



الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

التقنية الحيوية الميكروبية Microbial Biotechnology (الجزء النظري)

المحاضرة السادسة

إعداد

الدكتور عبد الواحد الططي



جامعة حماة 2018 - 2019

التقنية الحيوية الميكروبية

Microbial Biotechnology

مقدمة:



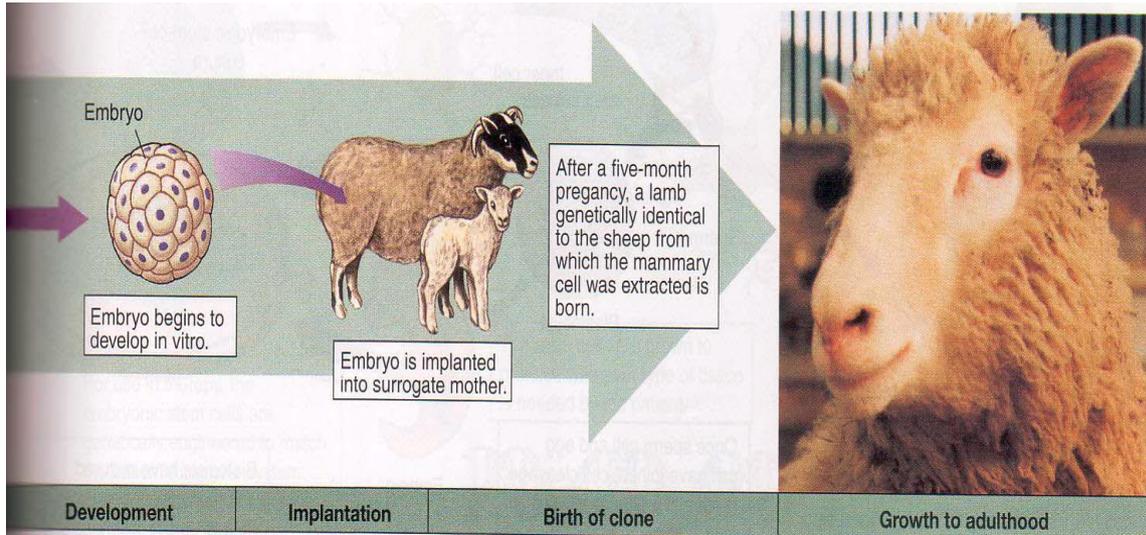
خلق الله الكائنات الحية من الخلايا التي فيها جميع أسرار الكائن الحي لما تحتويه نواتها من آلاف المورثات فقد كشفت الأبحاث العلمية أهمية الحمض النووي DNA الذي يحمل أسرار الكائنات الحية، وقد ظهر علم جديد يبحث في مكونات الخلية الحية الدقيقة ويفك أسرارها أطلق عليه اسم التقنية الحيوية.

تعريف التقنية الحيوية:

عرّف العلماء التقنية الحيوية بأنها مجموعة من الوسائل والتقنيات العلمية التي تستخدم الكائنات الحية أو مواد منها لصنع أو تعديل منتج معين أو تحويل كائنات حية لاستخدامات معينة ذات فائدة للإنسان.

كان لابد من وجود التقنية الحيوية بعد أن جربت البشرية العمليات الصناعية الكيميائية التي أدت إلى كوارث التلوث البيئي والتغيير المناخي وزيادة التصحر وتدمير الأنظمة الحيوية الذي أدى إلى قلة التنوع الحيوي وغيرها من المشاكل. إنّ العصر الحالي هو عصر التقنية الحيوية التي دخلت في مجال الصناعة والطب والزراعة والبيئة وغيرها من المجالات التي أدت إلى إنتاج العديد من المضادات الحيوية، وعوامل النمو، والإنزيمات، واللقاحات، وإنتاج الطرز النباتية المقاومة للمبيدات والحشرات والفطريات مما أدى إلى تحسين الإنتاج الزراعي، إضافة إلى المحاولات الناجحة في مجال تحسين الثروة الحيوانية كما استخدمت تقانات الهندسة الوراثية في البحوث الطبية لتشخيص الأمراض والكشف عن الكائنات الحية الدقيقة ومعرفة الاختلال الوراثي المرتبط ببعض الأمراض كالسكري والسرطان وغيره، ونظراً للتقدم السريع في مجال التقنية الحيوية فقد بادرت كثير من الدول إلى وضع خطط استراتيجية لخوض غمار هذه التقنية وتحصيل أكبر قدر من فوائدها.

