دراسة مقارنة بسيطة في حفظ بعض الأحياء المجهرية

وائل ياسين الدباغ[1] آلاء رشيد علي[2]

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v7i1.408

الملخص

استخدمت خمس طرق مختلفة وهي التجميد (-20°م) في وجود زيت الذرة ، أقراص الآجار ، أقراص الجلاتين ، أقراص ورق الترشيح وبذور القمح في مقارنة تأثيرها في حفظ الأنواع المفردة من الأحياء المجهرية التالية :

Escherchia coli, *Lactobacillus bulgaricus*, *Pseudomonas spp* *Streptococcus thermophilus* و *Saccharomyces cerevisiae* ولفترات حفظ مختلفة ولمدة 50 أسبوعا .

جميع طرق الحفظ أثبتت فعالية ناجحة في حفظ الأنواع المذكورة أعلاه من الأحياء المجهرية ماعدا بكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* والتي أثبتت فشلها في طرق الحفظ بأقراص الآجار ، أقراص الجلاتين وأقراص ورق الترشيح .

وقد تبين أن طريقة الحفظ بأقراص ورق الترشيح كانت ذات فائدة كبيرة بالنسبة لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* مقارنة مع بقية طرق الحفظ الأخرى .

وفي نفس الوقت أعطت طريقة الحفظ بالتجميد في وجود زيت الذرة نجاحاً آخر مع كل من بكتيريا *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Streptococcus thermophilus* .

[1] أستاذ مساعد ، علم الأحياء الدقيقة ، جامعة عمر المختار ، قسم الأحياء ، البيضاء – ليبيا .

[2] محاضر ، تلوث ميكروبي ، قسم الأحياء ، جامعة عمر المختار ، البيضاء – ليبيا .

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

المقدمة

على الرغم من وجود طرق متعددة لحفظ الأحياء المجهرية لفترات زمنية مختلفة إلا أن اختيار الطريقة الملائمة لحفظ نوع معين من الكائن المجهري يعتمد على عوامل كثيرة ، لهذا السبب يكون من الصعوبة إيجاد طريقة واحدة مناسبة لحفظ جميع أنواع الأحياء المجهرية (Sneel, 1984) .

توجد طرق بسيطة ملائمة لحفظ غالبية الأحياء المجهرية بالتجفيف ولمدة زمنية قد تصل إلى سنة أو سنتين وهذه تشمل التربة ، حبيبات الزجاج ، أقراص الجيلاتين ، أقراص ورق الترشيح (WFCC, 1988) .

في هذه الدراسة تمت مقارنة خمس طرق مختلفة بسيطة لحفظ مركزات من البكتيريا وخميرة الخبز وذلك من أجل الحفاظ على حيوية هذه الكائنات المجهرية ولمدة 50 أسبوعا من الحفظ .

المواد وطرق العمل

المزارع الميكروبية والأوساط الغذائية

مزارع نقية مفردة من كل من *Escherichia, Pseudomonas spp* والتي أخذت من قسم النبات / كلية العلوم / جامعة قار يونس / ليبيا ، وبكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* وبكتيريا *Streptococcus thermophilus* وهاتان أخذتا من معمل الألبان في مدينة البيضاء / ليبيا . وقد تم التأكد من نقاوة هذه المزارع البكتيرية ومطابقتها للنوع وذلك بموجب الاختبارات الواردة في Bergey's Manual of Determinative Bacterology (Holt وآخرون 1994) .

أما خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* فهي من خميرة باكمايا (تركيا) . وكان الوسط الغذائي المستخدم لتنمية بكتيريا *pseudomonas spp* و *Escherichia coli* هو المرق / الآجار المغذي ، بينما استخدم وسط بكتيريا حامض اللاكتيك (Davis, 1975) LAB لتنمية بكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* وبكتيريا *Streptococcus thermophilus* وبالنسبة لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* فقد أستخدم الوسط الغذائي مرق / آجار دكستروز البطاطا .

تمت تنمية جميع المزارع الميكروبية في الأوساط الغذائية الصلبة في أطباق وحضنت على درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة . تم نقل المستعمرات الميكروبية إلى أوساط غذائية سائلة مماثلة للأوساط الصلبة مع التأكد من نقاوة كل مزرعة وذلك بعمل شريحة وصبغها بطريقة جرام . تم تلقيح المزارع الميكروبية على أجار مائل للأوساط الغذائية وحفظت على درجة حرارة 4°م لغرض التنشيط كل ثلاثة أشهر .

