عزل الأحياء المجهرية الصناعية من المصادر الطبيعية

المصادر الطبيعية الرئيسية للأحياء المجهرية الصناعية هي التربة والمياه والأغذية الطازجة والمتخمرة والحيوانات والنباتات الحية والمجاري، والطريقة المثلى لعزل السلالات هي أستعمال المصادر الطبيعية وخصوصاً التربة والتي قد تكون غنية بالأحياء المجهرية المرغوبة. عادة تصمم عملية العزل بحيث تشجع نمو الأنواع التي تحمل الصفة المرغوبة حيث تستعمل الصفة المرغوبة عامل الأنتخاب ويصاحبها أنتخاب بسيط يميز الأنواع المرغوبة جداً. وقد تستعمل الطرق الأنتقائية في عزل الأنواع التي تستطيع النمو على أوساط غذائية معينه أو تحت ظروف مزرعية معينه والتي لا تسمح بنمو الأنواع الأخرى.

أهم طرق العزل

أولاً – طرق العزل التي تستخدم عملية انتخاب الصفة المرغوبة

1 – طريقة المزارع السائلة المدعمة Enriched liquid cultures

تعتمد هذه الطريقة على تشجيع نمو الأحياء المجهرية المرغوبة مقارنة بالإحياء المجهرية الأخرى الموجودة في العينة الأصلية والتي أستعملت مصدراً للكائن المجهري المرغوب، تتضمن هذه الطريقة بأخذ عينه من مصادر طبيعية تحتوي على مزيج من الأحياء المجهرية حيث يتم توفير الظروف الملائمة للأنواع المرغوبة وغير الملائمة للأنواع الأخرى، مثل أضافة مادة غذائية مدعمه للوسط الغذائي بحيث تشجع نمو أنواع معينه أو أضافة مواد معينه مثبطة تثبط نمو الأنواع غير المرغوبة. ويؤدي نمو الأنواع المرغوبة الى تغيير الطبيعة الأنتخابية للوسط الغذائي وبالتالي قد يسمح بنمو أنواع أخرى من الأحياء المجهرية وينتج عن ذلك تعاقب نمو وتداخل الأحياء المجهرية ويمكن التغلب على ذلك والحفاظ على الطبيعة الأنتخابية للوسط بتجديد المزرعة المدعمة مرات عديدة أي أعادة الزراعة Subculturing على وسط طازج مماثل. وقد تتم عملية التجديد لمرات عديدة قبل العزل النهائي للكائن المجهري السائد، وأن توقيت عملية التجديد يعد مهماً جداً ويجب أن يتوافق مع الفترة التي يصبح عندها الكائن المجهري المرغوب سائداً.

2- طريقة الأوساط الغذائي المتصلبة (الاطباق)

أستعملت هذه الطريقة في عزل الأحياء المجهرية المنتجة لإنزيمات معينه حيث تستعمل أوساط غذائية أنتقائية Selective mediaتحتوي على المادة الغذائية Substrateالتي يعمل عليها الأنزيم المرغوب التي تشجع نمو أنواع الأحياء المجهرية المنتجة للإنزيمات فقط.

ثانياً – طرق العزل التي لاتستعمل عملية انتخاب الصفة المرغوبة

1 – الغربلة الخاصة بالأحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية

يمكن الكشف عن الفعالية المضادة للأحياء المجهرية بتنميتها على وسط متصلب (اكار) بوجود كائن مجهري أخر يتأثر بالمادة المضادة أو حساس أتجاهها والذي لا ينمو في حالة أنتاج تلك المادة من قبل الكائن المجهري المنتج. كما يمكن أستخدام طريقة أخرى وهي تنمية الكائن المنتج في وسط زرعي سائل وبعدها يتم الكشف عن المادة في راشح المزرعة الخالي من الخلايا.

2 – الغربلة الخاصة بالأحياء المجهرية المنتجة لعوامل النمو

يعد أنتاج عوامل النمو مثل الأحماض الأمينية والنيوكليوتيدات من الصفات التي يصعب معها أستخدام الصفة الانتقائية في العزل لذلك عزلت الأحياء المجهرية المنتجة لهذه المواد عشوائياً ومن ثم يتم الكشف عن الأحياء المجهرية المنتجة بأستخدام أختبارات الغربلة. يعتمد الكشف عن الأحياء المجهرية المنتجة لعوامل النمو على تحفيز السلالات الأكسوتروفية Auxotrophic (وهي السلالات المتطفرة التي ينقصها أنتاج عامل نمو معين) للكائن المجهري المنتج لعوامل النمو. وتتلخص خطوات الكشف عن الأحياء المجهرية المنتجة للإحماض الأمينة بما يلي:

أن أغلب الأحياء المجهرية المنتجة للأحماض الأمينة هي تابعة لأجناس بكتريا Micrococcus, Brivebacterium, Microbacterium, Arthrobacterلذلك

يتم في البداية 1- أستبعاد الفطريات خلال عملية العزل الأولية وذلك بإضافة مواد مضادة للفطريات مثل مادة سايكلوهكسيمايد cycloheximideالى الوسط الغذائي المستخدم في عملية العزل وتتم هذه العملية على وسط صلب وذلك لأن عمليه الغربلة الأولية نوعية وليست كمية، ثم 2- تعاد زراعة أطباق العزل التي تحتوي على 30 – 50 مستعمرة على وسط غذائي صلب يحتوي على مكونات غذائية كافية لدعم أنتاج الأحماض الأمينية ونميت لمدة 2 – 3 أيام وتم 3- قتل المستعمرات المتكونة بالأشعة فوق البنفسجية و 4- غطيت بالأكار الذي يحتوي على معلق من السلالة الأكسوتروفية للمنتوج المرغوب. ظهور نمو الكائن المجهري المستخدم في الفحص بعد 16 ساعة من التحضين عند درجة حرارة 37 م°وعلى هيئة هالة حول مستعمرات الكائن المجهري المنتج للحامض الأميني في أطباق بتري يدل على انتاج عامل النمو. يمكن بعد ذلك عزل الكائن المجهري المنتج من الأطباق الأصلية التي أعيدت زراعتها، بعد ذلك أجراء الغربلة الكمية بتنمية الكائن المجهري المنتج في مزارع سائله وتقدير كمية الحامض الأميني المنتج في راشح المزرعة الخالي من الخلايا.

3 – الغربلة الخاصة بالأحياء المجهرية المنتجة للسكريات المتعددة

يتم عزل عدد من الأحياء المجهرية المنتجة للسكريات المتعددة الخارجية exopolysaccharides مثل الأصماغ من مصادر مختلفة ويصعب أستخدام هذه الصفة كعامل أنتقائي في عملية العزل وقد أقترح عزل هذه من بعض المخلفات الصناعية الكاربوهيدراتية لكونها غنية بالأحياء المنتجة للمواد متعددة السكريات. تنمى العزلات المأخوذة من هذه المصادر على أوساط غذائية مناسبة والتي من خلالها يتم التعرف على الكائن المنتج من المظهر الهلامي للمستعمرات ثم تعزل هذه المستعمرات وتنمى في مزارع سائلة لإجراء غربلة كمية لتقدير كمية السكريات المتعددة.

•

وراثة الأحياء المجهرية الصناعية وعلاقتها بتحسين السلالات

- تنتج الأحياء المجهرية الصناعية المعزولة من الطبيعة كميات قليله جداً من المنتوج المرغوب، لذلك تبدا عملية التحسين بقصد زيادة الإنتاج مباشرة بعد عزل الكائن الحي المجهري الصناعي. تتم عملية تحسين الإنتاج من خلال أستخدام الظروف المثالية وأختيار الوسط الغذائي الملائم ولكن زيادة الإنتاج نتيجة لتنظيم هذه الظروف يكون قليل لأن صفة إنتاج المنتوج المرغوب يسيطر عليها بالصفات الوراثية للكائن المجهري وبهذا يجب تحوير الصفات الوراثية للكائن المجهري المعزول حتى يمكن زيادة إنتاجيته بصورة كبيرة، ومن أهم طرق تحوير الصفات الوراثية :
- 1 - الطفرات الوراثية.
- 2- عمليات التهجين.
- 3- تكنولوجيا اعادة توليف الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسيجين (الهندسة الوراثية).

أولاً : الطفرات الوراثية

- أحتلت الطفرات الوراثية أهمية خاصة في الأحياء المجهرية الصناعية كونها المصدر الوحيد لجميع التغيرات الوراثية لأن عدد من الأحياء المجهرية الصناعية المهمة مثل بعض الأنواع التابعة لجنس بنسيليوم Penicillium, Aspergillus ليس لها دورة تكاثر جنسي واضحة ولذلك لايمكن تحسينها بأستخدام طريقة التهجين الجنسي. لقد أستخدم التطفير الوراثي في التكنولوجيا الحيوية لكونها طريقة رئيسية في الحصول على سلالات ذات إنتاجية عالية عن طريق تعاقب النيوكليوتيدات على جزيئة الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNAوالذي يؤدي الى تحوير المعلومات الوراثية ومن ثم تكوين بروتين محور. حيث حققت عملية التطفير الوراثي زيادة في أنتاج المضادات الحيوية من أعفان Penicillium و Cephalosporium والبكتريا الخيطية Streptomycesوزيادة انتاج الأنزيمات والأحماض العضوية من أنواع الأعفان لجنس والأحماض الأمينية في بعض أنواع البكتريا.