نشأ اسم التقنية الحيوية Biotechnology مع الزراعة منذ فجر التاريخ حين بدأ الإنسان يستشعر تجربة تلف الطعام نتيجة الفساد الميكروبي وحفظه بالتجفيف أو التملح أو إضافة السكر، ثم تطورت الحضارة للوصول إلى تحضير الخبز والجبن ودبغ الجلود باستخدام مبادئ التقنية الحيوية، فمنذ عام 1920 تمت صناعة حمض الليمون عن طريق تخمير الأحياء الدقيقة وباستخدام الفطر *Aspergillus niger*، وفي عام 1929 اكتشف الكسندر فليمينغ البنسلين، وفي عام 1943 اكتشف سيلمان ويكسمان المضاد الحيوي الستربتومايسين، وفي عام 1965 استُعملت المنفعة المستخرجة من الجراثيم للتجبين (الرينيت أو الرينين)، ومنذ عام 1977 أصبحت إمكانية تصنيع بروتينات مأسوية عن طريق التخمير باستخدام الجراثيم، وفي عام 1985 اكتشف كاري موليس تفاعل البلمرة المتسلسل PCR، ومنذ عام 1990 بدء مشروع الجينوم البشري، وفي عام 1996 تم معرفة الجينوم الكامل للخميرة، وفي عام 1998 جرى استنساخ أول حيوان وهي النعجة دوللي Dolly.



تطورت التقنية الحيوية الحديثة نتيجة التقدم الكبير الذي حدث في فروع العلم المختلفة وهي في الحقيقة مجموعة من التقانات المختلفة تشمل الهندسة الوراثية، ورسم الخريطة الجينية، ونقل الجينات، وزراعة الأنسجة، والتخمرات، والاستنساخ الحيواني، وقد تجاوز مجموع مبيعات البروتينات العلاجية المأسوية 10 بليون دولار في عام 1999.

تعتمد التقنية الحيوية الحديثة على الميكروبات المعدلة وراثياً لإنتاج الغذاء، المواد الكيميائية، الأدوية، والوقود، وكانت الجراثيم أول الكائنات التي تم تعديلها وراثياً في عام 1973، ثم تلاها الفئران في عام 1974، وقد تم بيع الأنسولين الذي تنتجه الجراثيم في عام 1982 بينما بدأ بيع الغذاء المعدل وراثياً منذ عام 1994.

تمتاز الأحياء الدقيقة المجهرية بعدة ميزات تؤهلها للاستعمال في عمليات التقنية الحيوية منها:

1- سريعة النمو ذات تنوع حيوي كبير ويمكن إنتاج أعداد كبيرة منها وهذه الإمكانية غير متوفرة في الأحياء متعددة الخلايا مثل النباتات والحيوانات.

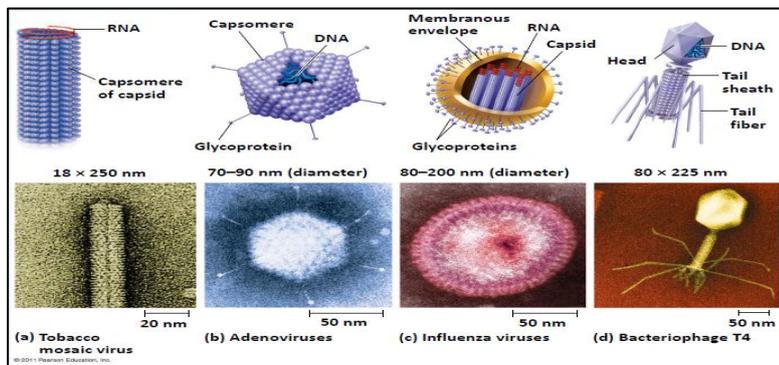
2- الأنظمة الوراثية فيها أقل تعقيداً من الأحياء الراقية مما يسهل عمليات التطوير والنسخ.

3- تحوي العديد من المسارات الاستقلابية الأيضية للمادة الواحدة عكس الخلايا الراقية التي تكون فيها هذه المسارات محدودة.

4- تستطيع التأقلم السريع لاستهلاك مواد رخيصة متوفرة في الطبيعة.

5- معظمها لا يعاني من الشيخوخة بعد عدة أجيال وإن كان ذلك فلا بد من أن تنشأ مجموعة من الخلايا تحافظ على النوع.

تُستخدَم الكائنات الحية الدقيقة على نطاق واسع في مشاريع التقنية الحيوية على سبيل المثال إنتاج البروتينات كالأنسولين، والتخمير كإنتاج الخبز واللبن والجبن والمخللات والسيلاج والأغذية العلاجية، واستخدام الجراثيم في إنتاج الأسمدة الحيوية بدلاً من استخدام الأسمدة الكيميائية، وفي تنقية المياه من الملوثات، والتخلص من المخلفات العضوية، وتصنيع المركبات الكيميائية كالإنزيمات والكحول والحموض العضوية، والمضادات الحيوية واللقاح واستخدام الكائن الدقيق كناقل لبعض الجينات التي تحمل الصفات المرغوبة (الشكل 1).

