

المقرر العملي لمادة مقدمة في ميكروبيولوجيا البترول

466 حدق

إعداد:

بسام النفيسي

العملي الأول

 مقدمة عن علم الاحياء الدقيقة للبترول

علم الأحياء الدقيقة البترولية:

هو العلم الذي يختص في جوانب الاحياء الدقيقة ذات العلاقة بالصناعات النفطية و دور الكائنات الحية الدقيقة في تكوين البترول و الاستكشاف و الانتاج و التصنيع و التخزين و التركيب للبترول و مشتقاته.

\*هناك الكثير من الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتريا و الفطريات و الطحالب لديها القدرة الأنزيمية لاستخدام الهيدروكربونات النفطية كمواد غذائية و تستهلك جزء من الهيدركربونات و تحولها إلى غاز ثاني أكسيد الكربون CO2 و ماء H20 إلى جانب المواد الخلوية مثل البروتينات و الأحماض النووية.

النفط الخام (البترول الخام):

هو خليط معقد من الهيدروكربونات و هي مركبات عضوية تركيبها الأساسي هو الكربون و الهيدروجين و الأكسجين C H O.

 علاقة الميكروبات بالبترول:

1- تكوين البترول : يكون أًصل البترول الخام طحالب ونباتات ميتتة و تم تحليلها بواسطة الكائنات الحية الدقيقة في باطن الارض بفعل الضغط والحرارة.

أ- تأثير البكتريا : يقصد هنا تأثير البكتريا الاختزالية اللاهوائية في عملية تكوين البترول.

ب- الضغط و الحرارة: مع تأثير البكتريا و تخزيلها و تحليلها للمواد العضوية الميتة وتتراكم في قاع المحيط مع الطين و تتكون الحمأة النشطة و بعد ذلك بفعل الضغط و الحرارة الشديدة تتكون مادة زيتية و بعد فترة من الزمن مع الضغط والحرارة يتكون النفط الخام.

2-الكشف عن البترول: يتم الكشف عن مناطق البترول اثناء الحفر و تسرب المادة البترولية للصخور يتم وضع الكائنات الحية الدقيقة المحللة للبترول للكشف عنها و بعد ذلك استخلاصها.

3-استخلاص البترول: يتم استخلاص البترول بعد عزل الكائنات الحية الدقيقة المحللة للبترول ويتم وضعها على الصخور التي تحتوي على المواد المتسربة و تقوم الكائنات الحية الدقيقة بتفتت الصخور المحتوية على البترول المتسرب وبعد التسرب يتم استخلاص البترول و الاستفادة منه.

أهم الاجناس الميكروبية : bacterial Species importance

1-Bacillus sp. 5-Mycobacterium sp.

2-Micrococcus sp. 6-Brevebacterium sp.

3-Pseudomonas sp. 7-Corynebacterium sp.

4-Acienobacter sp.

Fungal species importance:

1-Cladosporium sp. 3-Trichosporium sp.

2-Candida sp. 4- Rhodotorula sp.

\*الكائن الحي الدقيق متخصص في تحليل نوع محدد من المواد الهيدروكربونية.

\*الفطريات تنشط في البيئات اليابسة على عكس البكتريا تنشط في البيئات المائية.

\*تطبيقات أحياء الدقيقة في التربة\*

1-التخلص من التلوث النفطي(مثل الشاطيء أو النهر الملوث بالبترول ومشتقاته تقوم الكائنات الحية الدقيقة بالتخلص منه).

2-الاستخلاص المعزز للنفط (Xanthomonas) بكتريا تقوم باستخلاص النفط من الصخور الملوثة بالبترول و تستخدم الزانثان والسكاريد في الاستخلاص.

3-تحويل الهيدروكربونات النفطية الى مواد تستفيد منها الميكروبات الى منتجات ميكروبية وبذلك عند استخلاص النفط ميكروبيا تقوم الميكروبات بأنتاج مجموعة متنوعة من الأحماض الأمينية و البروتينات و الكربوهيدرات و الأحماض النووية و الفيتامينات و المضادات الحيوية للغرض الصناعي.

4-انتاج الغازي الحيوي و هو غاز الميثان Ch4.

العملي الثاني

عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة النفطية (التربة الملوثة بمشتقات البترول)

اسم التجربة:عزل الكائنات الحية الدقيقة (بكتريا و فطريات) من التربة البترولية.

الهدف من التجربة: لعزل و تنقية البكتريا و الفطر من التربة النفطية و دراسة تأثيرها على المشتقات البترولية.

