اعداد اللقاح (البادئ) Inoculum preparation

هناك صفات يجب ان تتوفر في المزارع التي تستعمل في تحضير اللقاح التي منها:

1- ان تكون المزرعة سليمة وبحالة نشطة وذلك لتقليل مدة طور الركود في عمليات التخمر اللاحقة.
2- تحضيرها يكون بحجم كافي ومناسب من اللقاح لاكمال عملية الانتاج.
3- ان تكون صفاتها ملائمة ومثالية وخالية من التلوث.
4- ان تحافظ على قابليتها في انتاج المنتوج طيلة فترة الانتاج الحيوي.

ان الاهمية في اكمال اللقاح ليكون مثاليا في اتمام عملية الانتاج الحيوي هو في اختيار الوسط الغذائي المناسب لتحضير اللقاح. لذلك فانه قد يختلف الوسط الغذائي المستعمل في انتاج اللقاح عن الوسط المستعمل في انتاج المنتج الايضي المرغوب. ان فترة الركود المتمثلة في طور الركود Lag phase تقل كثيرا في عملية انتاج المنتج المرغوب عند انتاج اللقاح في وسط غذائي يشابه الوسط المستعمل في مرحلة انتاج المنتج المرغوب. ذلك يعود الى ان هذه الحالة تسبب في تقليل الفترة الزمنية التي يحتاجها الكائن المجهري الصناعي للتاقلم في الوسط الغذائي المستعمل في الانتاج وبذلك يختزل طور الركود وكذلك زمن التخمر بشكل كامل.

تتراوح كمية اللقاح اللازمة لتلقيح وسط الانتاج بين **3 الى 10%** من حجم وسط الانتاج. لذلك يجب ان تجرى عملية اعداد اللقاح من المزرعة الاصلية في مراحل عدة للحصول على كمية كافية من اللقاح ضمن النسبة المشار اليها لاستعماله في مرحلة الانتاج في اجهزة التخمر ويعتمد ذلك كليا الى حجم اللقاح النهائي الذي سيستعمل في تلقيح وسط الانتاج.

ان مراحل التنشيط التي يمر بها الباديء تتراوح بين **3 الى 5 مراحل** للحصول على الحجم النهائي من اللقاح، و**ان زيادة مراحل التنشيط يمكن ان تسبب في تلوث مزرعة اللقاح او انها تسبب في مخاطر حصول تغير في صفات السلالة او انحلالها وراثيا**... لذلك دائما يجب التوفيق بين حجم اللقاح المستعمل ومخاطر التلوث وتغير السلالة.

ان تحضير اللقاحات من انواع الاحياء المجهرية يختلف تبعا لكل منها وكما يلي:

تحضير لقاح الخمائر

ان اهم العمليات الحيوية التي تشترك فيها الخمائر هي في انتاج الكحول او انتاج الكتلة الحيوية. يحضر اللقاح من الخمائر على مراحل عدة تتم المراحل الاولى من تحضير اللقاح تحت ظروف التعقيم لتقليل التلوث خلال مراحل النمو الاولى، اذ يتم في تحضير لقاح الخميرة لانتاج خميرة الخبز تحضير اللقاح في المرحلتين

الاولى والثانية تحت ظروف التعقيم بينما تتم بقية المراحل في اوعية التخمير المفتوحة. يمكن ان يرجع السبب في ذلك الى امكانية حصول التلوث خلال مراحل التخمير الاولية بينما يتعذر حصولة في المراحل اللاحقة وذلك لحصول السيادة من قبل الخميرة في وسط التحضير وكذلك للكلفة الاقتصادية لاعداد ظروف التعقيم في المراحل الثلاثة الاخيرة من اعداد اللقاح لاسيما في حالات الانتاج التجاري بكميات كبيرة.

تحضير لقاح البكتريا

ان الهدف الرئيس في اعداد لقاح البكتريا هو في انتاج لقاح نشط يعطي طور ركود قصير قدر الامكان للاستفادة من ذلك في ثبات الميكروب الصناعي في مرحلة التخمر اللاحقة. حيث ان طور الركود الطويل يكون تاثيره ليس في اضاعة وقت التصنيع فحسب بل انه يسبب في استهلاك جزء من الوسط بدون حصول الانتاج. لذلك فان طول مدة الركود للكائن المجهري تتاثر دائما بحجم اللقاح المستعمل وظروف اعداده الفسيولوجية حيث يفضل ان تكون مزرعة اللقاح المحضر في بداية طور النمو اللوغاريمي كي تكون نشطة بصورة كافية للوصول الى حالة الانتاج المطلوبة. لكل ماتقدم فان مرحلة نمو اللقاح تعد ذا اهمية اذ ان البكتريا المكونة للسبورات تتجهه الى تكوين سبوراتها في نهاية الطور اللوغاريتمي الذي يؤدي في حالة استعماله كلقاح في اطالة طور الركود لمراحل الانتاج الحيوي اللاحقة.

كمثال على تحضير لقاح من بكتريا Bacillus subtilis لانتاج المضاد الحيوي Bacitracin فان اللقاح البكتيري ينمى في مرحلتين الاولى لمدة 48 ساعة في وسط سائل ثم ينقل الى جهاز التخمر الخاص بالتنشيط في نفس الوسط الزرعي المستعمل للتنمية وتعاد عملية تنشيطة لخمسة مرات قبل ان يستعمل في الانتاج الحيوي النهائي. كما يمكن التخلص كليا من فترة الركود عند تحضير مزارع اللقاحات وذلك في استعمال الوسط الغذائي لتحضير اللقاح نفسه المستعمل في عملية الانتاج.

