



الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

التقنية الحيوية الميكروبية Microbial Biotechnology (الجزء النظري)

المحاضرة السابعة

إعداد

الدكتور عبد الواحد الططي



جامعة حماة 2018 - 2019

الأحياء الدقيقة المهمة في التقنية الحيوية

أولاً- الجراثيم المهمة في التقنية الحيوية:

هناك بعض الجراثيم ذات أهمية مميزة في التقنية الحيوية مثل:

Streptomyces ، *Bacillus subtilis* ، *Pseudomonas putida* ، *Escherichia coli*
Streptococci ، *Lactobacilli* ، *Corynebacterium glutamicum* ، *coelicolor*

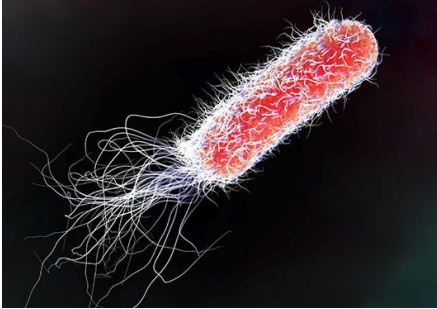
Escherichia coli



جراثيم رمية توجد في الأمعاء الغليظة للثدييات، وتنتمي إلى مجموعة الجراثيم المعوية سالبة غرام ذات شكل عصوي تحمل سياطاً، وتولّد الطاقة تحت شروط النمو اللاهوائي عن طريق التخمر وتشكل حموضاً، ويوجد الأكسجين تؤمن الطاقة

من خلال السلسلة التنفسية، ويبلغ زمن تضاعفها بالشروط المثالية حوالي 20 دقيقة. تستعمل في التقنية الحيوية ككائن مضيف في التعبير عن البروتينات مثل الإنسولين، وهرمون النمو، والأجسام المضادة، وكذلك تستعمل في تجارب التعديل الوراثي Cloning.

Pseudomonas putida



هي الزائفة عصيات هوائية سالبة غرام لها سياط قطبية تعيش هوائياً في الماء وتتمتع بإمكانية وراثية لتحطيم المركبات العطرية. تستعمل في التقنية الحيوية في الدراسات البيئية.

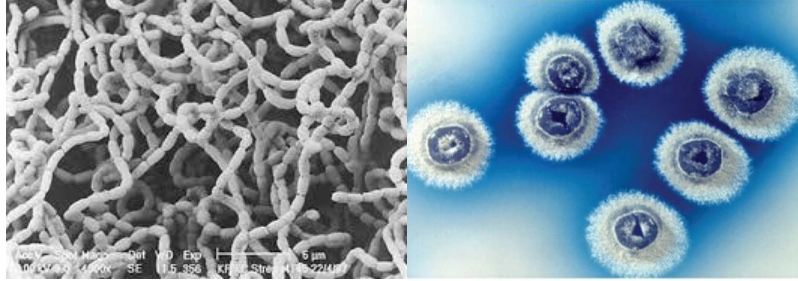
Bacillus subtilis



عصيات إيجابية غرام دون سياط تعيش هوائياً في التربة، وفي الظروف غير الملائمة تشكل أبواغاً ساكنة مقاومة للحرارة، وتعتبر في التقنية الحيوية الكائن الحيّ المفضل لإنتاج الإنزيمات خارج خلوية كالبروتياز والأميلاز.

Streptomyces coelicolor:

هي جراثيم إيجابية غرام تعيش في التربة تتبع لجنس Actinomycetes تتكاثر على شكل خيوط جرثومية متشابكة، وتستخدم في التقنية الحيوية لإنتاج الإنزيمات المستخدمة في تحطيم السيليلوز والكتينين.

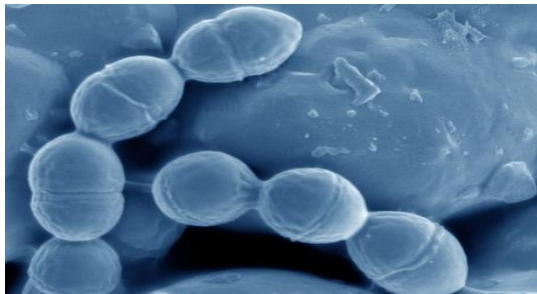
***Corynebacterium glutamicum***:

هي أحد أنواع جراثيم Coryneform الوتدية التي تشمل أنواعاً ممرضة مثل الوتدية الخناقية *C. diphtheria* إيجابية غرام تعتبر سلالات مهمة لإنتاج الحموض الأمينية كالغلوتامين واللايسين.

