التقنية الحيوية ٢ Biotechnology2

المحاضرة ٢ Lecture 2

طرائق خزن الاحياء المجهرية Methods of Stoing of Microorganisms

المرحلة الرابعة – قسم علوم الاغذية

مقدمة:

بعد ان تكتمل عملية العزل ويتم الحصول على الكائن المجهري المطلوب لابد من وجود طريقة لحفظ هذا الكائن او خزنه لضمان سهولة الحصول عليه عندما يراد ذلك، وعادة تكون الكائنات المعزولة من البيئات الطبيعية من النوع البري (Wild type) لذلك يجب اجراء العديد من العمليات لغرض تحسينها لتتحول الى احياء صناعية تصلح للاستخدام في التطبيقات المطلوبة، ويعتمد حفظ الكائن او خزنه على مبدأ اختزال الفعاليات الحيوية للخلايا الى ادنى مستوى ممكن للحفاظ على الكائن بعيوشية (Viability) عالية دون فقد في اعداد الخلايا المحفوظة او حيويتها.

الاسباب التي تدعو الى خزن الاحياء الصناعية:

١- ان عمليات العزل المتكررة تكون مكلفة ومجهدة وتحتاج الى وقت طويل.

٢- الحفاظ على السلالات من التلوث.

٣- الاعتماد على السلالات القياسية المحفوظة كمراجع لاغراض المقارنة كما هي الحال في وجود جهة رسمية خاصة بحفظ السلالات مثل ATCC .

٤- الحفاظ على التراكيب الوراثية للكائنات المجهرية من التغير.

٥- تحسين تداول السلالات الصناعة ونقلها.

تقسيم طرائق حفظ الخلايا حسب الفترة:

١- الحفظ لفترات قصيرة لاتتجاوز شهرين عن طريق استخدام التبريد.

٢- الحفظ لفترات طويلة او الخزن اذ قد تصل مدة الحفظ الى عشر سنوات او اكثر مثل التجميد والتجفيف.

طرائق الحفظ والخزن :

١- الحفظ بالنقل المستمر او المتكرر: وهي طريقة جيدة لحفظ الخلايا لفترة قصيرة اذ تنقل كل شهرين من موائلها الاصلية الى موائل جديدة، وتخزن هذه المزارع عادة في ظروف التبريد.

٢- الحفظ تحت الزيت: تلقح الموائل بالكائن المراد حفظه وتحضن لمدة ٢٤ ساعة، ثم تغطى الموائل بزيت معدني مثل زيت البارافين وتخزن في ظروف التجميد. ان فائدة الزيت هي تقليل تاثيرات التجميد على الخايا. يمكن ان تبقى الخلايا محتفظة بحيويتها لمدة تزيد عن السنة.

٣- الحفظ بالماء المقطر: لاتستخدم هذه الطريقة الا مع انواع معينة من الاحياء، واكثر استخداماتها هي لحفظ بكتريا *Pseudomonas solanocerum* ومع كثير من انواع البكتريا المكونة للسبورات.

٤- الحفظ في درجات الحرارة المنخفضة: يمكن حفظ الخلايا في درجة حرارة التبريد (درجة حرارة الثلاجة حوالي ٤ م) او في التجميد (درجة حرارة المجمدة حوالي -١٨ م). في حالة التجميد يجب اضافة مواد حامية او واقية من التجميد تسمى Cryoprotectants وهي مواد لها القدرة على اختراق اغشية الخلايا وتمنع تكوين البلورات الثلجية الكبيرة داخل الخلايا فتحمي الخلايا اثناء التجميد وتقلل من تضرر الخلايا عند التذويب، ومن الامثلة عليها دكستران ، سوربيتول ، DMSO ، سكروز ، مالتوز ، لاكتوز ، رافينوز.

٥- التجفيف Drying or Dehydration : يؤدي تقليل المحتوى المائي الى ابطاء التفاعلات الحيوية في الخلية وبالتالي امكانية حفظها لفترات طويلة نسبيا، ومن طرائق التجفيف المستخدمة على نطاق واسع :

أ. مزارع التربة: يخلط لقاح الكائن مع تربة معقمة وتحضن لفترة قصيرة في درجة حرارة الغرفة ثم تنقل الى اماكن الخزن. تصلح هذه الطريقة لخزن البكتريا المكونة للسبورات، وقد تصل مدة الخزن الى ١٠ سنوات او اكثر.

ب. استخدام هلام السليكا (Silica gel): يخلط لقاح الخلايا مع هلام السليكا المحضر مسبقا ويجفف. تستخدم هذه الطريقة مع بكتريا حامض اللاكتيك.

ج. استخدام اشرطة او الياف السليلوز (Cellulose fibers): تغمر اشرطة السليلوز في المزرعة السائلة للكائن المجهري وتجفف ويحتفظ بها في قناني او امبولات معقمة. هذه الطريقة ناجحة مع البكتريا الخيطية (Actinomycetes).

٦- الحفظ بالتجفيد (Lyophilization or Freeze-Drying): وهي من الطرائق المهمة لحفظ الخلايا لمدة تصل الى ١٠ سنوات او اكثر، ويقصد بالتجفيد التجفيف من حالة الانجماد، اذ يحضر اللقاح البكتيري او اي مزرعة ذات كثافة عالية جدا من الخلايا (لان الخسائر الناتجة بهذه الطريقة تكون عادة كبيرة) لغرض الحصول على اعداد جيدة في المسحوق الناتج عن عملية التجفيد. تعرض هذه المزارع الى بعد خلطها مع مواد حامية من التجميد الى تجميد سريع ثم تنقل الى حيز يتم فيه تقليل الضغط بصورة مفاجئة مما يؤدي الى فقدان الرطوبة بسرعة والحصول على مستحضر مجفف يحوي على الخلايا وبحيوية مقبولة.

٧- الحفظ في النتروجين السائل (Liquid Nitrogen): وهي طريقة مكلفة تتضمن حفظ المزارع في جو من النتروجين السائل (درجة الحرارة -١٩٦ م). يجب تزويد الحيز بالنتروجين باستمرار لحصول فقد مستمر فيه. تصلح هذه الطريقة لحفظ الخلايا الجنسية دون الخوف من احتمالية فقدانها لفعاليتها، ويمكن ان تطول مدة الحفظ الى عدة سنوات.