الادوات المستخدمة:

تربة نفطية يتم الحصول عليها من محطات النفط (تكون التربة موجودة حول المحطة عند عملية اسكاب بعض المشتقات النفطية على التربة أو طريقة الحصول عليها تكنيس مضخة البنزين أو الديزل حولها من بقايا الغبار وعند تجميعها تتكون لديك تربة نفطية وتكون سوداء اللون) – بيئة الاجار المغذي Nutrient Agar - بيئة Potatoes Dextrose Agar اجار بطاطس الجلوكوز - أنابيب ماء مقطر سعة 9 مل – ماصات معقمة سعة 1 مل – موقد بنسن – ديتول – دوارق سعة 500 مل لتحضير البيئة – ماء مقطر-أطباق بتري معقمة.

طريقة العمل:

1- يتم تحضير بيئتي الاجار المغذي و بطاطس الجلوكوز و وزنها في 500 مل ماء مقطر.

2- تغليفها بالقطن والقصدير ووضعها في الاوتوكليفAutoclave لمدة 15 الى 20 دقيقة.

3-يتم تحضير سلسلة من التخفيفات 1/10 و 1/100 و 1/1000 (نريد فقط 3 سلسلات من التخفيف):

أ- زن 1 جم من التربة النفطية (بمقدار ملعقة السكر الصغيرة) و وضعها في الانبوب الاول 1/10من التخفيف وبذلك تصبح 10 مل و رج الانبوبة جيدا وتركها لمدة 5 الى 10 دقائق حتى تترسب مرة أخرى.

ب- سحب 1 مل من الانبوب الاول للتخفيف 1/10 و وضعها في الانبوب الثاني للتخفيف الثاني 1/100 و رجها جيدا و سحب 1 مل من انبوب التخفيف الاول 1/10 على طبق بتري معقم.

ج- سحب 1 مل من الانبوب الثاني للتخفيف 1/100 ووضعها في الانبوب الثالث 1/1000 و رجها جيدا و سحب 1مل من الانبوب التخفيف الثاني 1/ 100 على طبق بتري معقم.

د- سحب 1 مل من الانبوب الثالث للتخفيف 1/1000 على طبق بتري معقم.

4- يتم تبريد البيئات حتى تستطيع صبها ثم صب البيئات على أطباق التخفيف و مزجها جيدا مع التخفيف باتجاه عقارب الساعة وتركها حتى تتصلب ثم نقوم بتحضينها لمدة 24-48 ساعة على الحاضنة 37 م للبكتريا و على 25 م للفطريات لمدةأسبوع(وضعها في درجة حرارة الغرفة).

5-اخراج الاطباق من الحاضنة للبكتريا و اخراج اطباق الفطريات الموضوعة في الرف وقراءة النتائج.

النتائج:

1/10 : نموات بكتيرية تقدر ب 500 مستعمرة بكتيرية .

1/10: نموات خميرية و أعفان تقدر ب 500 مستعمرة خميرية و أعفان.

1/100: نموات بكتيرية تقدر ب 200 مستعمرة بكتيرية.

1/100: نموات خميرية تقدر ب 150مستعمرة خميرية.

1/1000: خمس 5 مستعمرات بكتيرية.

1/1000: غزلين فطرين و مستعمرة خميرية.

العملي الثالث

تنقية الكائنات الحية الدقيقة(بكتيريا-فطريات) بعد عزلها من التربة النفطية

اسم التجربة : تنقية الكائنات الحية الدقيقة بعد عزلها من التربة النفطية.

الهدف من التجربة: تعلم تقنية التنقية للفطريات و البكتريا والخمائر بعد تنقيتها نقوم بدراسة تأثيرها على المشتقات البترولية.

\*التنقية: هو الحصول على مزرعة تحوي نوع واحد فقط من الاحياء الدقيقة وبالتالي الحصول على مستعمرات نقية و مستقلة.

ما الهدف من عملية التنقية؟؟؟

هو الحصول على مستعمرة نقية ومستقلة وبالتالي دراسة صفات وخصائص الكائن الحي بدقة.

المزرعة النقيةPure culture:

هي التي تحتوي على خلايا نوع واحد فقط من الكائنات الحية الدقيقة.

المزرعة المختلطةMixed culture :

هي التي تحتوي على نوعين أو أكثر من الكائنات الحية الدقيقة.

كيف نصل للمستعمرة المستقلة و النقية؟

بالحصول على نوع واحد من المستعمرات البكتيرية ويتم ذلك بتأكيد عملية التنقية(تكرارها).

\*طرق التنقية: تختلف حسب الهدف من الدراسة والامكانيات المتوفرة.

أولاً:تنقية المزارع البكتيرية و الخميرية

 Purification of bacterial and yeast cultures

* توجد طريقتان أساسيتان لتنقية المزارع البكتيرية و الخميرية:
* طريقة تخطيط الأطباق (بسيط-متعامد) Streak Plate Method.
* طريقة الأطباق المصبوبة Pour Plate Method .

