عزل وحفظ الاحياء المجهرية الصناعية

تعد الاحياء المجهرية بانها المفتاح الاساسي في نجاح او فشل العمليات التصنيعية الحيوية وذلك لانها المحفز والعامل الذي يتحكم في حدوث عملية التخمر واكمالها ومن ذلك فان الحالات التي تكون فيها غير مثالية ستؤدي الى فشل العملية التصنيعية بكاملها.

مما تقدم وللاهمية المشار اليها فان مزرعة الكائن المجهري يجب **ان تمتلك صفات** معينة كي تكون فعالة في انتاج المنتوج المرغوب التي منها:-

1. ان تكون السلالة من الاحياء المجهرية الثابتة وراثيا.
2. ان تتمكن السلالة وبسهولة من انتاج الوحدات التكاثرية كالخلايا الخضرية او السبورات في ظروف بيئية ومتطلبات غذائية بسيطة.
3. ان تكون السلالة نقية وذا قابلية في مقاومة العاثيات البكتيرية (Phages).
4. ان تنتج السلالة المنتوج المرغوب بمعزل عن جميع المواد السامة، وتمكين فصل المنتوج المرغوب بسهولة عن المنتجات الاخرى.
5. ان تكون السلالة ذات قابلية في حماية نفسها من التلوث قدر الامكان وتاتي هذه من خلال امكانية نموها في ظروف من درجة الحرارة او مستوى من الاس الهيدروجيني مختلفا عن الانواع الميكروبية الاخرى.
6. يجب ان تعطي السلالة المايكروبية كمية من المنتوج المراد انتاجه تكون كافية اقتصاديا في زمن التخمر المحدد.

عزل الاحياء المجهرية الصناعية من المصادر الطبيعية

ان من اهم المصادر الطبيعية والرئيسية لعزل الاحياء المجهرية الصناعية هي التربة والمياه ومياه الفضلات والاغذية الطازجة والمتخمرة والحيوانات والنباتات الحية اذ يتم عزل الاحياء المجهرية التي تستخدم في التكنلوجيا الحيوية حسب صفاتها وقابليتها على النمو في الاوساط الغذائية المنماة عليها. غالبا ما يتم تصميم عمليات العزل بحيث تشجع نمو الانواع الميكروبية التي تحمل الصفة المرغوبة لانتاج المادة الايضية المطلوبة، وبذلك فان الصفة المرغوبة تكون في هذه الحالة عامل انتخاب لتلك الاحياء المجهرية ثم تستكمل الاختبارات اللازمة للوصول الى النوع المرغوب بشكل نقي.

اما في الحالات الاخرى التي لاتكون فيها الصفة المرغوبة عامل محدد للعزل والتنقية فان الطرائق التقليدية في العزل والتشخيص للوصول الى نوع الكائن المجهري المطلوب عزله لاستخدامه في التصنيع الحيوي تكون هي المعتمدة في العزل والتنقية.

ان من اهم طرائق العزل هي:-

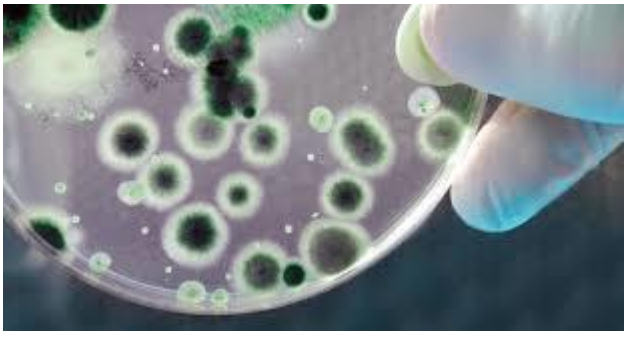
أولا:- طرائق العزل التي تعتمد الصفة المرغوبة في عملية الانتخاب

