عزل وانتخاب السلالات المستخدمة في التقنيات الاحيائية

تعزل الاحياء المجهرية المستخدمة في البايوتكنولوجي (البكتريا Bacteria ،الفطريات Fungai وتشمل الخمائر Yeasts والاعفان Molds ،الطحالب Algae ،البكتريا الخيطية Actinomycetes) من مصادر مختلفة وتعد التربة من اهم تلك المصادر.

طريقة جمع عينات التربة Soil sampling :

1- تؤخذ العينة باستعمال ملعقة نظيفة بعد قشط (1) سم من سطح التربة وبعمق يتراوح بين (5-10) سم.
2- كمية العينة المأخوذة نحو (500)غم.
3- توضع في كيس معقم وتسجل عليه كافة المعلومات.
4- تنقل الاكياس الى المختبر لاجراء الدراسات عليها.

في حال عدم امكانية فحصها مباشرة تحفظ في الثلاجة.

وهناك عدة تقنيات لعزل وانتخاب السلالات البكتيرية المهمة في انتاج المواد المختلفة كالانزيمات والمضادات الحيوية وعوامل النمو كالفيتامينات والاحماض الامينية وغيرها ، ومن اهم تلك التقنيات هي :

أولًا: تقنية الطبق المزدحم Crowded plate technique

تستخدم لعزل البكتريا المنتجة للمضادات الحيوية وكذلك لعزل البكتريا المنتجة لبعض عوامل النمو. وتجرى كما يلي :

1- يعلق 1غم من نموذج التربة في 10 مل من الماء المقطر المعقم ويمزج جيدا ثم يترك لتترسب التربة.
2- تعمل سلسلة تخافيف عشرية لراشح التربة (10^{-6}) .
3- ينشر 0.1 مل من التخافيف العشرية على اطباق nutrient agar .
4- تحضن الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 48-24 ساعة.
5- تفحص الاطباق خلال مدة الحضن وتنتخب المستعمرات التي تظهر حولها منطقة خالية من النمو.

6- تؤخذ المستعمرات المنتخبة ويعمل لها الاتي :

- يعاد زرعها على الوسط نفسه (لغرض تشخيصها لاحقا).
- تعلق في 1 مل من physiological normal saline المعقم .

7- ينشر 0.1 مل من مزارع لعزلات بكتيرية مرضية (او عزلات عوز غذائي)على اطباق nutrient agar ، ثم تعمل 5 حفر في الاكار المزروع بواسطة cork borer معقم.

8- يوضع 0.1 مل من عالق المستعمرات المنتخبة في الحفر، ثم تحضن الاطباق بدرجة 37°C لمدة 24 ساعة.

9- تلاحظ مناطق تثبيط حول الحفر الحاوية على البكتريا المنتجة للمضادات الحيوية (او دوائر نمو حول الحفر الحاوية على البكتريا المنتجة لعوامل النمو).

ثانيًا : تقنية العوز الغذائي Auxotrophic technique

تستخدم لعزل البكتريا المنتجة لعوامل النمو ،وتعمل بكتريا العوز الغذائي ككاشف لانتاج مثل هذه العوامل. وتجرى كما يلي:

1- يفرش شريط من ورق الترشيح المعقم بالاوتوكليف على قاعدة طبق بتري معقم بحيث تمتد نهايتي الورقة من حافة الطبق الى الخارج (اوراق الترشيح انواع منها ذات قطر 0,2 ملي وغيرها ومنها يستخدم للبكتريا ومنها للفايروسات).

2- تفرش فوق هذا الشريط ورقة ترشيح ثانية قرصية الشكل معقمة بحيث تغطي قاعدة الطبق ويصب اكار مغذي في الطبق فوق ورقتي الترشيح .

3- حالما يتصلب الاكار تنشر على سطحه عينة من تربة مخففة بحيث تعطي عددا من المستعمرات منفصلة عن بعضها البعض ويمكن تمييزها بسهولة .

4- يحضر وسط اكار مغذي اخر ويزرع بطريقة الصب بكائن مجهري من نوع العوز الغذائي الذي يحتاج الى عامل نمو خاص (كحامض اميني او فيتامين) او يكون من النوع المراد تحديد مضاد حيوي له .

5- ينقل وسط الاكار المغذي الاول بعناية وبعيدا عن التلوث وبالاستعانة بملاقط الى سطح الوسط في الطبق الكاشف (دون قلب الوسط) يحضن الطبق بدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة .

6- يلاحظ نمو مستعمرات العوز الغذائي في الطبقة السفلى مباشرة تحت المستعمرات النامية في الطبقة العليا (المزروعة بالتربة) وذلك بسبب نفاذ الايضات من طبقة الاكار العلوية الى طبقة الاكار السفلية الحاوية على البكتريا الكاشفة .

7- تنتقى المستعمرات في طبقة الاكار العليا لتحديد نوعها وتكثيرها وعزل عامل النمو الذي تنتجه .

ثالثًا : تقنية المزرعة المدعمة Enrichment Culture technique

تستخدم هذه الطريقة للكشف عن انتاج بعض الانزيمات وخاصة انزيمات البروتيز القاعدية Alkaline proteases حيث يتم اختيار الكازيين كمادة اساس لعمل الانزيم كمصدر وحيد للكاربون والطاقة وتجرى كما يلي:

1- تزرع عينة التربة المخففة والتي سبق معاملتها حراريا (80 °م لمدة 10 دقائق) بهدف قتل الخلايا الخضرية والابقاء على السبورات فقط على وسط اكار – اكار حاوية على الكازيين فقط بنسبة 0,5 % .

2- يحضن الاكار بدرجة 37 °م لمدة 24 – 48 ساعة .

3- يلاحظ نمو مستعمرات بكتيرية نتيجة استهلاك الكازيين كمصدر وحيد للطاقة من قبل هذه المستعمرات المنتجة لانزيم البروتييز .

4- تنتقى هذه المستعمرات وتزرع ثانية لتحديد نوعها وكذلك لعزل وتنقية الانزيم .

رابعًا :عزل بكتريا حامض اللاكتيك من اللبن بطريقة الصب بالاطباق Pour-plate method:

1- تلقح الانابيب الحاوية على وسط MRS السائل بنسبة 1% من عينة اللبن ،وتحضن بدرجة 37°C لمدة 24 ساعة في ظروف لاهوائية.

2- تعمل سلسلة من التخافيف العشرية لغاية(10^{-6}) .

3- ينقل 0.1 مل من التخفيفين الاخيرين الى طباق بتري معقمة ،ثم يصب فوقها وسط MRS agar الخاص بالعزل والحاوي على $1\%CaCO_3$.

4- تمزج الاطباق جيدا ثم تترك لتتصلب ، بعدها تحضن بدرجة 37°C لمدة 48-24 ساعة في ظروف لاهوائية.

5- بعد انتهاء مدة الحضن تنتخب المستعمرات التي تظهر حولها هالة شفافة (والتي تكون موجبة لصبغة غرام وغير مكونة للسبورات وسالبة لفحص الكاتاليز) ، ويعاد زرعها على الوسط نفسه لغرض تشخيصها لاحقا.