**العصيات اللبنية *Lactobacilli***:

عصيات إيجابية غرام تستخدم أفراد المجموعة في العديد من العمليات الإنتاجية مثل إنتاج الألبان والمخللات والسيلاج، وتحوي مجاميع متباينة التخمر وأخرى متجانسة التخمر.

تنتج الجراثيم حمض اللاكتيك من تخمر اللاكتوز، إضافة إلى مركبات نكهة متطايرة مثل الأسيتالدهيد وثنائي الأستيل والكحولات، ويعد الأسيتالدهيد أهم مركبات النكهة في اللبن ومركب ثنائي الأستيل هو مركب النكهة في الزبدة. درست المجموعة بإسهاب لأهميتها الصناعية والعلاجية لأن معظم صفاتها بلاسميدية.

**المكورات السبحية *Streptococci***:

درست المجموعة من الناحية الوراثة بشكل مفصل نظراً لأهميتها الاقتصادية، وقد غيرت

تسميتها إلى *Lactococcus* (مكورات لبنية) ماعدا جراثيم *Streptococcus thermophilus*،

واستعملت طرائق الهندسة الوراثية لتغيير بعض مواصفاتها لأنها أكثر طواعية من العصيات اللبنية، ومن الصفات التي نقلت بنجاح إلى المكورات اللبنية ما يلي:

- زيادة إنتاج النايسين Nisin وهو بروتين يعمل على تحطيم الجراثيم المنافسة.
- مقاومة الخلايا للعائيات.

- تطوير سلالات لتحويل مصّل اللبن (الشرش) إلى منتجات مسوقة بعد تعديل النكهة.
- تحضير سلالات ملائمة لمستبتات ومزارع قابلة للتجميد والتجفيد والتجفيف بالريزاد.
- إنتاج سلالات ذات فوائد علاجية للإنسان.

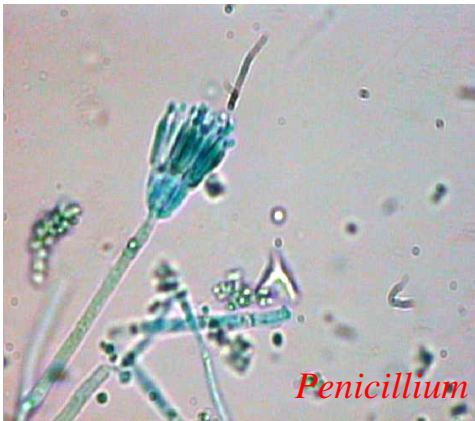
واستعملت خلايا الجنس كمضيف لنقل الصفات من أحياء أخرى منها:

- إنتاج مركبات النكهة مثل نكهة الموز، والأناناس، والفريز.
- إنتاج بروتينات التحلية أي حلوة المذاق.
- استعملت كمضيف لإنتاج البروتينات العلاجية.

ثانياً- الفطريات المهمة في التقنية الحيوية:

تمتلك الفطريات دوراً مهماً في التقانة الحيوية خصوصاً في تحضير المنتجات الغذائية المخمرة وإنتاج المضادات الحيوية والإنزيمات، وتلعب الفطريات دوراً أساسياً في هدم مركبات الكربون في الغلاف الحيوي كتحليل الأخشاب وتشكيل أحماض الهيوميك Humic acids، وتترافق الفطريات الجذرية Mycorrhizal fungi مع جذور النباتات تساعد على امتصاص المغذيات، ولكن هناك فطريات أخرى مثل الأعفان ممرضة للنبات والحيوان والإنسان وتفسد الغذاء. تعدّ الأجناس التالية ذات أهمية كبيرة في التقنية الحيوية هي:

Basidiomycetes, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*



Penicillium

إنّ الفطر *Penicillium notatum* والفطر المشابه له

Penicillium chrysogenum لهما أهمية كبيرة

صناعياً لأنهما يصنعان البنسيلين ومضادات اللاكتام الحيوية

والنوعان *P. roqueforti*, *Penicillium camembertii*

لهما دور في إنتاج وإنضاج الجبنة.

