



Department of Medicinal Plants and Natural Products Technologies

قسم التقنيات النباتات الطبية والنواتج الطبيعية

المرحلة الأولى

الفصل الدراسي الثاني

((احياء مجهرية عملي))

رقم المحاضرة: 6

"تقنيات التنقية والتخزين للمستعمرات المعزولة"

م.م محمد علي واثق ابوجزرة

1- أهمية التنقية والتخزين للمستعمرات المعزولة في الأوساط الزراعية

تُعدّ تقنيات التنقية والتخزين من العمليات الحيوية في الحفاظ على المستعمرات المعزولة التي تنمو داخل الأوساط الزراعية في المختبرات.

إن نجاح زراعة الكائنات الدقيقة، مثل البكتيريا أو الفطريات أو الخلايا الحية، يعتمد بشكل أساسي على نقاء الوسط الزراعي وخلوه من الملوثات الخارجية التي قد تؤثر على صحة المستعمرة أو تغير من خصائصها الوراثية والفسولوجية.

ومن هنا، تبرز أهمية التنقية الدقيقة للأوساط الزراعية، سواء أثناء تحضيرها أو خلال مراحل النمو المختلفة، لضمان توفير بيئة مثالية تدعم نمو المستعمرات بصورة سليمة ومنضبطة.

أما التخزين، فهو يمثل خطوة أساسية للحفاظ على المستعمرات لفترات طويلة دون أن تفقد حيويتها أو خصائصها الأصلية. ويتطلب ذلك استخدام تقنيات دقيقة مثل التخزين بالتبريد، أو بالتجميد العميق، أو من خلال الحفظ في أوساط غذائية مناسبة، بهدف إيقاف أو إبطاء النشاط الحيوي للكائنات الدقيقة مع الحفاظ على قدرتها على النمو والتكاثر عند الحاجة.

إن أهمية هذه العمليات لا تقتصر على استمرارية المشاريع البحثية فحسب، بل تمتد لتشمل ضمان موثوقية النتائج العلمية وإمكانية العودة إلى العينات الأصلية عند الحاجة لإجراء الدراسات المستقبلية أو المقارنات التجريبية.

2. تقنيات تنقية المستعمرات

تُعدّ تنقية المستعمرات المعزولة داخل الأوساط الزراعية عملية أساسية لضمان نقاء السلالات واستمرارية نموها بشكل سليم. تعتمد هذه العملية على مجموعة من التقنيات الدقيقة التي تهدف إلى إزالة أو الحد من الملوثات غير المرغوب بها مثل البكتيريا الغريبة أو الفطريات أو غيرها من الكائنات الدقيقة التي قد تتسلل إلى الوسط الزراعي أثناء التحضير أو النقل أو الحضانة.

ومن أبرز هذه التقنيات استخدام أساليب الزرع الخالص، حيث يتم نقل جزء من المستعمرة المفحوصة إلى وسط جديد معقم باستخدام أدوات دقيقة مثل الإبرة المعقمة أو الماصة الدقيقة، وذلك تحت ظروف معقمة داخل الحاضنات أو غرف العمليات المعقمة.

كما تعد تقنية العزل بالخطوط (Streak Plate Method) من أكثر الأساليب شيوعاً في تنقية المستعمرات، حيث يُمرر العالق الميكروبي على سطح الوسط الزراعي بطريقة مدروسة تسمح بنمو مستعمرات منفردة يسهل اختيار الأنقى منها. وفي بعض الحالات، يتم اللجوء إلى التنقية باستخدام الأوساط الانتقائية التي تحتوي على مواد كيميائية أو عوامل مثبطة تحد من نمو الكائنات غير المرغوب بها، مما يسمح بتعزيز نمو الكائن الهدف فقط.

بالإضافة إلى ذلك، تُستخدم عمليات الطرد المركزي أحياناً لفصل الخلايا المطلوبة عن الشوائب، خاصةً عند العمل مع معلقات خلوية أو محاليل ميكروبية. وتعتمد هذه التقنيات جميعها على مبدأ العمل في بيئة معقمة باستخدام أدوات معقمة واتباع ممارسات العمل النظيف لضمان الحصول على مستعمرات نقية وصالحة للاستخدام البحثي أو التطبيقي.

أنواع تقنيات تنقية المستعمرات

1. تقنية الزرع الخالص (Pure Culture Technique): تهدف للحصول على مستعمرات مشتقة من خلية واحدة لضمان نقاء العينة.
2. تقنية الخطوط المتوازية (Streak Plate Method): يتم توزيع العينة على سطح الوسط الصلب بواسطة إبرة معقمة للحصول على مستعمرات منفردة.
3. تقنية الصب في الأطباق (Pour Plate Method): يتم خلط العينة مع وسط زراعي سائل معقم ثم صبه في طبق بتري للحصول على نمو معزول.
4. تقنية العزل باستخدام الأوساط الانتقائية (Selective Media Technique): يتم استخدام أوساط تحتوي على مواد تثبط نمو الكائنات غير المرغوب بها، مما يسمح بعزل الكائن المطلوب فقط.
5. استخدام الماصات الدقيقة (Micropipette Transfer): لنقل جزء صغير جداً من المستعمرات بشكل دقيق ونظيف لمنع التلوث.
6. العمل في حجرة التعقيم (Laminar Flow Hood): لتوفير بيئة معقمة تماماً أثناء عمليات النقل والعزل.
7. التنقية باستخدام التخفيف المتسلسل (Serial Dilution Method): يتم تخفيف العينة تدريجياً للحصول على مستعمرات قليلة ومنفصلة يسهل عزلها.
8. الطرد المركزي (Centrifugation): لعزل الخلايا النقية من الملوثات في الوسط السائل قبل الزرع على وسط صلب.