تحضير مركزات المزارع الميكروبية وإعدادها للحفظ

تم تلقيح المزارع الميكروبية في أوساطها الغذائية بنسبة 1% ، وتم التحضين على درجة حرارة 37°م لمدة 12 ساعة . تم تركيز جميع المزارع بالطرد المركزي 4000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق ، غسلت الخلايا المركزة بماء الببتون المنظم

مرتين وتم تعليق المزارع المغسولة بنسبة 4% من حجمها الأصلي في 10% حليب خالٍ من الدهن .

في حالة التجميد (-20°م) وبوجود زيت الذرة فقد مزج 0.5 مل من المعلق الميكروبي مع 0.5 مل من زيت الذرة وجمدت مباشرة بالتجميد البطيء على درجة حرارة (-20°م) واستغرقت مدة التجميد 5 دقائق .

وبالنسبة لأقراص الآجار والجلاتين فقد تم مزج 10% من كل من الآجار والجلاتين مع المزارع الميكروبية ووزعت بشكل نقاط بواقع 0.2 مل على سطح شمع البارافين المعقم في أطباق بتري وجففت بوجود السليكا جل (المعقمة بدرجة حرارة 100°م لمدة 24 ساعة) . وضعت الأقراص المجففة في أنابيب زجاجية صغيرة مغطاة بالقطن ثم أكمل تجفيفها بوضعها فوق خامس أكسيد الفسفور (P_2O_5) لمدة يومين . حفظت الأقراص الجافة على درجة حرارة 4°م في قنانٍ زجاجية ذات غطاء محكم .

بالنسبة للتجفيف بأقراص ورق الترشيح فقد أستخدم ورق ترشيح (Whatman No 4) بقطر 1سم وعقمت على درجة حرارة 90°م لمدة 48 ساعة . وضعت الأقراص المعقمة فوق السليكا جل ثم وضع مقدار 0.2 مل من المعلق الميكروبي على سطح الورقة وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة (25°م) لمدة 48 ساعة . حفظت الأقراص الجافة في قنانٍ زجاجية ذات غطاء محكم على درجة حرارة 4°م . وبالنسبة لبذور القمح فقد تم تعقيم البذور بدرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة ثم جففت بدرجة حرارة 70°م لمدة 48 ساعة وكل حبة شبعت بمقدار 0.2 مل من المعلق الميكروبي وجففت بوضعها فوق السليكا جل كما أتبع في طريقة أقراص ورق الترشيح .

تقدير الحيوية

تم تقدير العدد الكلي للخلايا الميكروبية الحية بأخذ 5 أقراص من كل من الآجار والجلاتين وورق الترشيح وبذور القمح وذوبت في 90 مل ماء البيتون مع المزج المستمر والسحق لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة 30°م . وبالنسبة للتجميد بوجود زيت الذرة فقد تم أخذ أنبوبة واحدة من المزيج المجمد وأذيبت بدرجة حرارة 30°م ثم أضيف لها ماء البيتون وأجريت التخفيفات اللازمة لإجراء تقدير العدد الكلي .

تم تقدير الحيوية لكافة المزارع الميكروبية مباشرة بعد الحفظ وخلال فترات الحفظ المختلفة وذلك بطريقة الصب بالأطباق وباستخدام الأوساط الغذائية الآجار المغذي لكل من بكتيريا *Pseudomonas spp* و *Escherichia* . ووسط LAB لكل من بكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* و *Streptocuccus thermophilus* . ووسط PDA لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* ، تم عمل مكررين لكل تجربة .