تحضير لقاح الاعفان

يعد تحضير لقاح الاعفان بانه الاكثر شيوعا من انواع الاحياء المجهرية الصناعية الاخرى كالبكتريا والخمائر وذلك لاستعمالاته المتعددة في التكنلوجيا الحيوية، وغالبا مايتم تحضير معلق السبورات من الاعفان كونها الطريقة الرئيسة في تكاثرها. وتوجد ثلاث اليات لتحضير لقاحات السبورات من الاعفان هي:

1. **انتاج السبورات على الاوساط المتصلبة:** تعد بانها الطريقة الاكثر استعمالا اذ ان اغلب الاعفان تنتج سبوراتها على الاوساط المتصلبة بالاكار ويفضل لذلك توفير مساحة سطحية كافية لتكوين السبورات. غالبا ماتستخدم طريقة القناني الاسطوانية Roll bottle لتحضير معلق السبورات التي تتضمن استعمال 300 مل من

الوسط الغذائي في القنينة الاسطوانية الواحدة ذا حجم لتر واحد وبعد التعقيم باستعمال حرارة 121 ° م لمدة 15 دقيقة يتم تبريدها الى 45 ° م ثم تدور القنينة على اسطوانة متحركة ليتكون غلاف اسطواني من الوسط الغذائي مع الاكار داخل القنينة. بذلك تكون جاهزة للتلقيح بسبورات الاعفان ثم التحضين عند حرارة 25 ° م لمدة 7 ايام. من مميزات هذه الطريقة هي اعطاء مساحة سطحية كبيرة لتنمية السبورات.

2. **انتاج السبورات على الاوساط الصلبة:** بعض الاعفان لها القابلية في انتاج سبوراتها على الاوساط الصلبة بكميات وفيره التي تعد طريقة اقتصادية وسهلة لانتاجها. تعد حبوب الشعير والذرة المجروشة ونخالة الحنطة اوساطا غذائية ملائمة لانتاج سبورات العديد من الاعفان. ان العامل الموثر الرئيس في انتاج السبورات في هذه الطريقة هو الرطوبة النسبية لوسط الانتاج والتي يجب ان تكون عالية لتكون مناسبة لانتاجها من الاعفان. ان الية الانتاج تكون من خلال وزن 200 غم من الحبوب المشار اليها في دورق حجمي سعة 3 لتر وبعد التلقيح بالعفن وتعديل نسبة الرطوبة الى 68% تتم التنمية عند حرارة 28 ° م لمدة 7 ايام... ان كمية السبورات المنتجة في هذه الطريقة تكون اربعة اضعاف كمية السبورات المنتجة بالطريقة السابقة.

3. **انتاج السبورات في المزارع المغمورة:** ان بعض حالات انتاج اللقاح باستعمال سبورات الاعفان تستعمل معها طريقة سبورات الاعفان المغمورة التي تستعمل معها اوساط غذائية مناسبة لها وكما في انتاج المضاد الحيوي Griseofulvin الذي ينتجه العفن *Penicillium patulum* حيث يستعمل وسطا غذائيا مكون من مسحوق الشرش والاملاح المعدنية للبوتاسيوم والكالسيوم اضافة الى المواد الصلبة لمنقوع الذرة. يستعمل معلق السبورات الناتج من طريقة التنمية بنسبة 10% من وسط الانتاج الحيوي. يكون اللقاح محجوزا في داخل الوسط باستعمال اغشية ملائمة توفر تلامس دائم بين السلالة الفطرية المكونة للقاح ومكونات الوسط الغذائي المستعمل في التنمية.

تحضير اللقاح الخضري من الاعفان

ان بعض الاعفان ليس لديها القدرة في انتاج السبورات اللاجنسية لذلك يصار الى تحضير اللقاح الخضري من مايسليوم هذه الاعفان. كما في تحضير لقاح العرهون والعفن *Gibberella fujikuroi* الذي يستعمل في انتاج منظم النمو الجبريلين... ان طريقة الانتاج تتضمن تنمية مزرعة الاعفان على انابيب وسط اكار البطاطا والدكستروز PDA لمدة اسبوع عند درجة حرارة 25 ° م ثم تنقل محتويات الانابيب الى وسط سائل مناسب للنمو وتحضن مزرعة اللقاح عند 28 ° م لمدة 72 ساعة مع التهوية. وبذلك يكون جاهزا لتلقيح مزرعة الانتاج حيث يكون عبارة عن مايسليوم لسلالة العفن المستعمل في الانتاج الحيوي.

ان من اهم الصعوبات في استعمال لقاح المايسليوم الخضري هو في صعوبة الحصول على لقاح متجانس وقياسي. ويمكن التقليل من عدم التجانس في امرار المايسليوم الخضري في جهاز تجنيس قبل استعماله كلقاح الذي يسبب في تجزئة المايسليوم بقطع يمكن ان تكون متساوية فضلا عن انها تزيد اعداد الوحدات التكاثرية لان اجزاء المايسليوم تتكاثر وتنمو الى عفن عند وجود الوسط الغذائي المناسب للنمو.