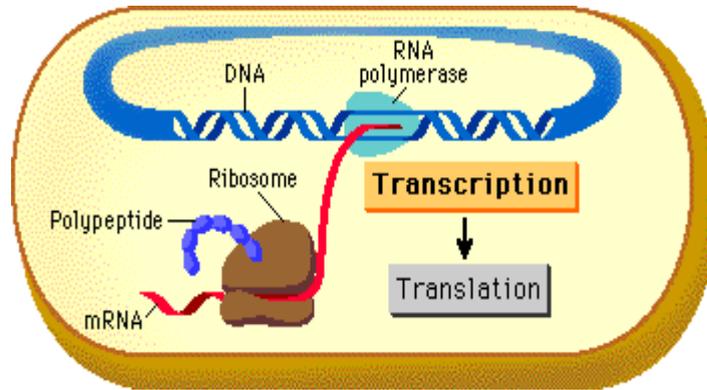


الشكل 1- بعض الفيروسات المستخدمة كناقل في العلاج الوراثي

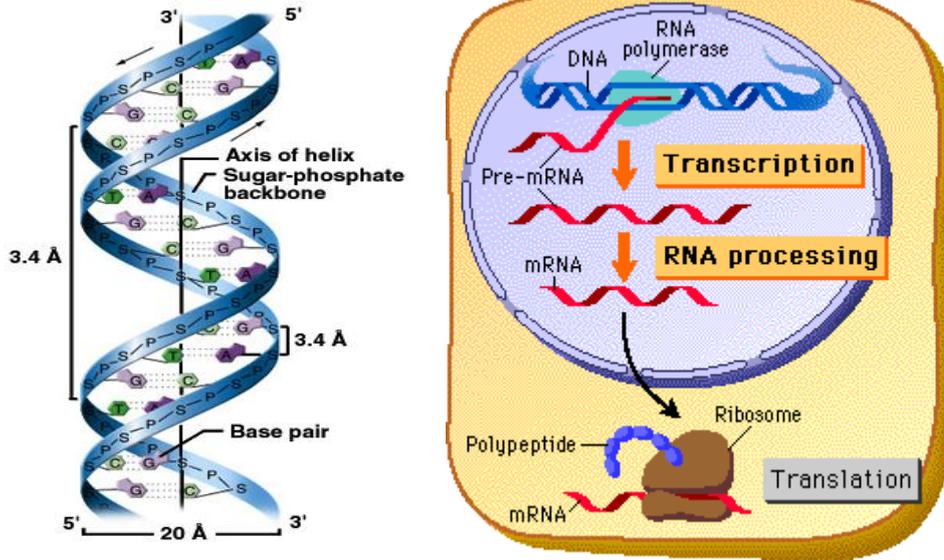
• وراثة الأحياء الدقيقة:

تقسم الأحياء إلى قسمين رئيسيين هما الأحياء بدائية النواة والأحياء حقيقية النواة، وتضم المجموعة الأولى الجراثيم والأركيا Archaea، بينما تضم المجموعة الثانية باقي الأحياء من الفطريات والنباتات والحيوانات. تتألف المادة النووية في بدائية النواة مثل البكتريا من DNA الخالي من الهيستونات، وهي جزيئات منفردة تأخذ شكل دائري عبارة عن سلسلتين ملتفتين حول بعضهما مرتبطتين بقواعد هيدروجينية توجد في أغلب الجراثيم، والجينوم Genome غير محاط بغشاء نووي (لا توجد نواة حقيقية) لذلك صنفت الجراثيم مع طلائعيات النوى، والجراثيم لا تملك متقدرات (جسيمات كوندرية) لكنها تحوي خمائر تنفسية خاصة في الغشاء السيتوبلازمي مسؤولة عن إنتاج الطاقة، ولا يوجد في هيولى الجراثيم جهاز غولجي لكنها تحوي أجسام ريبية (ريبوزومات).

