مصادر الاحياء المجهرية وطرق عزلها وحفظها

تعد الاحياء المجهرية المستخدمة في الصناعة بمثابة المفتاح لنجاح أو فشل عمليات التقنية الحياتية، اذ تكون هذه الاحياء محفزاً في حدوث عملية التخمر .لذا يجب ان تمتاز مزرعة الكائن المجهري بصفات معينة لانتاج المنتوج المرغوب واهم هذه الصفات:

1-يجب ان تكون السلالة ثابتة وراثيا حيث ان المزرعة التي تنتج افراد مغايرة تكون غير مرغوبة.

2-يجب انت تنتج السلالة وبسهولة عدد من الوحدات التكاثرية كالخلايا الخضرية او السبورات او أية وحدات تكاثرية أخرى ،وبما أن الفطريات البازيدية تنتج مايسيليوم فقط فانها لاتستعمل بكثرة في الصناعة.

3-يجب ان تنمو السلالة بغزارة وبسرعة بعد زرعها في خزانات انتاج البادئ قبل بدء عملية التخمر.

4-يجب ان تكون السلالة نقية وليست خالية من الاحياء المجهرية الأخرى فقط بل خالية من اللاقمات (الفاج)phage أيضاً.

5-يجب ان تنتج السلالة منتوج المرغوب في فترة زمنية قصيرة لا تزيد على ثلاثة أيام أو أقل.

6-يجب ان تنتج السلالة المنتوج المرغوب بمعزل عن جميع المواد السامة ويمكن فصله بسهولة عن المنتوجات الأخرى.

7-يجب ان تكون السلالة ذات قابلية على حماية نفسها من التلوث قدر الإمكان مثل تحملها للرقم الهيدروجيني المنخفض او نموها على درجة حرارة مرتفعة او لها القابلية على انتاج مواد مثبطة لاحياء مجهرية أخرى.

8-يجب ان تكون السلالة ذات قابلية على الحفظ لفترات طويلة.

9-يجب ان تكون السلالة ذات قابلية على تقبل التغيرات الوراثية التي تحدثها العوامل المطفرة،لأنه قد يستعمل برنامج تطفير وراثي لتطوير السلالة بهدف زيادة انتاجيتها.

10-يجب ان تعطي السلالة كمية كافية من المنتوج المرغوب في زمن التخمر المحدد.

عزل الاحياء المجهرية الصناعية من المصادر الطبيعية

المصادر الطبيعية الرئيسية للأحياء المجهرية هي التربة ،المياه، الأغذية الطازجة اوالمتخمرة ،الحيوانات او النباتات الحية والمجاري والطريقة المثلى لعزل السلالات هي استعمال المصادر الطبيعية وغالبا التربة تكون غنية بالاحياء المرغوبة .عادة تصمم عملية العزل بحيث تشجع نمو الأنواع التي تحمل الصفة المرغوبة حيث تستعمل الصفة المرغوبة عامل الانتخاب ويصاحبها انتخاب بسيط يميز الأنواع المرغوبة جدا وقد تستعمل الطرق

الانتقائية في عزل الأنواع التي تستطيع النمو في أوساط معينة او تحت ظروف مزرعية معينة والتي لا تسمح بنمو الأنواع الأخرى .

أهم طرق العزل

أ-طرق العزل اتي تستخدم عملية انتخاب الصفة المرغوبة:

1- طريقة المزارع السائلة المدعمة Enriched liquid cultures

يعتمد أساس هذه الطريقة على تشجيع نمو الاحياء المجهرية المرغوبة مقارنة بالاحياء المجهرية الأخرى الموجودة في العينة الاصلية والتي استعملت مصدراً للكائن المجهري المرغوب وتتضمن الطريقة بأخذ عينة من مصادر طبيعية تحتوي على مزيج من الاحياء المجهرية ويتم توفير الظروف الملائمة للانواع المرغوبة وغير الملائمة للانواع الأخرى مثال على ذلك إضافة مادة غذائية مدعمة للوسط الغذائي بحيث يشجع نمو الأنواع أو إضافة مواد مثبطة معينة تثبط الأنواع غير المرغوبة. ويؤدي نمو الأنواع المرغوبة الى تغير الطبيعة الانتخابية للوسط الغذائي وبالتالي يسمح بنمو أنواع أخرى من الاحياء المجهرية وينتج عن ذلك تعاقب نمو وتداخل الاحياء المجهرية ويمكن التغلب على ذلك بالمحافظة على الطبيعة الانتخابية للوسط وذلك بتجديده مرات عديدة أي إعادة الزراعة subculturing على وسط طازج مماثل وقد تتم عملية التجديد لمرات عديدة قبل العزل النهائي وان توقيت عملية التجديد يعد مهما جدا ويجب ان يتوقف مع الفترة التي يصبح بها نمو الكائن المجهري المرغوب سائدا.

2- طريقة الأوساط الغذائية المتصلبة (الاطباق)

أستعملت هذه الطريقة في عزل الاحياء المجهرية المنتجة لأنزيمات معينة حيث تستعمل أوساط غذائية انتقائية Selective media تحتوي على المادة الغذائية Substrate التي يعمل عليها الانزيم المرغوب والتي تشجع نمو أنواع الاحياء المجهرية المنتجة للانزيمات فقط.

ب – طرق العزل التي لا تستعمل عملية انتخاب الصفة المرغوبة

لا يعطي انتاج بعض المنتجات المرغوبة أية ميزة انتخابية للكائن المجهري المنتج بحيث يمكن الاستفادة منها في عملية العزل لذلك تعزل هذه الاحياء المجهرية عادة عشوائيا وقد طورت طرق غربلة سريعة للكائن المجهري المعزول الذي يحمل الصفة المرغوبة مثل انتاج المضادات الحيوية ومنظمات النمو والاحماض الامينية والنيوكليوتيدات ويفضل في هذه الحالة ان يكون الوسط الغذائي الذي تنمى عليه العزلة قبل اختبارها من النوع الذي يعطي اقصى تعبير عن الصفة الوراثية المرغوبة التي تحملها العزلة.

واهم هذه الطرق :

1- الغربلة الخاصة بالاحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية

يمكن الكشف عن الفعالية المضادة للاحياء المجهرية بتنميتها على وسط متصلب (آكار) وبوجود كائن مجهري آخر يتأثر بالمادة المضادة او حساس اتجاهها والذي لا ينمو في حالة انتاج تلك المادة من قبل الكائن المجهري المنتج كما يمكن استخدام طريقة أخرى وهي تنمية الكائن المنتج في وسط زرعي سائل يتم الكشف عن المادة المضادة في راشح المزرعة الخالي من الخلايا.

2- الغربلة الخاصة بالاحياء المجهرية المنتجة لعوامل النمو

يعد انتاج عوامل النمو مثل الاحماض الامينية و النيوكلويتدات من الصفات التي يصعب معها استخدام الصفة الانتقائية في العزل لذلك عزلت الاحياء المجهرية المنتجة لهذه المواد عشوائيا ومن ثم يتم الكشف عن الاحياء المجهرية المنتجة باستخدام اختبارات الغربلة يعتمد الكشف عن الاحياء المجهرية المنتجة لعوامل النمو على تحفيز نمو السلالات الاكسوتروفية Auxotrophic (وهي السلالات المتطفرة التي ينقصها انتاج عامل نمو معين) للكائن المجهري المنتج لعوامل النمو وتتلخص خطوات الكشف عن الاحياء المجهرية المنتجة للاحماض الامينية بما يلي :