3. تقنيات تخزين وحفظ المستعمرات

بعد الحصول على مستعمرات معزولة ونقية، تأتي مرحلة التخزين والحفظ لضمان بقاء هذه المستعمرات حية وقادرة على استعادة نشاطها الحيوي عند الحاجة، دون حدوث تغييرات وراثية أو فقدان للخصائص المرغوبة. ويُعد التخزين السليم جزءاً أساسياً من إدارة العينات في المختبرات البحثية، خاصةً عند الحاجة لاستخدام المستعمرات لاحقاً في الدراسات أو التجارب طويلة الأمد.

تتعدد تقنيات تخزين وحفظ المستعمرات، ومن أبرزها التخزين في درجة حرارة التبريد العادي (بين 4 إلى 8 درجات مئوية)، حيث توضع المستعمرات على أوساط زراعية مغذية وتحفظ داخل الثلاجة لفترات قصيرة تتراوح من أسابيع إلى عدة أشهر، مع الحفاظ على الوسط من الجفاف باستخدام أغشية محكمة أو إضافة مواد واقية.

أما للحفظ لفترات أطول، فتلجأ المختبرات إلى تقنية التجميد العميق عند درجات حرارة منخفضة جداً تصل إلى -80 درجة مئوية باستخدام المجمدات الخاصة أو النيتروجين السائل. في هذه الطريقة، يتم خلط الخلايا مع محاليل حافظة مثل الجليسرول لحمايتها من التلف الناتج عن التجميد، مما يسمح بالحفاظ على نشاطها الحيوي لسنوات عديدة.

كما تُستخدم تقنية التجفيف بالتجميد (Lyophilization)، أو ما يعرف بالتجفيد، وهي من أكثر الطرق فعالية لحفظ المستعمرات لفترات طويلة دون الحاجة إلى التبريد المستمر. تقوم هذه الطريقة على إزالة الماء من الخلايا تحت ظروف تفريغ وضغط منخفض، مما يسمح بتخزينها في حالة جافة قابلة للاسترجاع عند الحاجة عبر إعادة الترطيب.

إضافةً إلى ذلك، يتم في بعض الأحيان تخزين المستعمرات على أوساط غذائية خاصة تحتوي على مواد حافظة أو مغلفات شمعية تقلل من التبخر وتبطئ من النشاط الخلوي، مما يحافظ على المستعمرة لفترة ممتدة في درجات حرارة معتدلة.

تُختار طريقة التخزين المثلى بناءً على نوع الكائن الحي، مدة الحفظ المطلوبة، والإمكانات التقنية المتوفرة في المختبر، مما يجعل التخزين والحفظ عملية دقيقة تحتاج إلى عناية خاصة لتحقيق أفضل النتائج والحفاظ على نقاء وجودة المستعمرات.

وكما في الجدول التالي:

طريقة التخزين	المميزات	العيوب
التبريد عند 4-8°C	-بسيط وسريع . -مناسب للتخزين -قصير الأمد.	-مدة الحفظ محدودة (أسابيع إلى أشهر) . -خطر الجفاف أو التلوث.
التجميد العميق- 80°C	-حفظ طويل الأمد (سنوات) . -يقلل من التغيرات الوراثية.	-يتطلب مجمدات خاصة . -الحاجة إلى مواد واقية مثل الجليسرول.
الحفظ بالنيتروجين السائل (-196°C)	-أطول فترة تخزين ممكنة مع أقل تغيرات حيوية.	-مكلف جداً . -يحتاج متابعة دائمة لمستوى النيتروجين.
التجفيد (Lyophilization)	-حفظ دون الحاجة إلى تبريد . -سهولة النقل والتخزين.	-عملية تحضير معقدة . -تحتاج أجهزة خاصة (مجفف بالتجميد).
التخزين على أوساط صلبة مع تغطية (مثل الشمع أو الزيت)	-طريقة رخيصة وبسيطة . -مناسبة لبعض أنواع البكتيريا.	-ليست فعالة لكل أنواع الكائنات الدقيقة . -مدة الحفظ محدودة.

4. ضمان الجودة أثناء التخزين

يُعد ضمان الجودة أثناء تخزين المستعمرات المعزولة جزءاً جوهرياً من إدارة المختبرات الدقيقة، إذ إن التخزين غير السليم قد يؤدي إلى فقدان المستعمرات لصفاتها الحيوية أو تغيير خصائصها الجينية أو تلوثها بكائنات غريبة. ولتجنب هذه المخاطر، يجب اتباع مجموعة من الإجراءات الصارمة التي تكفل الحفاظ على جودة المستعمرات طوال فترة التخزين.

