

# دراسة المجاميع الميكروبية من الحقول النفطية (الفصل الثاني)

تتميز التربة بوجود تنوع مختلف في مكوناتها، فهي عبارة عن خليط متداخل من المواد الصلبة، المواد السائلة والغازية.

عندما تتلوث التربة بالملوثات النفطية المختلفة تتأثر المجتمعات النباتية و المجتمعات الحيوانية التي تعيش في البيئة الملوثة ويأتي التأثير على النبات عن طريق اذابة المركبات الدهنية التي في الغشاء البلازمي لخلايا النبات، وتقوم بعملية الاذابة المركبات الهيدروكربونية و الموجودة في الملوثات النفطية.

المواد الهيدروكربونية تعمل ايضا على تدمير كافة أنواع الأتربة ومنها التربة الزراعية الخصبة وتحولها إلى تربة عقيمة لا نفع منها. فالنفط السائل يعمل كحاجزاً بين حبيبات التربة والهواء ويؤدي إلى تسمم وموت كافة محتويات التربة من كائناتها الحية وإلى تدهور ومن ثم موت النباتات والحيوانات والحشرات مما يسبب خللاً تاماً في النظام البيئي. كما يشكل النفط الملتصق بالمجموع الخضري عازلاً يمنع التبادل الغازي بين النباتات والهواء الجوي ويؤدي بالنهاية إلى موتها.

□ وعندما يتسرب المواد البترولية المختلفة الى التربة فان هذه المواد تتعرض لعمليات التحلل البيولوجي.

□ وعندما تتحلل المواد النفطية في التربة تحللا بيولوجيا كاملا في وجود الاكسجين فانها تتحول الي ثاني اكسيد الكربون وماء ومركبات مهمة تدخل في بناءخلايا الكائنات الدقيقة المسؤولة عن هذه التحللات. اما في وجود كميات قليلة من الاكسجين الجوي، فان التحلل البيولوجي لهذه الملوثات يكون جزئيا، ويتكون نتيجة لذلك احماض دهنية ومواد فينولية.

## ❖ تجربة ٦ : عزل المجاميع الميكروبية من الحقول النفطية بطريقة التخطيط

- ١- حضر بيئة NA للبكتيريا PDA للفطريات
- ٢- تعقم البيئة في الاوتوكلاف وتبرد وتصب في اطباق بتري معقمة وتترك الى ان تتصلب
- ٣- تحضر انابيب اختبار سعة ١٠ مل تحتوى على ١ مل من الماء ثم تعقم
- ٤- يوزن ٠,١ جم من العينة في انابيب اختبار تحت ظروف التعقيم
- ٥- ترج الانابيب ثم انقل مل عقدة ابرة التلقيح وخطط على سطح البيئة المتصلبة
- ٦- تحضن الاطباق عند درجة ٣٧م لبكتيريا لمدة ٢٤-٤٨ ساعة و ٢٥ م للفطريات لمدة ٥-٧ ايام
- ٧- صبغ العزلات بصبغة جرام
- ٨- تدون النتائج بدراسة الصفات المورفولوجية بعد فحصها تحت المجهر

## تنقية المزارع المعزولة وحفظها التنقية

هو الحصول على مزرعة تحوي نوع واحد فقط من الاحياء الدقيقة وبالتالي الحصول على مستعمرات نقية و مستقلة

أولاً: تنقية المزارع البكتيرية: Purification of bacterial cultures

باستخدام طريقة تخطيط الاطباق: Streak Plate Method

الهدف من التخطيط: هو الحصول من معلق البكتيريا على مستعمرات منفصلة تماماً.  
تخطط العينة علي سطح بيئة الآجار المغذي بطريقة التخطيط البسيط أو التخطيط البسيط المتكرر أو التخطيط المتعامد

### التخطيط البسيط :

طريقة العمل:

- 1- تحت ظروف التعقيم، تعقم إبرة التلقيح باللهب ثم تبرد بلمس حافة الآجار.
  - 2- يؤخذ ملء عقدة Loop full من المزرعة المختلطة ويخطط على سطح البيئة الصلبة بطريقة حلزونية.
  - 3- تكتب البيانات اللازمة أسفل الطبق.
  - 4- تحضن الأطباق مقلوبة عند 37م° لمدة 24 ساعة.
- لاحظي ظهور مستعمرات فردية في الجزء الأخير من التخطيط.