ان اغلب الاحياء المجهرية المنتجة للاحماض الامينية هي تابعة لاجناس بكتريا Arthrobacter Microbacterium , Brevibacterium , Micrococcus , Corynebacterium لذا يتم في البداية استبعاد الفطريات خلال عملية العزل وذلك باضافة مادة مضادة لنمو الفطريات مثل مادة سايكلوهكسامايد Cyclohexamide الى الوسط الغذائي المستخدم في عملية العزل وتتم هذه العملية على وسط صلب وذلك لان عملية الغربلة الاولية نوعية وليست كمية ثم تعاد زراعة الاطباق التي تحتوي 30-50 مستعمرة على وسط غذائي صلب يحتوي على مكونات مغذية تدعم انتاج الاحماض الامينية وتتم التنمية لمدة 2-3 ايام ثم يتم قتل المستعمرات المتكونة بالاشعة فوق البنفسجية بعد ذلك يتم تغطية الوسط بوسط غذائي صلب آخر يحتوي على معلق من السلالة الاكسوتروفية للمنتوج المرغوب ثم تتم التنمية لمدة 16 ساعة عند درجة حرارة 37مْ ظهور هالة حول المستعمرات المقتولة والمنتجة للحامض الاميني دلالة على نمو السلالة الاكسوتروفية اي وجود الحامض الاميني. يمكن عزل الكائن المجهري المنتج بعد ذلك من الاطباق الاصلية التي اعيدت زراعتها ويمكن اجراء الغربلة الكمية بتنمية الكائن المجهري في مزراع في سائلة لتقدير كمية الحامض الاميني المنتج في راشح المزرعة الخالي من الخلايا.

3- الغربلة الخاصة بالاحياء المجهرية المنتجة للسكريات المتعددة

يتم عزل عدد من الاحياء المجهرية المنتجة للسكريات المتعددة الخارجية exopolysaccarides مثل الاصماغ من مصادر مختلفة ويصعب استخدام هذه الصفة كعامل انتقائي في عملية العزل وقد اقترح عزل هذه من بعض المخلفات الصناعية الكاربوهيدراتية لكونها غنية بالاحياءالمنتجة لتلك المادة. يتم تنمية هذه الاحياء على اوساط غذائية مناسبة والتي من خلالها يتم التعرف على الكائن المنتج من المظهر الهلامي للمستعمرات ثم تنمى في مزارع سائلة لاجراء غربلة كمية لتقدير كمية السكريات المتعددة المنتجة.

حفظ الاحياء المجهرية المهمة صناعيا

تعد عملية عزل الاحياء المجهرية المهمة صناعيا مكلفة وتحتاج الى وقت طويل لذا يجب المحافظة على هذه الاحياء لكي تبقى محافظة على الصفات التي عزلت من اجلها الى ذلك يجب ان تبقى مزرعة الكائن المجهري المستخدم في الصناعة حية وخالية من التلوث لذا يجب حفظها بطريقة تحافظ عليها من التغير وتحميها من التلوث وتحافظ على حيويتها ان الكائن المجهري قد يبقى حيا عند اعادة زراعته على وسط غذائي طازج ولكن هناك احتمال لحدوث طفرة وراثية عند كل انقسام خلوي وبما ان اعادة الزراعة المتكررة تتضمن انقسامات خلوية متعددة لذا فان هناك احتمال حدوث انحلال السلالة (**تغير في صفاتها الوراثية Strain degeneration**) أضافة الى تعرض السلالة لمخاطر التلوث لذا فان طرق حفظ الاحياء المجهرية الصناعية تلعب دورا مهما في التقنية الحياتية سواء للاغراض الانتاجية اوالبحثية

يوجد نوعان من المزارع الميكروبية الصناعية

1- مزارع العمل المخزونة Working stock cultures

وتستعمل هذه المزارع باستمرار في الصناعة ويجب ان تحفظ في حالة نمو كثيفة غير ملوثة وعادة تحفظ على هيئة مزارع آكار مائلة agar slant او مزارع موخوزة stab cultures اومعلق سبوري او مزارع سائلة broth cultures وتحت ظروف التبريد ويجب فحص هذه المزارع دورياً لمعرفة صفات نموها وتغذيتها وقابلية انتاجها ومدى تلوثها.

2- المزارع الاولية المخزونة Primary stock cultures

تحفظ هذه المزارع لاستعمالها خزنيا لعمليات تخمر جديدة او لاغراض المقارنة او الفحوصات البايولوجية او في مزارع العزل والغربلة ولاتحفظ هذه المزارع في حالة فسيولجية عالية. تجري عملية النقل من هذه المزارع في حالة الحاجة الى مزارع العمل فقط او عند اعادة زراعة المزارع الاولية لمنع هلاكها لذا تخزن بحيث تحتاج الى اقل عدد من مرات النقل خلال فترة زمنية معينة وان موت نسبة عالية من خلايا المزارع الاولية لايشكل خطورة كبيرة اذ يمكن اعادة زراعة الخلايا المتبقية في وسط غذائي جديد.