:Aspergillus

يستعمل النوع *Aspergillus oryzae* في الإنتاج الصناعي للإنزيمات خارج خلوية كالبروتياز والأميلاز المهمة في صناعة الجلود والألبان والخبز، وله دور تقليدي في البلدان الآسيوية لتصنيع منتجات غذائية كصلصة الصويا وهو المفضل لإنتاج الإنزيمات المأشوبة Recombinant، أما النوع *Aspergillus niger* فهو المفضل لإنتاج حمض الليمون Cetric acid وحمض الغلوكونيك Gluconic acid وإنزيم الفيتاز الذي يساعد على تلافي مجموعة من المشاكل

مثل عدم قدرة الحيوان على هضم العلف وامتصاص المعادن. ومن الجدير بالذكر أنّ بعض أنواع الجنس *Aspergillus* (مثل النوع *Aspergillus flavus*) قادرة على إفراز السموم الفطرية مثل سموم الأفلاتوكسينات التي تسبب مرض السرطان والعقم وانخفاض في إنتاج الحليب والبيض وغيرها.

**:Rhizopus and Mucor**

أهمها النوع *Rhizopus nigricans* (عفن الخبز الأسود) والنوع *Rhizopus oryzae* وأنواع مشابهة من الجنس *Mucor* تنمو على المواد العضوية المتحللة وتصنع عدداً كبيراً من أنزيمات التحلل Hydrolases خارج خلوية.

:Basidiomycetes هي الفطريات الدعامية منها فطريات المشروم القابلة للأكل مثل *Agaricus campestris* المنتشر في سورية.

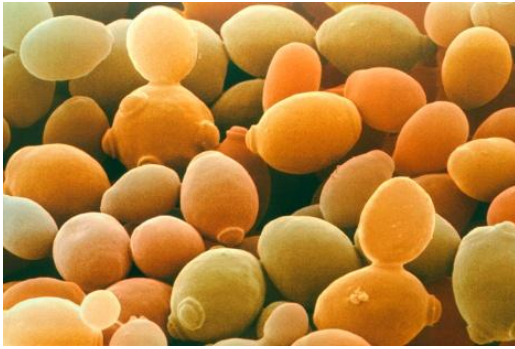


ثالثاً- الخمائر المهمة في التقنيات الحيوية:

الخمائر Yeast مجموعة من الفطريات وحيدة الخلية منها المكونة للأبواغ الأسكية الزقية Ascomycetes، ومنها المكونة للأبواغ الدعامية Basidiomycetes، ومنها غير المكونة للأبواغ. تتكاثر الخمائر بالتبرعم Budding أو الانقسام البسيط Fission، ويمكن لخلايا الخميرة أن تنمو على أرقام حموضة تصل إلى pH 1.5 وتركيز كحول الإيثانول يبلغ 18 %، كما يمكن لبعضها تحمل تركيز السكر يصل إلى 50 % أو أكثر. توجد الخمائر في بيئات طبيعية مختلفة ولكل جنس منها بيئة مفضلة مثلاً الجنس *Zygosaccharomyces* يفضل التمر والعسل أو المواد ذات التركيز المرتفع من السكر، ويوجد الجنس *Debaromyces* في المخلاتات واللحوم المحفوظة كالسجق وغيرها، كما أنّ الجنس *Rhodotorula* يكثر في الهواء الجوي، ويمكن فصل *Saccharomyces* من الألبان المتخمرة، وتوجد أنواع في جسم الإنسان مثل *Candida* تسبب التهابات جلدية. تضم الخمائر المهمة في التقنية الحيوية مايلي:

Sacharomyces cerevisiae، *Candida utilis*، *Candida albican*،

Schizosaccharmoyces pombe، *Hansenula polymorpha*، و *Pichia pastoris*.

***Sacharomyces cerevisiae***:

هي خميرة الخباز يمكنها التكاثر بالصيغة الصبغية الأحادية Haploid أو الثنائية Diploid، وبالتالي فهي تقدم كائناً ممتازاً للأبحاث الوراثية. يجري التكاثر اللاجنسي فيها عن طريق تشكيل الأبواغ الكونيدية، ويحدث التكاثر الجنسي عند اندماج خليتين تناسليتين أحاديتي الصيغة الصبغية متبوعاً بالانقسام المنصف لتشكل أربعة أبواغ زقية Ascospores أحادية الصيغة الصبغية. تحتوي الخميرة على بلاسميد طبيعي 2µm، وقد تمّ تطوير نواقل نسخ عديدة لتحويل الخميرة يسمح بعضها بتضاعف الجينات الغريبة خارج صبغي الخميرة مثل (YRP = بلاسميدات الخميرة المضاعفة Yeast Replicating Plasmids) أو (YEP = بلاسميدات الخميرة الإيبيزومية Yeast Episomal Plasmids)، بعضها يقوم بدمج الجين الغريب في الصبغي مثل (YIP = بلاسميدات الخميرة المندمجة Yeast Integrating Plasmids).