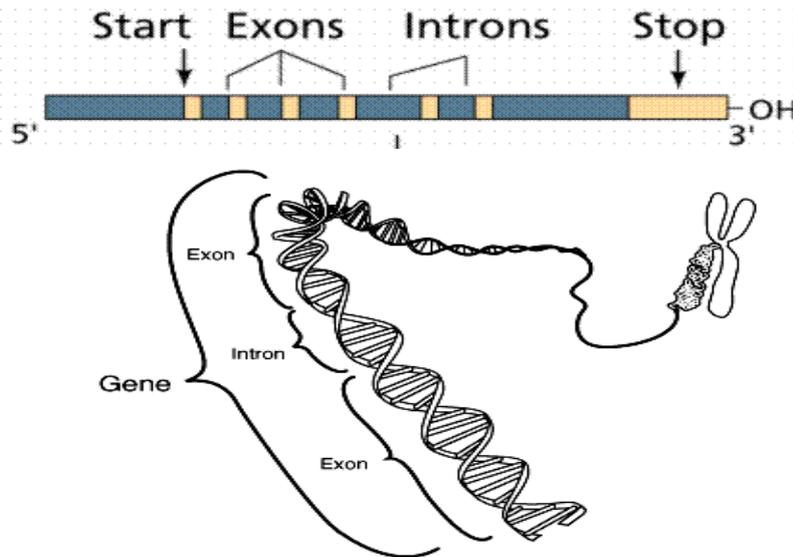
تتميز الأركيا وهي المجموعة الثانية من الأحياء بدائية النواة بالعيش في ظروف متطرفة كما تعيش في القناة الهضمية للحيوانات المجترة بشكل تعايشي مع أحياء أخرى متباينة التخمر، وهذه المجموعة ذات أهمية كبيرة في التقنية الحيوية نظراً لأن بعضها يستطيع العيش في درجات حرارية أكثر من 100°م لذلك تكون إنزيماتها ثابتة حرارياً كما في استخدام إنزيم إكثار الحمض النووي (DNA Taq polymerase) في تقنيات PCR المنتج من جراثيم *Thermus aquaticus*.



تتميز الأحياء حقيقية النواة باحتوائها على النواة أي أن مادتها الوراثية محاطة بغشاء يُظهر نضوحية انتقائية بسبب وجود ثقب تتكون من معقدات بروتينية تسيطر على دخول المواد وخروجها من النواة، وتتركب مادتها النووية من DNA الذي يترتب بشكل حلزوني مزدوج متصل بالهيستونات (وهي بروتينات قاعدية)، وتحوي حقيقيات النواة على النوية الغنية بالحمض النووي RNA وهي مكان تركيب RNA الريبوزومي.



إن كمية DNA قد تحدد كمية المعلومات التي يمكن أن تشفر لها لذلك فإن جينات الخلايا حقيقية النواة تحوي على الإكسونات Exons التي تمثل مناطق مشفرة، والإنترونات Introns التي تمثل مناطق غير مشفرة لكنها تساهم في عمليات تنظيم التعبير الجيني ونسخ RNA، وبما أن المورثات في حقيقيات النوى تحوي على الإنترونات والإكسونات فلا يمكن استنساخها وربطها بنقل كالبلاسميد وإدخالها للخلية الهدف لذلك يجب التخلص من الإنترونات وهذا الإجراء يحدث ضمن الخلية الحية فقط وبالتالي نلجأ إلى تقنية DNA المتمم Complement DNA التي تعتمد على استخلاص RNA المرسل ثم تحضير DNA باستخدام إنزيم النسخ العكسي Reverstrascriptase، ومن الأحياء الدقيقة حقيقية النواة التي لها دور مهم في التقنية الحيوية هي الخمائر والفطريات التي تنتج العديد من المواد مثل الكحولات والحموض العضوية والأمينية وغيرها.



يجب أن تمتلك الأحياء الدقيقة أنظمة إصلاح لمادتها الوراثية لأن أي ضرر يصيب الجينوم يؤدي إلى كارثة على الخلايا إن لم تكن مميتة لذلك تحاول الأحياء التأقلم لتستمر بالحياة، وهناك العديد من العوامل البيئية التي تؤثر على الخلايا أهمها دخولها في طور الاستقرار حيث تزداد الأعداد والفضلات مما يؤدي إلى ظهور الطفرات إضافة إلى عوامل بيئية أخرى كالأسعة والجفاف والتعرض للمواد الكيميائية والمضادات الحيوية وغيرها، ومن أهم عمليات إصلاح المادة الوراثية ما يلي:

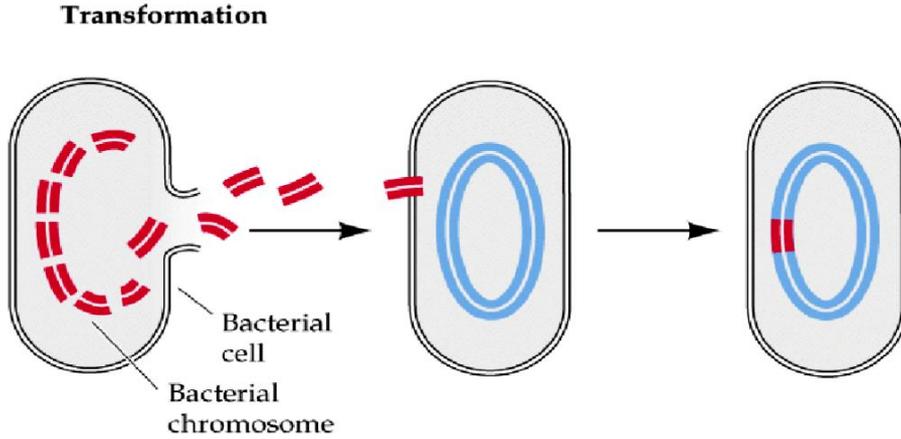
- 1- الإصلاح الضوئي Photoreactivation بمساعدة حمض الفوليك كمتعم إنزيمي.
- 2- الإصلاح الاستتصالي Excision repair بمساعدة الإنزيمات القاطعة المصححة.
- 3- نظام إصلاح عدم التلائم Mismatch repair system (MMR): يتكون من عدة جينات وهو مسؤول عن الإصلاح بعد التضاعف ويساهم في عملية التطور وتجنب الطفرات.
- 4- نظام الاستغاثة Save Our Souls (SOS): وهو منظم كبير عام يستجيب للضرر الذي يحصل في DNA مؤدياً إلى تحفيز حوالي 20 جين تعمل في مسارات مختلفة للإصلاح، وعندما يتعطل هذا النظام بالطفرات تموت الخلايا.

• تبادل المعلومات الوراثية عند الأحياء الدقيقة:

تنتقل الصفات الوراثية في الأحياء بنوعين من الانتقال هما العامودي والأفقي أو الجانبي ويمثل الانتقال العامودي توارث المواد الوراثية من الآباء إلى الأبناء بينما يمثل الانتقال الجانبي Lateral gene transfer تبادل المعلومات وإعادة ترتيب جينومات الأحياء وهو المستعمل في الهندسة الوراثية وتحسين السلالات ويمكن أن يحصل طبيعياً يساعد في تطور الأحياء بسرعة أكبر من حدوث الطفرات، وهذا أدى إلى ظهور البلاسميدات المسؤولة عن مقاومة الأدوية والمضادات الحيوية وزيادة ضراوة بعض الجراثيم الممرضة كالسالمونيلا *Salmonella*. إن الكائنات الحية الدقيقة في الطبيعة تتبادل المعلومات الوراثية فيما بينها بأساليب وطرائق مختلفة هي:

1- التحويل Transformation:

تتحلل الأحياء الدقيقة بعد موتها ويتجزأ الحمض النووي DNA إلى قطع صغيرة تنتقل إلى خلية جرثومية ثانية مندمجة مع الدنا الخاص بها مانحة الخلية الصفات الوراثية المحمولة عليها، وقد لوحظت هذه الظاهرة في عدد كبير من جراثيم *Bacillus*، واكتشفت عملية التحويل في جراثيم *Streptococcus pneumonia*.

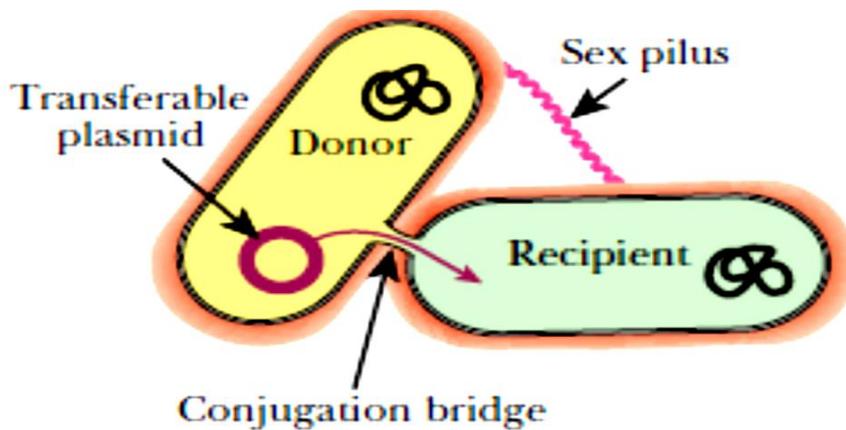


2- التوصيل أو التمرير **Transduction**:

هو انتقال جزء من الدنا من جراثيم إلى أخرى بواسطة العاثي الجرثومي Bacteriophage عند إصابة خلية جرثومية جديدة بهذا العاثي وبذلك تكون الجراثيم قد اكتسبت الصفات الجديدة، وليس بالضرورة أن تكون القطعة المنقولة من الدنا الجرثومي فقد تكون جزء من البلاسميد ولاسيما البلاسميدات المقاومة للمضادات الحيوية كما يحدث في جراثيم *Stahylococcus aureus* التي اكتسبت صفة المقاومة للبنسيلين بهذه الطريقة.

