و 2.1% بوتاسيوم لنواتج عملية الهضم اللاهوائي لأنموذجي فضلات الدجاج المعاملة عند درجتي حرارة 50°م و 30°م على التوالي . وان معدل النسب المئوية لنواتج عملية الهضم اللاهوائي لنماذج فضلات الدجاج الأخرى المعاملة عند درجة حرارة 50°م بلغ 3.7% نتروجين كلي (1.7% نتروجين عضوي ، 1.97% نتروجين امونيوم) ،

و1.73% فسفور، و 1.83% بوتاسيوم . كما أظهرت نتيجة التحليل البكتريولوجي خلوها من بكتريا الـ *Salmonella*.

تمكنا في هذه الدراسة من استخدام طريقة جديدة لعزل الأركيا المولدة للميثان وهي استخدام دوارق الزرع النسيجي . كما تمكنت الدراسة من عزل عدد من أنواع الأركيا المولدة للميثان من الهاضمات اللاهوائية لروث الأبقار المعاملة عند درجة حرارة 50°م شملت *Methanobacterium formicicum* و *M. bryantii* و *Methanosarcina spp.* بنسبة مئوية قدرها 100% لكل منها . وشوهدت الخلايا المميزة للجنس *Methanothermobacter* بنسبة 100% لعينات من الهاضمات اللاهوائية تم فحصها باستخدام المجهر المتألق . وعزلت *Methanobrevibacter ruminantium* و *M. bryantii* و *M. formicicum* و *Mbr. smithii* و *Methanosarcina spp.* من محتوى الهاضمات اللاهوائية المعاملة عند درجة حرارة 30°م بنسبة مئوية قدرها 100% . كما شوهدت الخلايا المميزة للجنس *Methanosaeta* لعينات أحد الهاضمات اللاهوائية التي فحصت باستخدام المجهر المتألق.

عزلت *Methanobacterium spp.* بنسبة مئوية قدرها 100%، وعزلت *Methanosarcina spp.* بنسبة مئوية قدرها 40% من هاضمات فضلات الدجاج المعاملة عند درجة حرارة 50°م . وعزلت *Methanobacterium spp.* و *Methanobrevibacter spp.* بنسبة مئوية قدرها 100%، وعزلت *Mbr. arboriphillus* و *Methanosarcina spp.* بنسبة مئوية قدرها 50% لكل منهما من الهاضمات المعاملة عند درجة حرارة 30°م . وشوهدت الخلايا الكروية المميزة للجنس *Methanogonium* لكافة العينات التي تم فحصها باستخدام المجهر المتألق.

تم استخلاص المساعد الإنزيمي F<sub>420</sub> من خلايا الأركيا المولدة للميثان النامية في المزارع السائلة، والذي أظهر أعلى قمة امتصاص له عند الطول الموجي 420 نانوميتر . توصلت الدراسة إلى أن تنوع مجتمع الأركيا المولدة للميثان اختلف في الهاضمات اللاهوائية اعتماداً على نوع المادة الأساس وتركيز الخلات ودرجات الحرارة .

**Isolation, Identification of Methanogenic  
Archaea and their Role in Biogas  
Production from Cow and Chicken  
Manure**

**Sahar Salem Petrus AL-Nakkar**

**Ph.D.Thesis  
in  
Biology/Microbiology**

**Supervised by  
Prof. Dr.**

**Adeeba Y. Sh. Al-Nuaman**

---

**2011 A.D.**

**1432 A.H**

## Abstract

An anaerobic digestion unit (5 liter capacity) was constructed in the laboratory in order to study biogas production for six samples of cow manure and five samples of chicken manure by batch culture system at temperatures of 50°C and 30°C at 110 days duration period.

Chemical and bacteriological analysis was carried out for each sample. Results for cow manure showed that the average moisture percentage was 78.2% , 21.8% total solid material (TS), 72.7% volatile solids (VS), 39.7% organic carbon, 2.2% total nitrogen, (1.84% organic nitrogen and 0.36% ammonium nitrogen), phosphorus 1.75%, and potassium 1.7%. The ratio of C:N was shown to be 19.2 :1. Salmonella was present in 50% of samples.

Chicken manure, on the other hand showed the following results: average moisture percentage was 79.6%, total solid material 20.4%, volatile solids 55.2%, organic carbon 30.7 % , total nitrogen 3.9% (3.1% organic nitrogen, and 0.94 % ammonium nitrogen). The percentage of phosphorus and potassium was 1.98% and 2.3% respectively. The C:N ratio for chicken manure was found to be 7.8:1, and finally, Salmonella was isolated from 60% of samples.