\*الهدف من عملية التخطيط: للحصول على نوع واحد من الكائنات الحية الدقيقة.

ثانيا: تنقية المزارع الفطرية (الأعفان):

 يعتبر عزل وإنماء الفطريات في بيئات نقية والاحتفاظ بها في هذه البيئات من الدراسات المهمة لعمل الدراسات المختلفة مثل النمو والتجرثم والإنبات وغيرها من الدراسات المختلفة وكذلك دراسة تاريخ الحياة لهذه الفطريات وطرق التطفل والتغذية.

طرق تنقية الفطريات(الأعفان):

يزرع الفطر الملوث بفطر آخر في منتصف طبق محتوي على بيئة غذائية مناسبة ثم يحضن في درجة حرارة 25م° وفي أغلب الأحيان ينمو فطر أسرع من الفطر الآخر وفي هذه الحالة يمكن عزل نهاية الهيفا باحتراس بواسطة إبرة معقمة حتى نحصل على مزرعة نقية.

الأدوات المستخدمة:

أطباق نتائج تجربة عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة النفطية – أطباق بيئة الاجار المغذي Nutrient Agar - بيئة Potatoes Dextrose Agar اجار بطاطس الجلوكوز – ابرة تلقيح للفطريات – ابرة تلقيج ذات عقفة للبكتريا- موقد بنسن – ديتول.

طريقة العمل:

1-نقوم بتعقيم ابرة التلقيح ذات عقفة باللهب ثم نبردها في بيئة NA و بيئة PDAالمراد التخطيط فيها و تتميز ابرة ذات عقفة انها سريعة التبريد .

2- نقوم بأخذ مستعمرة بكتيرية و خميرية و عمل تخطيط متعامد Fourth quarter streaking .

3- يتم تعقيم ابرة تلقيح الفطريات (الاعفان) باللهب وتركه فترة ليبرد ثم وضعه في بيئة PDA للتأكد من تبريده ثم نقل نهاية الهيفا في الطبق بأخذ قطعة من الفطر و وضعه في منتصف الطبق .

4- يتم تحضين الأطباق البكتيرية و الخميرية في الحاضنة على درجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 -48 ساعة.

5- يتم تحضين أطباق الفطريات في الرف على درجة حرارة الغرفة لمدة أسبوع.

6- اخراج الاطباق من الحاضنة للبكتريا و الخمائر و اخراج اطباق الفطريات الموضوعة في الرف وقراءة النتائج.

النتائج:

البكتريا: ظهور مستعمرات من بكتريا السالبة لصبغة جرام GNR غير مخمرة لسكر اللاكتوز و سببت حركة التموج في طبق NA و شكل المستعمرات ناشفة .

الخمائر: ظهور مستعمرات من Candida sp. كريمية الشكل.

الفطريات: ظهور الغزل الفطري الاسود و هي Apergillus niger.

العملي الرابع

دراسة تأثير المشتقات البترولية على الكائنات الحية الدقيقة و دراسة استخدام الكائنات الحية الدقيقة للمشتقات البترولية كمصدر كربوني

\*المشتقات البترولية: هي مشتقات مستخلصة من البترول الخام وتستخدم كوقود للمحركات ونسنخدم هنا نوعين من المشتقات النفطية.

اسم التجربة :دراسة تأثير المشتقات البترولية على البكتريا و الخميرة و دراسة هل تستخدم المشتقات البترولية كمصدر كربوني.

الهدف من التجربة:التأكد هل هذه الكائنات الحية الدقيقة استخدمت المشتقات البترولية كمصدر كربوني أم أثرت على نموها وقامت بتثبيطه؟

الادوات المستخدمة:

ثلاث مصادر من المشتقات البترولية(600مل من بنزين 95 الاحمر و 91 الاخضر و ديزل )-دوارق سعة 100 مل – 5دوارق 100 مل مرق البطاطس Potatoes broth – 5 دوارق ماء الببتون Water peptone – جلوكوز – مزارع طازجة من GNRالبكتريا السالبة لصبغة جرام – مزرعة طازجة من Candida sp – أنابيب فيها ماء صنبور saline water- قصدير قطن – قصدير – موقد بنزن – مخابير مدررجة-ميزان.

طريقة العمل:

1-يتم وزن 200 جرام (قطعتين بطاطس صغيرة أو قطعة بطاطس كبيرة) ثم غسل البطاطس من الغبار بعد ذلك يتم تقطيع البطاطس الى مكعبات بوجود القشرووضعها في دورق سعة 1000 مل مع اضافة 500 مل من الماء المقطر وضعها في الاوتوكليف لمدة 10 دقائق حتى تسلق جيدا ثم اخراجها من الاوتوكليف و القيام بترشيحها واخذ مرق البطاطس مع عصر الجزء الاخير من بقايا البطاطس و اضافة بعض من الماء المقطر لتصل الى 1000 مل .