النتائج والمناقشة

عند مقارنة طرق الحفظ المختلفة على حيوية الأنواع الميكروبية المستخدمة في هذه الدراسة أوضحت النتائج في الجدول (1) بشكل

جدول 1 تأثير طرق الحفظ المختلفة على حيوية البكتيريا والخميرة لمدة 50 أسبوع

النسبة المئوية للخلايا الحية						
طرق الحفظ	فترات الحفظ (الأسبوع)					
	بعد الحفظ مباشرة	10	20	30	40	50
	Pseudomonas spp.					
التجميد (−20°م) بوجود زيت الذرة	77	73	62	60	51	51
أقراص الآجر	63	60	57	48	46	40
أقراص الجلاتين	54	52	47	44	36	29
أقراص ورق الترشيح	40	40	37	31	21	17
بذور القمح	87	66	51	43	39	37
	*Eschericha coli***					
التجميد (−20°م) بوجود زيت الذرة	93	80	79	70	70	70
أقراص الآجر	87	74	71	61	58	47
أقراص الجلاتين	88	78	75	67	63	56
أقراص ورق الترشيح	70	54	51	40	39	36
بذور القمح	92	80	76	75	69	68
	*Lactobacillus bulgaricus****					
التجميد (−20°م) بوجود زيت الذرة	51	27	16	15	10	7
أقراص الآجر	37	17	9	6	2	<1
أقراص الجلاتين	31	14	5	3	1	<1
أقراص ورق الترشيح	21	10	3	<1	<1	<1
بذور القمح	57	30	19	11	10	9
	*Streptococcus thermophilus*****					
التجميد (−20°م) بوجود زيت الذرة	99	91	89	79	77	77
أقراص الآجر	90	80	76	71	71	70
أقراص الجلاتين	92	-	81	69	69	66
أقراص ورق الترشيح	87	85	75	51	36	36
بذور القمح	100	97	85	76	-	74
	*Saccharomyces cerevisiae******					
التجميد (−20°م) بوجود زيت الذرة	94	81	80	73	61	58
أقراص الآجر	80	74	61	57	50	44
أقراص الجلاتين	80	71	69	-	51	44
أقراص ورق الترشيح	89	89	84	76	66	63
بذور القمح	86	80	67	64	58	52

متوسط عدد الخلايا قبل الحفظ (× 10^9 وحدة تكوين الخلايا / مل)

* 31 ، ** 44 ، *** 20 ، **** 34 ، ***** 9 ، - غير مقدرة

عام وجود انخفاض ملحوظ وتدريجي بعد الحفظ مباشرة وكذلك خلال فترات الحفظ المختلفة ولمدة 50 أسبوعاً من الحفظ ولكل أنواع البكتيريا وكذلك الخميرة .

كما تبين النتائج أنه على الرغم من وجود اختلافات ملحوظة في النسبة المئوية للخلايا الحية مباشرة بعد الحفظ ولأنواع الميكروبات الخمسة إلا أنه لوحظ أن أعلى حيوية كانت في بكتيريا *Streptococcus thermophilus* حيث تراوحت بين 87% في أقراص ورق الترشيح إلى 100% في بذور القمح ولكافة طرق الحفظ المختلفة في حين حصل انخفاض شديد بالنسبة لبكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* حيث تراوحت النسبة المئوية للخلايا الحية بعد الحفظ مباشرة بين 21% في أقراص ورق الترشيح و 57% في بذور القمح .

وعند مقارنة طرق الحفظ المختلفة على حيوية أنواع البكتيريا والخميرة ظهر أن طريقة الحفظ بالتجميد بوجود زيت الذرة أعطت أعلى حيوية عند نهاية فترة الحفظ (بعد 50 أسبوعاً) حيث وصلت إلى 51 ، 70 ، 77% لكل من بكتيريا *Pseudomonas spp.* و *Escherichia coli* و *Streptococcus thermophilus* على التوالي . بينما أعطت طريقة الحفظ بورق الترشيح أعلى حيوية لخميرة *Saccharomyces cerevisiae* والتي بلغت 64% مقارنة مع طرق الحفظ الأخرى .

أما بالنسبة لبكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* فقد أظهرت النتائج وجود حساسية عالية لهذه البكتيريا لطرق الحفظ المختلفة مقارنة بالأنواع الميكروبية الأخرى على الرغم من الحصول على 7 و 9% حيوية عند نهاية فترة الحفظ في كل من طريقتي التجميد بوجود زيت الذرة وطريقة الحفظ ببذور القمح على التوالي بالمقارنة مع بقية طرق الحفظ الأخرى .