أختيار العامل المطفر

تقسم العوامل المطفرة الى عوامل فيزيائية وعوامل كيميائية وتعتمد عملية أختيار العامل المطفر أعتماداً كبيراً على قابلية العامل المطفر في أعطاء مدى واسع من السلالات المتطفرة mutants قدر الإمكان وذلك لأجراء عملية الأنتخاب. أن عدد من الطفرات المستحثة ليست نتيجة مباشرة لنوع الضرر damage الذي يسببه العامل المطفر للحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسيجين DNA ولكنها نتيجة لعمليات الإصلاح للحامض النووي منقوص الأوكسيجين المتضرر والتي تقوم بها الخلية وتحولها الى تحويرات ثابته في تعاقب القواعد النتروجينية على جزيئة الحامض النووي منقوص الأوكسجين. والعوامل الوراثية التي تعمل من خلال هذا المسار هي الأشعة فوق البنفسجية والأشعة المؤينة وتجويع الخلية من الثايمين وبعض العوامل المطفرة الكيميائية مثل غاز الخردل. أن المعلومات حول تخصص العامل المطفر على المستوى الجزيئي غير كامله ولكنها تعتمد بصورة كلية على عملية أصلاح الضرر الذي يسببه العامل المطفر، ومن الناحية العلمية قد تصبح السلالات ذات الإنتاجية العالية مقاومه لعوامل مطفرة معينه. لذلك ينصح بالتناوب بين عدد من العوامل المكفرة التي تعمل من خلال أتجاهات فضلاً عن ذلك فأن أستعمال الجرعة الصحيحة من العامل المطفر يمكن أن تزيد من تكرار السلالات المتطفرة المرغوبة من بين المجموع الكلي للخلايا المتطفرة وبذلك يمكن زيادة فرص الحصول على سلالات مرغوبه.

دور الطفرات في تطوير السلالات

- يزيد أجراء عملية الغربلة بعد تعريض السلالة الأبوية الى العوامل المطفرة الكيميائية أو الفيزيائية كثيراً من فرصة العثور على سلالات محسنة. تؤدي عملية التطفير الوراثي للأحياء المجهرية الصناعية الى أنتاج نوعين من المطفرات وهي المطفرات الكبرى والتي تشمل على أنتخاب سلالات متطفرة تظهر تغيراً واضحاً في صفاتها الكيموحيوية ذات الأهمية الصناعية ومثل هذه السلالات تستعمل في الدراسات الوراثية وتعزل هذه السلالات عادة من بين الخلايا الحية المتبقية بعد التعريض لفترة طويله للعامل المطفر. أما الطفرات الصغرى فأنها تبدي تغيراً قليلاً في صفة معينه وتكون هذه التغيرات طفيفة في الغالب بحيث لايمكن تمييز المتطفرات من الناحية المورفولوجية عن السلالات الأبوية. من الأمثلة على الطفرات الكبرى التي أستخدمت لتطوير السلالات هي أنتخاب سلالات غير منتجة للصبغات من العفن Penicillium chrysogenum ذي الإنتاجية العالية من البنسلين.

المبادئ العامة التي تؤخذ بنظر الأعتبار في حالة أستعمال التطفير الوراثي في تحسين سلالات الأحياء المجهرية الصناعية

1 - تكون عادة السلالة التي تنتخب على أساس أظهراها لأختلافات واضحة عن السلالة الأبوية بعد تعريضها للعامل المطفر أقل قابلية في أنتاج المنتوج المرغوب كالمضادات الحيوية.

2 - يكون مقدار الجرعة من العامل المطفر مهماً وتعزل الطفرات الرئيسية من مجموع الخلايا الحية المتبقية بعد التعريض لفترة طويله للعامل المطفر بينما تعزل السلالات ذات الإنتاجية العالية عادة من مجموع الخلايا الحية المتبقية بعد التعريض لجرعة متوسطة من العامل المطفر.

3 - السلالات ذات الإنتاجية العالية من المنتوج المرغوب تشابه السلالة الأبوية من الناحية المورفولوجية ومن ناحية ظروف النمو.

4 - تعطي عملية الأنتخاب خطوة فخطوة زيادة قليلة في الإنتاجية بنسبة (10 - 15) %.

5 - قد تحتاج السلالات المتطفرة الجديدة الى طريقة تكاثر أو حفظ خاصة.

6 - بالرغم من أن السلالة تعطي الصفة المرغوبة وبكمية كافية من المنتوج على النطاق المختبري ولكن هذا لا يعني أن تعطي نفس الشيء على النطاق التجاري.