High biogas production in anaerobic digesters was shown in two cow manure samples at 50°C, as it gave 309.5 and 373.0 liter/ kg (VS), while production was 185.3 and 246.7 liter/ kg (VS) at 30°C. Biogas yield of the remaining four samples were 329.4, 421.6, 357.2, and 302.4 liter/ kg (VS). Blue flame burning was detected on the day (9-11) and (12-14) at 50°C and 30°C respectively. Gas chromatography analysis show that biogas contained 75% methane at 50°C and 68% at 30°C in stable stages of digesters, however this percentage increased to about 90% in the final stages of digestion in all digesters.

Results also revealed higher biogas production in two chicken manure samples at 50°C namely, 442.0 and 374.9 liter/ kg (VS), while the amount of production at 30°C were 335.3 and 308.8. Biogas yield for the remaining three sample at 50°C was found to be 438.9, 340.3, and 431.5 liter/ kg (VS). Blue flame was evident at the day (6-8) and (9-10) of operation at 50°C and 30°C respectively. The percentage of methane at

the stable stage was found to be 64% and 60% at 50°C and 30°C respectively.

Biogas production was decreased when one of the digesters was subjected to light. Biogas was collected in evacuated cylinders and was used to produce electricity in a modified electricity generator.

High performance Liquid Chromatography was used to determine the presence of volatile fatty acids in cow and chicken manure in the anaerobic digesters. Results clearly showed high percentage of propionic acid at 50°C, while high percentage of acetic acid was evident at 30°C in cow manure samples. As for chicken manure, high percentage of butyric acid was detected at 50°C and 30°C.

Chemical analysis of the anaerobic digestion waste products of cow manure at 50°C and 30°C, showed total nitrogen was estimated to be 1.3% and 1.45% (0.55%, 0.9% organic nitrogen, and 0.75%, 0.55% ammonium nitrogen), 1.65%, 1.45% phosphorus, and potassium 1.7%, 1.7% respectively. The average percentage of anaerobic digestion process of the other cow digestate was shown to be 2.08% total nitrogen, (1.13% organic nitrogen and 0.95% ammonium nitrogen), 1.7% phosphorus and finally 1.88% potassium at 50°C. All samples were free of Salmonella.

As for chicken manure anaerobic digestion waste products, analysis showed that the average percentage was as follows : 2.9% , 3% total nitrogen (1.05%,1.55% organic nitrogen, and 1.85%, 1.45% ammonium nitrogen), 1.65%,1.5% phosphorus, and 2.05%, 2.1% potassium at 50°C and 30°C respectively. On the other hand, the values for the rest of chicken manure anaerobic digestion waste products at 50°C were: 3.7% total nitrogen (1.7% organic nitrogen and 1.97% ammonium nitrogen), 1.73 phosphorus, 1.83% potassium. All samples were free of Salmonella.

A new method was presented in this study for the isolation of methanogenic Archaea by using tissue culture flasks, consequently many species were isolated from digesters of cow manure operated at 50°C including *Methanobacterium formicicum*, *M. bryantii*, and *Methanosarcina* spp. in 100% of samples. Observation of *Methanothermobacter* by using fluorescent microscope confirmed the

presence of this genus in 100% of samples. Also *M. formicicum*, *M. bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Mbr. smithii* and *Methanosarcina* spp. were isolated from digesters at 30°C from 100% of samples. *Methanosaeta* was observed in one of the digester using fluorescent microscope.

*Methanobacterium* spp. was isolated from 100% chicken manure digesters and *Methanosarcina* spp. was present in 40% of chicken manure digesters operated at 50°C. *Methanobacterium* spp. and *Methanobrevibacter* spp. were isolated from 100% chicken manure digesters, while *Mbr. arboriphilus* and *Methanosarcina* spp. were present in 50% of chicken manure digesters operated at 30°C. Finally unique cocci of the genus *Methanogonium* were observed in all samples using fluorescent microscope.

The coenzyme F<sub>420</sub> was extracted from broth cultures of methanogenic archaea , which showed an absorbance peak at the wavelength 420 nm.

The present study concludes that variation in methanogenic archaea population was evident throughout the digesters depending on the substrate, acetate concentration, and temperature.