1- طريقة المزارع السائلة المدعمة

اساس هذه الطريقة هو تشجيع نمو الاحياء المجهرية المرغوبة من بين الاحياء المجهرية الاخرى الموجودة في العينة المصدر، وتتضمن هذه الطريقة في اخذ عينة من المصادر الطبيعية التي تحتوي على مزارع الاحياء المجهرية وتوفير الظروف الملائمة للانواع المرغوبة منها باضافة مادة مدعمة الى الوسط الغذائي السائل لتشجيع نمو الكائن المرغوب في العزل او اضافة مادة الى الوسط الغذائي لتثبيط نمو الاحياء المجهرية غير المرغوبة للوصول الى عزل النوع من الاحياء المجهرية المطلوب عزلها بشكل نقي.

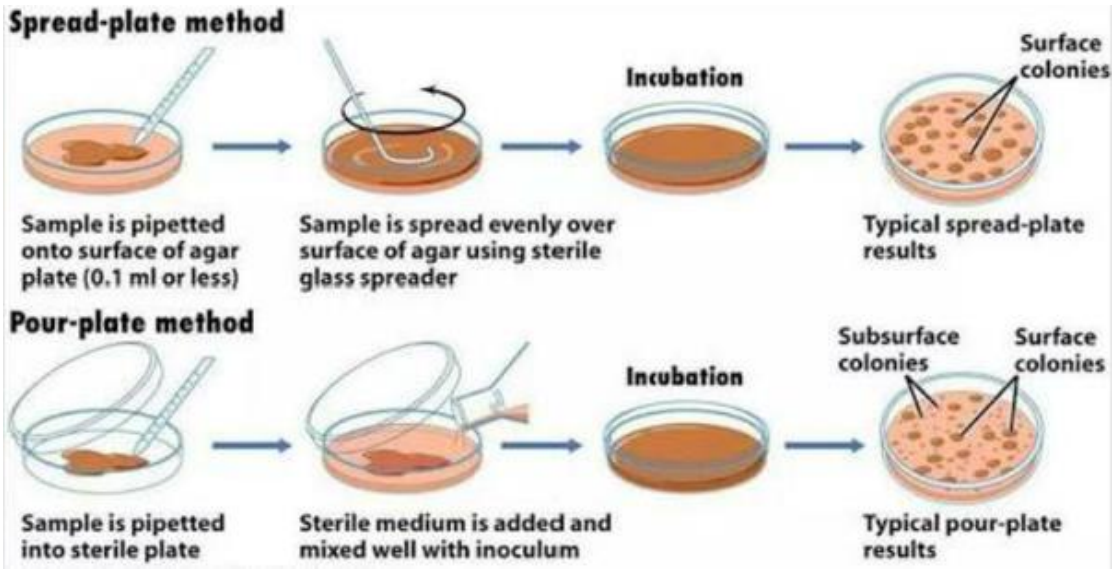
2- طريقة الاوساط الغذائية المتصلبة

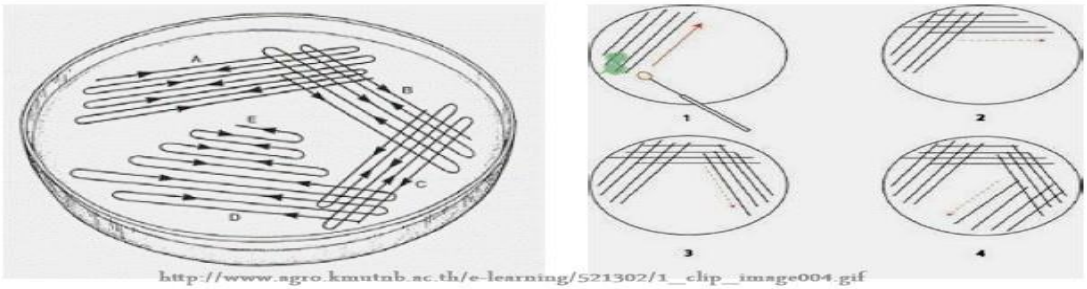
تستعمل هذه الطريقة من خلال التنمية للاحياء المجهرية المراد عزلها على الاوساط المتصلبة بالاكار وغالبا عندما يراد عزل الاحياء المجهرية المنتجة للانزيمات حيث تستعمل معها اوساط غذائية انتقائية Selective media تحتوي على المادة الخاضعة التي يعمل عليها الانزيم المرغوب وبذلك فان انواع الاحياء المجهرية المنتجة للانزيم المرغوب تكون فقط هي القادرة على النمو، وتتثبط الانواع الاخرى لان الوسط الغذائي سوف لايوفر لها المكونات الملائمة للنمو.