من أهم خطوات ضمان الجودة اعتماد ممارسات العمل العقيم منذ بداية التخزين، بحيث يتم التعامل مع المستعمرات باستخدام أدوات معقمة وضمن بيئة معزولة كحجرة التدفق الهوائي النظيف. كما يجب توثيق كافة العينات بشكل دقيق، مع وضع علامات واضحة تتضمن تاريخ الحفظ، نوع المستعمرة، الوسط الزراعي المستخدم، وطريقة التخزين المعتمدة، مما يسهل متابعة حالة العينات مع مرور الوقت.

تُعد المراقبة الدورية لظروف التخزين أمراً ضرورياً أيضاً، إذ ينبغي التأكد من استقرار درجات الحرارة داخل المجمدات أو الثلاجات وعدم حدوث تغيرات مفاجئة قد تؤثر على حيوية المستعمرات. وفي حالات التخزين بالتجفيف أو التجميد، يجب فحص العينات بشكل دوري للتأكد من سلامتها، مع اختبار عينات عشوائية بإعادة زرعها للتحقق من بقائها نقية وقابلة للنمو.

علاوة على ذلك، يجب إعداد سجلات للصيانة الدورية للأجهزة المستخدمة في التخزين مثل المجمدات وأجهزة التجفيف بالتجميد، والتدخل السريع عند حدوث أي عطل أو خلل. كما ينبغي تدريب الكادر المختبري على التعامل مع تقنيات التخزين والحفظ بشكل صحيح وفقاً لإجراءات التشغيل القياسية، بما يضمن تقليل فرص الأخطاء البشرية.

إن الالتزام بهذه المعايير والإجراءات لا يحافظ فقط على جودة المستعمرات، بل يضمن أيضاً موثوقية النتائج البحثية المستقبلية ويعزز سلامة العمل العلمي داخل المختبرات.

أسئلة اختيار من متعدد:

ما هو الهدف الرئيسي من استخدام تقنية الزرع الخالص في تنقية المستعمرات؟

أ. للحصول على مستعمرات من خلية واحدة ب. لاكتشاف أنواع جديدة من الكائنات

ج. لزيادة عدد الخلايا في العينة د. لتحديد التركيب الوراثي للكائنات

أي من الطرق التالية يُعتبر أفضل لتخزين المستعمرات لفترات طويلة جدًا؟

أ. التجميد عند درجة -80°C ب. التخزين في الثلجة عند 4°C

ج. الحفظ في الأوساط الانتقائية د. التخزين على الأوساط الصلبة المغلفة

أي من التالي يُعد أكبر تحدٍ في تنقية المستعمرات؟

أ. التلوث أثناء الزرع ب. التجميد العميق

ج. فصل الخلايا باستخدام الطرد المركزي د. استخدام أوساط انتقائية

أسئلة صواب أو خطأ:

1. يجب تخزين المستعمرات التي تم تجميدها في النيتروجين السائل عند درجة حرارة -196°C لضمان بقائها حية.
2. تقنية التجفيف بالتجميد لا تتطلب أي مواد حافظة مثل الجليسرول.
3. العزل باستخدام الخطوط المتوازية يُعتبر أكثر تقنيات التنقية شيوعًا في المختبرات.

أسئلة مقالية:

1. اشرح بإيجاز كيفية تجنب التلوث أثناء عملية التنقية للمستعمرات داخل الأوساط الزراعية.
2. ناقش الفروقات بين التخزين في التبريد و التخزين بالتجميد العميق من حيث المزايا والعيوب.
3. كيف يمكن ضمان جودة المستعمرات المخزنة على المدى الطويل؟ اذكر بعض الممارسات التي تساهم في الحفاظ على المستعمرات.
4. قارن بين تقنية الزرع الخالص و تقنية الصب في الأطباق من حيث الاستخدامات والفعالية في تنقية المستعمرات.
5. ما الفرق بين التخزين بالنيتروجين السائل و التخزين بالتجميد من حيث كفاءة حفظ المستعمرات؟
6. ما هي أكثر التقنيات فعالية من وجهة نظرك في ضمان جودة التخزين للمستعمرات، ولماذا؟
7. في رأيك، ما هي أكبر التحديات التي قد تواجه الباحثين في تخزين المستعمرات في المختبرات ذات الموارد المحدودة؟ وكيف يمكن التغلب عليها؟
8. إذا كنت تعمل في مختبر للبحث العلمي وواجهت مشكلة في تخزين مستعمرات تجميدها بشكل غير صحيح، ما هي الإجراءات التي يجب أن تتخذها لتصحيح الوضع؟
9. في حالة حدوث تلوث أثناء تنقية المستعمرات باستخدام تقنية الخطوط المتوازية، ما هي الخطوات التي يجب اتباعها لاسترجاع العينات الأصلية؟