3- الاقتران **Conjugation**:

هي عملية اقتران خليتين من الجراثيم تسمى أحدهما الواهبة Donor لاحتوائها على بلاسميد الخصوبة يرمز لها (F^+)، أما الخلية الجرثومية الثانية فتدعى بالخلية المستلمة Recipient التي تكون خالية من بلاسميد الخصوبة يرمز لها (F^-)، وعند انتقال البلاسميد تصبح الخليتين من نوع (F^+)، وشوهدت هذه الظاهرة في جراثيم *E.coli*، *Pseudomonas*، و *Vibrio*.



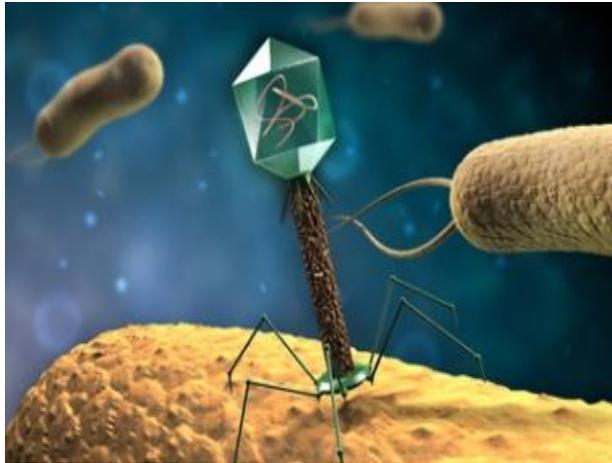
ترتبط المادة الوراثية لأي كائن حي مع قطعة من DNA لكائن حي آخر (من النوع نفسه أو من نوع آخر) بإحدى الآليات الثلاث (التحويل والتوصيل والإقتران) بشكل طبيعي أو عبر طرائق مخبرية مقصودة تسمى الدنا المطعوم Recombinant DNA، والخلية الحاوية على مادة وراثية من هذا



النوع تسمى خلية ذات توليفة وراثية جديدة (معدلة وراثياً). إنَّ تكوين توليفات وراثية جديدة بين الكائنات الحية يشكل أساس علم الهندسة الوراثية الذي يتخطى حاجز النوع والجنس فقد ساعدت الهندسة الوراثية في تحسين النباتات والمحاصيل كالرز الذهبي الذي تمَّ تعديله لزيادة محتواه من فيتامين A والحديد، وإنتاج الذرة الشامية ذات القيمة الغذائية العالية من الأحماض الأمينية المشابهة من حيث القيمة الغذائية للبروتين الحيواني لإنقاذ ملايين البشر والحيوانات.

• العاثيات الجرثومية Bacteriophages (آكلات الجراثيم):

فيروسات تتضاعف داخل خلايا الجراثيم كطفيليات مجبرة فهي خاملة خارج الخلايا، وتعد من الوسائل الفعالة في دراسة الفيروسات وفي الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية منها العاثي لمدا (λ). تتكون العاثيات من غلاف بروتيني يحوي داخله الحموض النووية RNA أو DNA، ويتراوح جينوم العاثي من 2-200 كيلو قاعدة على شكل أشرطة مفردة أو مزدوجة، وهو مثل البلاسميدات لكنه يشفر لبروتينات الغلاف الفيروسي وبروتينات أخرى غير تركيبية ضرورية لتجمع جزيئات العاثي.