ثانيا:- طرائق العزل التي لا تعتمد الصفة المرغوبة في عملية الانتخاب:-

تستعمل هذه الطريقة عندما تكون عملية انتاج بعض المنتجات المرغوبة لا يعطي اية ميزة انتخابية للكائن المجهري المنتج ولذلك تستخدم في هذه الحالة طريقة العزل التقليدية للحصول على الاحياء المجهرية من خلال استعمال طريقة النشر Spread-plate method او طريقة الطبق المصبوب Pour-plate method او التخطيط Streaking method.





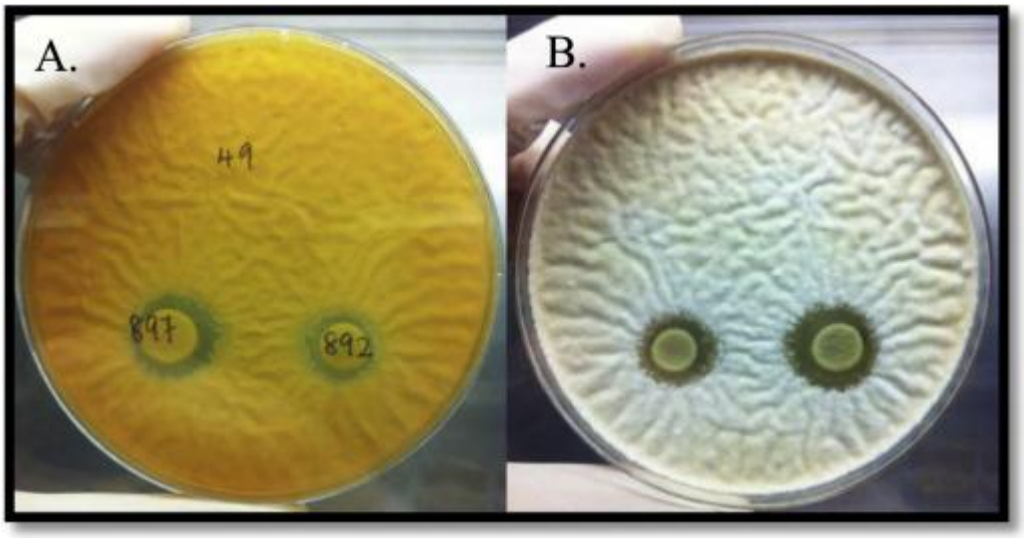
http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/1_clip_image004.gif
www.protocol-online.org/.../posts/22612.html

يتم بعدها التشخيص اعتمادا الى الصفات المحددة التي يمتلكها كل كائن واختلافاته عن الكائنات الاخرى فيها والتي تشمل الصفات الظاهرية والمجهرية والصفات المزرعية والكيموحيوية التي من خلالها يتم الحصول على الكائن المجهري الذي يحمل الصفة المرغوبة بشكل نقي ثم تحدد قابلية

انتاجه الكمية واختيار العزلة الاكثر انتاجا من النوع الواحد. ان الطرائق المشار اليها يمكن استعمالها في اتجاهات متعدده منها:-

1- عزل الاحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية

يتم الكشف عن الفعالية المضادة للاحياء المجهرية من خلال تنمية الكائن المجهري المنتج للمضاد الحيوي على وسط غذائي متصلب واختبار قابلية انتاجه للمضاد الحيوي بتنمية كائن مجهري اخر يكون حساسا لهذا المضاد، وبذلك فان حصول التثبيط لكائن الاختبار تكون دليلا على قدرة كائن الانتاج في انتاجه للمضاد الحيوي.