## □ ثانياً: تنقية المزارع الفطرية

□ طريقة العمل:

□ ١- تحت ظروف التعقيم، تعقم إبرة التلقيح باللهب ثم تبرد بلمس حافة البيئة

□ ٢- يزرع الفطر في منتصف طبق محتوي على بيئة غذائية مناسبة بعزل نهاية الهيفا باحتراس بواسطة إبرة معقمة حتى نحصل على مزرعة نقية. ثم يحضن في درجة حرارة ٢٥م°

## □ كيفية حفظ المزارع الميكروبية

- ١- يتم حفظ المزارع لفترات قصيرة (شهر - ٣ اشهر) في الانابيب الاجار المائل وتحفظ في درجات حرارة منخفضة. أما الكائنات اللاهوائية الاختيارية يتم حفظها في اجار عميق بطريقة الوخر ٤م.
- ٢- يتم حفظ المزارع لفترات طويلة بعدة طرق حتى لا يحدث تغير في التركيب
- A-التجفيد : يتم عمل معلق في بيئة سائلة من البيئة التي زرعت فيها من قبل ويتم خلط المعلق بنسبة ١: ٢٠ من الجليسرول المعقم وتحفظ -٢٠م
- B-التجميد :تجميد سريع للعينة وذلك بخاطها بالثلج الجاف والكحول وتجفف بعناية. وذلك لحدوث تسام للماء دون تكسير للخلايا مع التحام محتويات المزرعة.
- C-استخدام النتروجين السائل: عند -١٩٨م حيث تحفظ عن اى تغير فسيولوجي او وراثي نظرا لحدوث التجفيف في حالة التجمد.

# دراسة كفاءة العزلات الميكروبية على تحليل النفط الخام بطريقة التخطيط

□ تجربة ٨: اختبار كفاءة العزلات الميكروبية على تحليل النفط الخام بطريقة التخطيط

1- حضر بيئة اجار PDA- NA

٢- تعقم البيئة في الاوتوكلاف وتبرد وتصب في اطباق بتري معقمة وتترك الى ان تتصلب

٣- بواسطة ماسحة معقمة يتم تغطية سطح البيئة بطبقة رقيقة من النفط الخام المعقمة ثم توضع الاطباق في الحضان لمدة ٣٠-٤٥ دقيقة على ٣٧م حتى تتشرب البيئة بطبقة النفط

٤- خذ ١، ٠ مل او مل عقدة ابرة التلقيح من النمو الميكروبي وانشرها اونقم بتخطيطها على سطح البيئة المعقمة

٥- قم بتحضير الاطباق مقلوبة لمدة ٥ ايام

٦- لاحظ وجود المناطق الشفافة حول لمستعمرات الميكروبية وافحصها ونقوم بقياس قطر المناطق الشفافة.

## تجربة ٩: اختبار كفاءة العزلات الميكروبية على تحليل النفط الخام في

### وسط سائل

### طريقة العمل :

١- عمل بيئة R2B وتوزيعها في دوارق او انابيب

٢- تعقم البيئة في الاوتوكلاف وتبرد

٣- يضاف ٢ مل زيت نفط معقم

٤- تلقح ب ١ مل من المزرعة الميكروبية

٥- تحضن في حضان الهزاز لمدة اسبوع

بعد عمل التجربة يتم قياس درجة النمو (الكفاءة استخدام النفط) بطريقتين:

١- **قياس درجة التعكير:** بواسطة جهاز المطياف الضوئي على طول موجي ٦٠٠ نانوميتر ومقارنتها مع تجربة المقارنة.

٢- **طريقة الوزن الرطب او الجاف:** توزن الانبوبة وهي فارغة (و ١)

ثم يؤخذ من البيئة السابقة ١ مل ويوزن (و ٢) ويعمل لها طرد

مركزي ثم نتخلص من الراشح توزن (و ٣)

يتم حساب الوزن الرطب = (و ١) - (و ٣).

او بطريقة الوزن الجاف: يرشح النمو الميكروبي خلال ورقة ترشيح معلومة الوزن ثم جفف في الفرن

على ١٠٠ م لمدة ٢٤ ساعة حتى يثبت الوزن

يتم حساب الوزن الجاف = الوزن الجاف- وزن ورقة الترشيح .