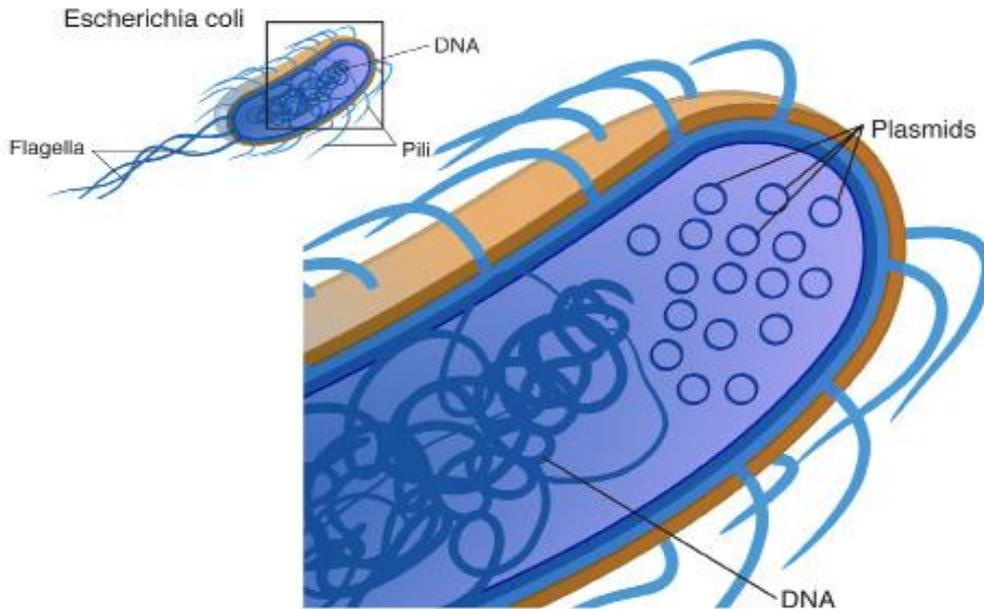
تصنف العاثيات إلى مجموعتين هي الضارية Virulent والمعتدلة Temperate، وهناك اختلاف في سلوك العاثي داخل المضيف فالعاثي Phage1 الذي يصيب الجراثيم *E. coli* يندمج مع صبغي الخلية ويتضاعف معه بينما العاثي الأولي Prophage P1 الذي يصيب الجراثيم نفسها

يتضاعف كبلاسميد بشكل مستقل. من الجدير بالذكر أن العاثيات يمكن أن تمتلك جينات ليس لها علاقة بتحليل الخلايا ويسمى التعبير عن هذه الجينات بتحول العاثي Phage conversion ومن هذه الحالات المهمة من الناحية الطبية ما يحدث في إنتاج سم الخناق في جراثيم *Corynebacterium diphtheriae*، وإنتاج سم البوتولينوم في جراثيم *Clostridium botulinum*، وإنتاج سموم الشيغا Shiga-toxins في جراثيم *E. coli*.

• البلاسميدات Plasmids:

عبارة عن دنا بلاسميدي غير دنا الصبغيات وهو ليس ضروري لحياة الجراثيم يتضاعف باستقلالية ويحمل صفات وراثية إضافية فهو من النواقل المهمة في تجارب الاستنساخ وظيفته:

- 1- مقاومة المضادات الحيوية.
- 2- يساعد البكتريا في إنتاج الإنزيمات وإفراز بعض السموم كالبكتريوسينات Bacteriocins وهي بروتينات تعمل على تحطيم الجراثيم المنافسة.
- 3- يجعل البكتريا مقاومة لدرجات الحرارة المتطرفة وفيه جينات تكوين العقد الجذرية وتثبيت الأزوت في البقوليات، وجينات تخمير اللاكتوز وتحليل البروتين في جراثيم حمض اللاكتيك.
- 4- يحمل صفة التزاوج بين الجراثيم كالجينات المسؤولة عن اقتران خلايا الجراثيم وتبادل المعلومات الوراثية.



التأشيب **Recombination**:

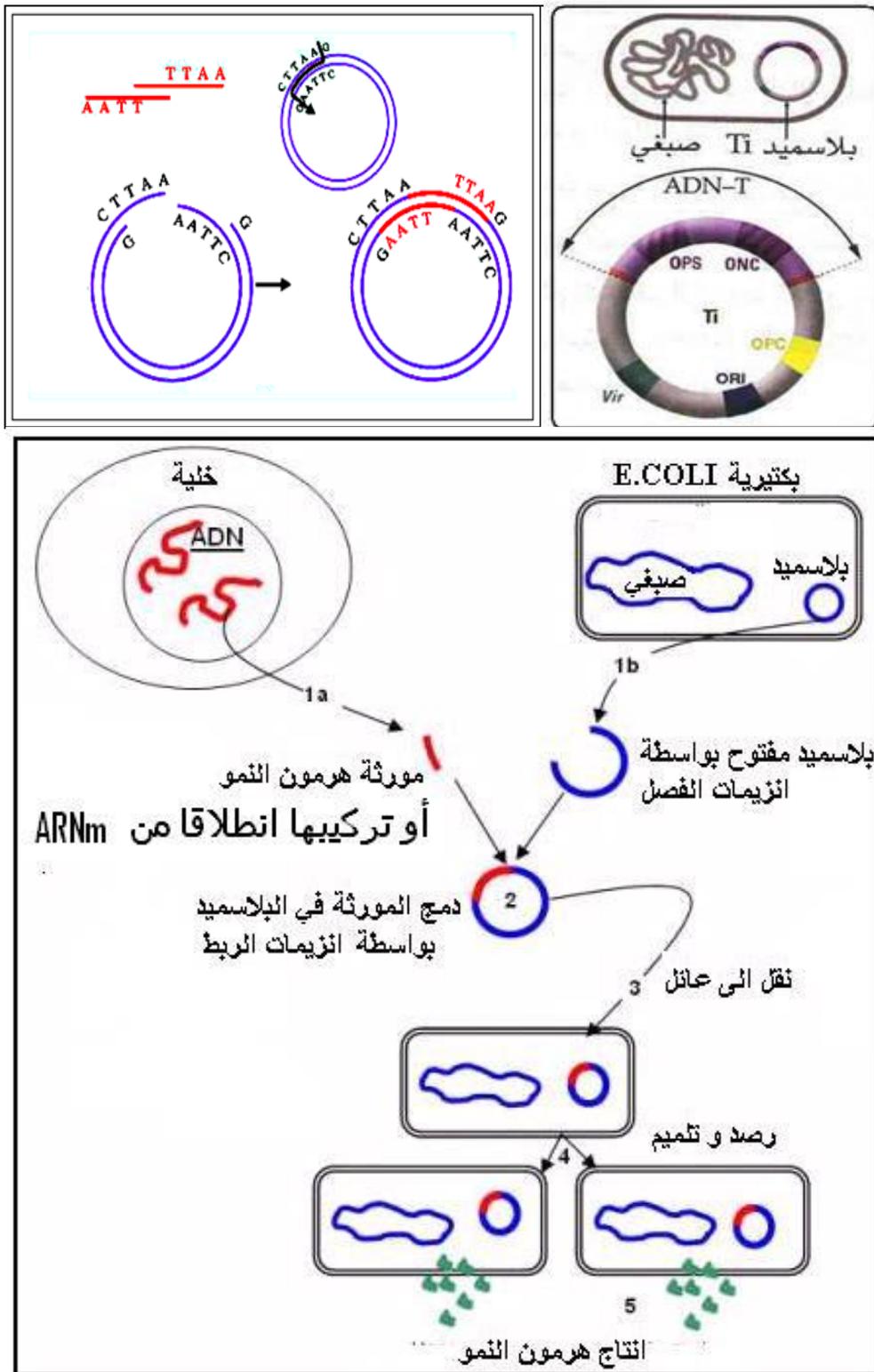
تمثل عملية التأشيب إعادة ترتيب المواد الوراثية في الخلايا لإنتاج جينومات جديدة وتحدث أيضاً أثناء عملية إصلاح الأضرار في DNA.

تشمل عملية استنساخ الجينات Gene cloning خطوات رئيسة هي (الشكل 2):



- 1- استخلاص الدنا والحصول على الجينات المرغوبة بواسطة إنزيمات القطع وعزلها بالرحلان الكهربائي.
- 2- ربط الجينات المطلوبة بنواقل ملائمة.
- 3- استعمال خلايا مضيفة لتكثير النواقل الهجينة وغالباً تكون جراثيم *E. coli* نظراً لمعرفة الخلفية الوراثية لهذه الجراثيم.
- 4- إدخال النواقل المحملة بالجين المطلوب إلى الخلايا المستهدفة لإجراء التحوير عليها أو نكتفي بالخطوة الثالثة إذا كانت العملية تهدف إلى إنتاج مادة معينة.
- 5- الكشف عن الخلايا التي اكتسبت الجين المطلوب.

تقدم التقنية الحيوية بسلحتها الفعال وهو الهندسة الوراثية والدنا المأشوب الكثير للجوانب الزراعية منها هندسة النباتات لإنتاج محاصيل حبوب متكاملة القيمة الغذائية، كما تحاول نقل جينات تثبيت النتروجين إلى النبات نفسه وبذلك تحصل استقلالية للنباتات عن الجراثيم المثبتة للنتروجين إضافة إلى محاولة نقل هذه الفعاليات للنباتات التي لا تتعايش مع الجراثيم المثبتة للنتروجين مثل نقل الجينات إلى العائلة النجيلية التي تضم محاصيل الحبوب، وتقدم التقنية الحيوية المبيدات الحيوية Biopesticides لحماية النباتات، والأدوية لمعالجة الحيوانات، وتمكن العلماء من تحسين الأعلاف وزيادة كفاءتها بعد الحصول على إنزيم الفيتاز من الفطر *Aspergillus niger* وهذا الإنزيم يساعد على تلافي مجموعة من المشاكل مثل عدم قدرة الحيوان على هضم العلف وامتصاص المعادن لتأثير بعض المركبات التي تنتج أثر عصبي على الحيوان أو قد تحدث أمراضاً أو تقلل من وضع البيض في الدواجن.



الشكل 2- عملية التعديل الوراثي واستنساخ الجينات Gene cloning

انتهت المحاضرة