2-توزيع 1000 مل من مرق البطاطس الى 5 دوارق (دورق 100 مل مرق البطاطس -100 مل مرق البطاطس مع 4 جم سكر الجلوكوز – ثلاث دوارق 100 مل مع تركيزات مختلفة من المشتقات البترولية (بنزين95 مل5-مل10-20 مل )و(بنزين91 مل5-مل10-20 مل )و (ديزل95 مل5-مل10-20 مل ).

3- يتم وزن 15 جم من ماء البيبتون في 1000 مل ماء مقطر و توزيعها على 5 دوراق 100 مل (دورق 100 مل ماء الببتون -100 مل ماء البيبتون مع 4 جم سكر الجلوكوز – ثلاث دوارق 100 مل مع تركيزات مختلفة من المشتقات البترولية (بنزين95 مل5-مل10-20 مل )و(بنزين91 مل5-مل10-20 مل )و (ديزل95 مل5-مل10-20 مل ).

4-يتم تغليف الدوراق بالقطن والقصدير جيدا ثم وضعها في الاوتوكليف لمدة 15 دقيقة الى 20 دقيقة للتعقيم التام.

5- بعد التعقيم واخراج البيئات السائلة المراد دراستها يتم تلقيح الدوارق السائلة بالبكتريا و الخميرة بأضافتهم في أنابيب ماء صنبور salaine بأخذ 3 مستعمرات من الخميرة و البكتريا و مزجها في كلا منهما بأنبوبته الخاصة و رجها جيدا حتى تتعكر.

6- يتم تلقيح الدوارق للبيئات الخميرية بملء عقدة من الانبوب و كذلك نكررها للبكتريا.

7-يتم تحضين جميع الدوارق على الحاضنة 37 درجة مئوية لمدة أسبوع وبعد ذلك تقرأ النتائج.

النتائج:

عند وجود العكارة للدوارق فهذا يدل على أن الكائنات الحية الدقيقة استخدمت المشتقات البترولية كمصدر كربوني لتغذيتها و ان لم تنمو نحضنها لمدة أسبوع آخر ونقرأها وعند عدم وجود عكارة فيدل على أن المشتقات البترولية قامت بتثبيط الكائنات الحية و منعت نموها.

العملي الخامس

طريقة الشريحة المطمورة (المدفونة)

Rossi and cholodny buried slide tech.

هي طريقة فحص مجهرية مباشرة لفحص بكتريا التربة بطريقة الفحص المجهري وصبغ الشريحة بصبغة جرام وهنا نستخدمها في فحص التربة النفطية وتكون الطريقة بدفن شريحتين زجاجتين على دورق مملوء بالتربة النفطية بوزن 1 جم من التربة و تخلط مع 5 – 15 مل ماء مقطر و يعمل مجرى هواء بالمنتصف و تغلف بالقصدير وتحضن على درجة حرارة الغرفة 25 درجة مئوية لمدة أسبوع بعد التحضين نقوم بازالة الشريحتين من التربة و صبغها بصبغة جرام وفحصها مجهريا.

العملي السادس

تأثير بكتريا الميثان على تحلل المواد البترولية

بكتريا الميثانMethanogenes: هي مجموعة من البكتريا التي تنتج غاز الميثان بعد اكتسابها للطاقة و تنتج غاز الميثان بعد عملية الهدم وهي لا هوائية إجبارية سالبة لصبغة جرام غير مكونة للجراثيم وتنتج غاز الميثان من CO2 and H2.

توجد في مياه الصرف الصحي و المستنقعات و فوهات البراكين و البحار و أعماق المحيطات وتعيش في القناة الهضمية للانسان و الحيوان.

مصادرها: تحلل المخلفات العضوية – مصادر طبيعية مستنقعات – وقود الحفريات – عملية الهضم في الحيوانات – تتواجد أثناء زراعة الارز.

أهم الاجناس البكتيرية التي تنتج الميثان:

Methanobacterium formicicium

Methanosacrina

Methancoccus

 and Methnothrix

\*غان الميثان\*: هو أبسط الألكانات و يكون 90% من غاز المستنقعات و ينتج عن تحلل الواد العضوية ويوجد أيضا ضمن غاز الفحم و أحد المكونات الرئيسية للغاز الطبيعي المتصاعد من آبار النفط و ينتج في كثيرمن المزارع نتيجة عملية التحلل منتجا البتوقاز الذي يحتوي على نسبة كبيرة من غاز الميثان لاستخدامه كوقود.

خواصه:

غاز شفاف اللون عديم الرائحة – شحيح الذوبان في الماء – قابل للاحتراق و الاشتعال -كثافته أقل من الهواء الجوي – قابل للاسالة بالضغط والتبريد الشديد.