2- عزل الاحياء المجهرية المنتجة لعوامل النمو

ان انتاج عوامل النمو كالاحماض الامينية والنيكلوتيدات من الاحياء المجهرية تعد من الصفات التي يصعب معها استخدام الصفة الانعكاسية في العزل، اذ يتم في هذه الطريقة عزل الاحياء المجهرية المنتجة لهذه المواد بالطرائق التقليدية اعتمادا الى صفاتها ومن ثم استخدام الغربلة بين عزلات نفس النوع للحصول على العزلة الاكثر انتاجا من بينها.

3- عزل الاحياء المجهرية المنتجة للمواد السكرية المتعددة

يتم عزل الاحياء المجهرية المنتجة للسكريات المتعددة من مصادرها المختلفة اذ لا يمكن استعمال هذه الصفة كعامل انتقائي في عملية العزل، وغالبا ما تعزل انواع الاحياء المجهرية من المواد الكاربوهيدراتية بوصفها مواد تنمو عليها تلك الانواع. يتم العزل لتلك الانواع من الاحياء المجهرية من خلال تنميتها على الاوساط الغذائية الصلبة ثم عزلها وتنميتها في مزارع سائلة للتعرف على صفة انتاج المواد السكرية فيها.

حفظ الاحياء المجهرية الصناعية:-

نظرا لكون عمليات عزل الاحياء المجهرية المهمة صناعيا تكون ذات تكلفة عالية وتحتاج الى وقت طويل فان المحافظة عليها من الهلاك والحفاظ على الصفات المرغوبة التي عزلت من اجلها وكذلك ابعادها من التلوث، تعد من الاساسيات في منع فشل عمليات التصنيع الحيوي حيث ان حصول خلل في تغذية الكائن المجهري قد يؤدي الى حدوث طفرات وراثية في جينات الكائن المجهري الصناعي او حدوث انحلال في سلالته فضلا عن التعرض لمخاطر التلوث الاخرى. لذلك فان عمليات حفظ هذه الاحياء يعد مهما في العمليات التطبيقية الحيوية وان مزارع الاحياء المجهرية الصناعية عادة ما تكون على نوعين:-

1. مزارع الحفظ قصير الاجل Short time storage cultures: -

يستعمل هذا النوع من المزارع باستمرار في الانتاج الحيوي اذ يجب ان تكون في حالة نمو كثيفة وغير ملوثة وعادة ما تحفظ بهيئة مزارع اكار مائلة Agar slant cultures ومزارع ثابتة stab culture او بشكل معلق سبورات او بحالة مزرعة سائلة، وان حفظ هذا النوع من المزارع يكون عند حرارة الثلاجة 4°م كما يجب فحص هذه المزارع باستمرار للتأكد من نشاطيتها.

2. مزارع الحفظ طويل الاجل Long time storage cultures: -

تحفظ هذه المزارع لاستعمالها خزينا لعمليات تخمر جديدة او في الفحوصات البيولوجية للمقارنة ولا يتم حفظها في حالة فسيولوجية نشطة، اذ يتم تحضير مزارع الاحياء المجهرية منها في حالة الحاجة الى مزارع عمل او عند اعادة زراعتها لمنع هلاكها، لذلك يجب حفظها بطريقة تحتاج اقل عدد من النقلات خلال فترة زمنية معينة.