كما تبين النتائج في نفس الجدول أيضا انخفاضا شديدا في النسبة المئوية للخلايا الحية في بكتيريا *Escherichia coli* وبكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* خلال الأسابيع العشرة الأولى ولكافة طرق الحفظ المختلفة مقارنة مع البكتيريا *Psedomonas* spp. والبكتيريا *Streptococcus thermophilus* والخميرة *Saccharomyces cerevisiae* .

هذا الانخفاض لوحظ باستمرار خلال فترات الحفظ المختلفة بالنسبة لبكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* حيث كانت أكثر طرق الحفظ حساسية لهذه البكتيريا هي طريقة أقراص الآجار والجلاتين وورق الترشيح حيث كانت النسبة المئوية للخلايا الحية فيها في نهاية فترة الحفظ أقل من 1% .

من نتائج هذه الدراسة يظهر أن بكتيريا *Streptococuus thermophilus* كانت أكثر مقاومة لجميع طرق الحفظ المستخدمة مقارنة مع

بكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* وهذا قد يؤثر على النسبة بين النوعين من البكتيريا عند استخدامهما في صناعة الألبان خاصة اللبن الزبادي ، وهذا قد يعود إلى طبيعة الخلايا ومكونات الجدار الخلوي . هذه النتائج تطابق ما توصل إليه بعض الباحثين في هذا المجال (Shiskova, Tsvetkov 1982; Al-Dabbagh, 1994) من أن بكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* أكثر حساسية من بكتيريا *Streptococcus thermophilus* ولهذا يمكن الاستدلال بما ذكره (Scott 1958) بأن التغير في طبيعة بروتين الخلية الميكروبية وذلك عن طريق وجود المجاميع الكربونية والتي تتحد مع مجاميع الأمين في بروتين الخلايا أو عملية الفقد التي تحصل في الماء المرتبط في الخلايا قد يكون لها دور مهم في هذا التأثير .

نتائج هذه الدراسة توصي باستخدام طريقة الحفظ بأقراص ورق الترشيح في حفظ خميرة *Saccharomyces cerevisiae* بينما توصي باستخدام طريقة الحفظ بالتجميد بوجود زيت الذرة مع بكتيريا *Pseudomonas* spp. وبكتيريا *Escherichia coli* وبكتيريا *Streptococcus thermophilus* ولهذا فإن هذه الدراسة تقترح أنه يجب اختيار الطريقة المناسبة أو الملائمة والتي تعكس النسبة المئوية العالية في الخلايا المقاومة لكل نوع من الكائن المجهري .

Comparative Study Using Simple Methods in Preservation of Some Microorganisms

Wail Al–Dabbagh and Aala R. Ali*

Abstract

Freezing (–20°C) in corn oil, agar disc, gelatin disc, filter paper and wheat seeds were compared for preservation of single cultures of *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* up to 50 weeks.

All the cultures under investigation were found to preserve successfully with these methods of preservation except *Lactobacillus bulgaricus* which failed to maintain their viability with agar disc, gelatin disc and filter paper.

According to this study, it is suggested that using filter paper is of beneficial value in preserving *Saccharomyces cerevisiae*.

With *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, and *Streptococcus thermophilus*

* Department of Biology, Faculty of science, University of Omar El–Mukhtar.

freezing in corn oil was found to be the best method.

المراجع

AL–Dabbagh, W. Y. 1994. Comparative study on the preservation of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* Cultures. Mesopotamia J. Agric. 26, 11–5.

Davis, J. G., 1975. The microbiology of Yoghurt. In: Carr, J. G. Cutting, C. V. and Whiting, G. C. (eds.) Lactic acid bacteria in beverages and Food. Academic Press, London, PP. 257.

Holt, J. G., Krieg. N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T. and Williams, S. T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth ed Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, U.S.A.

Scott, W. J. 1958. Method for the dried storage of microorganisms. Brit. Pat No. 799, 44

Snell, J. J. S. 1984. General introduction to maintenance methods. In: Kirsop, B. E. and Snell, J. J. S. (eds). Maintenance of Microorganisms. A manual of laboratory methods. Academic Press, London. PP. 11–21.

Tsvetkov. T. and I. Shishkova. 1982. Studies on the effects of low temperatures on. Lactic acid bacteria. Cryobiology, 19, 211–214.

WFCC "World Federation Culture Collection" 1988. Workshop, Preservation of microorganisms. 27th – 29th Oct., Univ. of Maryland U.S.A.