اهم طرق حفظ مزارع الاحياء المجهرية

1- الخزن على الاكار المائل Agar slant

يمكن حفظ المزارع النامية على وسط غذائي مناسب يحتوي على الاكار وبصورة مائلة عند درجة حرارة الثلاجة 5 م او التجميد(-20) م وتعاد زراعتها كل ستة اشهر تقريبا واحيانا كل سنة في حالة تغطية المزرعة بزيت معدني معقم مثل زيت البارفين اذ تجهز طبقة الزيت الاوكسجين المذاب للكائن المجهري وتمنع في الوقت نفسه جفاف الاكار وبذلك تقل الفعالية الحيوية للكائن المجهري.

2- خزن السبورات في الماء Storage of spores in water

يمكن حفظ سبورات الاعفان في الماء وذلك بتحضير معلق السبورات في ماء معقم وتحفظ بالثلاجة عند درجة حرارة 5 م وهذه الطريقة ذات استعمال محدود.

3- الحفظ بالنتروجين السائل Nitrogen storage under liquid

يمكن تقليل الفعالية الحيوية للاحياء المجهرية بصورة كبيرة وذلك بحفضها بدرجة حرارة واطئة جداً **(-150) الى (-196)** ويمكن الوصول اليها باستخدام ثلاجات النتروجين السائل . تتضمن هذه الطريقة تنمية الكائن المجهري على وسط غذائي مناسب ثم تعلق الخلايا في عامل يحفظها من الانجماد مثل **10%** كليسرول ثم يوضع المعلق في أنابيب زجاجية صغيرة (أمبولات) وتقفل قبل حفظها تحت النتروجين السائل ويمكن الحصول على نتائج أفضل بتجميد المعلق ببطئ قبل الخزن والتذويب بسرعة عند استرجاع المزرعة ويحدث بعض الفقد في حيوية الخلايا أثناء التجميد ويقل الفقد أثناء الخزن لذلك يمكن الحفاظ على حيوية الخلايا لأشهر عديدة وأهم سلبيات هذه الطريقة هي الكلفة العالية في المحافظة على درجات الحرارة الواطئة جداً والخطر الناتج من عطب الجهاز.

4- الخزن في التربة In soil storage

يمكن تلقيح التربة المزيجية والمعقمة بالكائن المجهري المراد حفظه وتحضن عدة أيام في درجات الحرارة المناسبة وبعد النمو تجفف المزرعة بدرجة حرارة الغرفة لمدة اسبوعين ثم تحفظ في جو جاف ويفضل أن تحفظ بالثلاجة. وتستخدم هذه الطريقة بكثرة في حفظ الاعفان والبكتريا الخيطية وقد وجد انه عند حفظ **1800** مزرعة من البكتريا الخيطية بالتربة فان حوالي **50%** منها احتفظت بحيويتها بعد مرور **20** سنة من الخزن.

5- التجفيد Freeze - Drying

تتضمن هذه الطريقة تجميد مزارع الاحياء المجهرية ثم تجفيفها تحت التفريغ اذ يتسامى الماء الموجود في الخلايا. تتم الطريقة بتنمية المزارع عادة في وسط غذائي ملائم ثم تعلق الخلايا في مادة تحافظ عليها مثل الحليب الفرز أو بلازما الدم أو كلوتامات الصوديوم أوالببتون أوالسكر، توضع عدة قطرات من المعلق في أنابيب زجاجية صغيرة (أمبولات) ثم تجمد وتوضع تحت تفريغ عال حيث يتسامى الماء ثم تقفل الامبولات وقد تحفظ بالثلاجة وبذلك تبقى محافظة على حيويتها لمدة عشر سنوات أو أكثر. وتعد هذه الطريقة من أكثر طرق الحفظ شيوعاً ويمكن استخدامها مع أنواع عديدة من الاحياء المجهرية.