ان من اهم طرائق حفظ مزارع الاحياء المجهرية الصناعية هي الاتي:-

1- الخزن على الاكار المائل Agar slope

يتم في هذه الطريقة حفظ الكائن المجهري على وسط غذائي مناسب يحتوي على الاكار بصورة مائلة عند حرارة 4 م° او 20 م° وتعاد زراعتها كل 6 اشهر تقريبا وعند استخدام الزيت النقي مثل البارافين او الكليسرول في تغطية المزرعة فانه يمكن حفظها عند (-20 م°) وان الحاجة الى اعادة تنشيط المزرعة قد تتحمل لمدة سنة كاملة او اكثر. اذ ان طبقة الزيت المضافة تعمل في تقليل تجهيز الكائن المجهري بـ O_2 وتمنع في الوقت نفسه من جفاف الاكار وبالتالي تقلل الفعالية الحيوية للكائن المجهري لذلك تزداد مدة حفظها.

2- خزن السبورات في الماء Storage of spore in water

تعد هذه الطريقة محدودة الاستعمال اذ يتم فيها تحضير معلق السبورات في الماء المعقم والحفظ عند درجة حرارة 5م°.

3- الحفظ باستخدام N_2 السائل Storage under liquid nitrogen

يتم في هذه الطريقة تقليل الفعالية الحيوية للاحياء المجهرية عند حفظها على درجة حرارة واطئة بين (-150 الى -196م°) وذلك باستخدام ثلاجات N_2 السائل. تتم هذه الطريقة من خلال تنمية الكائن المجهري ثم تعليق خلاياه في محلول حافظ من الانجماد (10% كليسيرول) يوضع المعلق بعدها في انابيب زجاجية صغيرة مقفولة وتحفظ في N_2 السائل. وللحصول على نتائج مضمونة فانه يفضل تجميد المعلق ببطء قبل الخزن، وكذلك مراعاة التذويب السريع عند

استرجاع المزرعة، ومن عيوب هذه الطريقة هي الكلفة العالية في المحافظة على درجات الحرارة المنخفضة باستمرار.

4- الخزن في التربة Storage in Soil:-

تستخدم هذه الطريقة غالبا في حفظ الاعفان والبكتريا الخيطية، حيث يتم فيها تلقيح التربة المزيجية والمعقمة بالكائن المجهري المراد حفظه والتحضن عدة ايام في الدرجة الحرارية المناسبة وبعد اكتمال النمو تحفض المزرعة بدرجة حرارة الغرقة لمدة اسبوعين ثم في الثلاجة، وقد تطول مدة حفظ الاحياء المجهرية بهذه الطريقة لاكثر من 20 سنة.

5- التجفيد Freeze-drying:-

تتضمن هذه الطريقة تجميد مزارع الاحياء المجهرية ثم تجفيفها تحت التفريغ حيث يتم تسامي الماء الموجود في الخلايا. وتتم هذه الطريقة بعد تنمية المزارع في وسط غذائي مناسب ثم تعلق الخلايا في مادة تحافظ عليها مثل حليب الفرز او بلازما الدم او كلوتومات الصوديوم او الببتون او السكر ويتم وضع عدة قطرات من المعلق في امبولات ثم تجمد وتوضع تحت تفريغ عالي حتى اكمال التسامي ثم تقفل الامبولات. يفضل ان تحفظ الامبولات في الثلاجة للمحافظة على حيويتها لعدة سنوات.

Vials of freeze-dried product

The product in the "Poor" vials has become soft and dense during freeze-drying, because it has become warmer than its "Critical Temperature"

السيطرة النوعية على المزارع المحفوظة Quality control of preserved cultures

فيها يتم التأكد من كفاءة طريقة الحفظ من خلال التعرف على نوعية المزارع المحفوظة بغض النظر عن طريقة الحفظ المستعملة حيث يجرى فيها الفحص الروتيني لكل وجبة جديدة من المزارع المحفوظة للتاكد من نوعيتها. وتجري عادة اعادة زراعة 3% من الامبولات والانابيب من كل وجبة معدة للحفظ للتاكد من النقاوة والانتاجية والحيوية واذا اعطت المزرعة نتائج سلبية فانه يتم اتلاف جميع امبولات الوجبة المعدة، وبهذا يمكن المحافظة على المزرعة واستخدامها بثقة نتيجة لاتباع نظام السيطرة النوعية.