أما صبغيات الخميرة الصناعية YAC (Yeast Artificial Chromosome) فتسمح بنسخ قطع كبيرة من DNA بحجم 600-1400 Kbp، وقد استعملت كثيراً هذه الصبغيات لتحضير مكتبة الجينومات لكنها تميل إلى إعادة الالتحام لذلك تم استبدالها بصبغيات BACs. تبدي جينات الخميرة تجانساً كبيراً مع الجينات البشرية لذا فقد نفعت الخميرة كنظام نموذجي للدراسات الاستقلابية والتنظيمية، وتستعمل الخميرة في تحضير العديد من المنتجات كالحبز والبيرة والإيثانول إضافة إلى ذلك أصبحت الخميرة المأشوبة مضيئاً مهماً لتصنيع الإنسولين والإنترفيرون واللقاحات.



Candida utilis

تختلف هذه الخميرة عن *Sacharomyces* بتشكيل المشيعة Mycelium لكنها تتكاثر لاجنسياً بالبرعمة فقط، وقد استعملت في التقنية الحيوية لإنتاج إنزيمات خارج خلوية فهي تستطيع النمو باستخدام مركبات أولية غير تقليدية مثل صابون السلفايت، وبعض سلالاتها ممرضة للإنسان مثل *C. albicans*.



Hansenula polymorpha و *Pichia pastoris*

تنمو كلاهما على الميثانول كمصدر وحيد للكربون Methylotrphic تستعمل ككائنات مضيئة في تجارب النسخ حيث جرى عن طريقها التعبير عن بروتينات متنوعة كالليباز والإنترفيرون.



Schizosaccharmoyces pombe

عزلت أول مرة في سواحل بومبي وتنتشر في المناطق الحارة، وهي تشبه *S.cervisiae* تتوزع جيناتها على ثلاثة صبغيات فقط.



نمو الأحياء الدقيقة

The Microbial Growth

إنّ نمو الأحياء في الطبيعة يختلف عن نموها في المختبر فالجراثيم تتحسس الظروف البيئية المحيطة بأنظمة تحسس مكونة من قسمين أهمها بروتين موجود في الغشاء الخلوي بارزاً إلى الخارج ينقل الإشارة إلى الجزء الداخلي منه لتستلمها أنظمة أخرى وهي القسم الثاني من نظام التحسس تعمل على تحديد الإشارة وتحفيز الجينات أو كبحها حسب الإشارة الواردة فتقوم بتنظيم عمليات تركيب البروتين.

تتكاثر الجراثيم بطريقة الانشطار الثنائي binary fission حيث تنقسم الخلية الواحدة إلى خليتين متماثلتين وتبعاً لذلك فإنّ أعداد الجراثيم تزداد بشكل أسي (لوغاريتمي منتظم) عبر فترات زمنية منتظمة (2^n)، فعند تلقيح وسط غذائي بعدد من الجراثيم وحضن الوسط في درجة حرارة مثلى للجراثيم فإنّ هذه المجموعة من الخلايا تمرّ بمراحل تدعى أطوار النمو هي (الشكل 3):

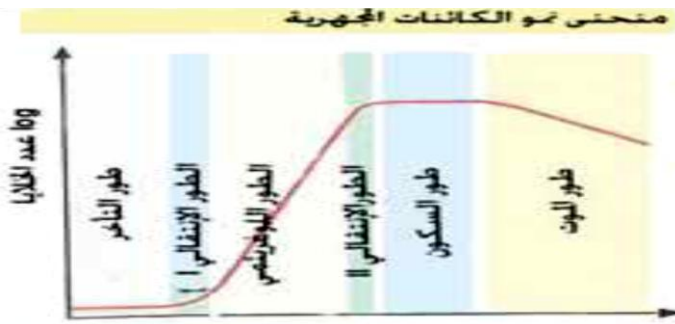
1- الطور التمهيدي: وهو طور التأقلم تبقى فيه أعداد الجراثيم ثابتة لكن تنمو كل منها فتزداد كتلتها وتتضاعف مكوناتها من الحموض النووية والإنزيمات والأجسام الريبية ومركبات الطاقة، ويختلف زمن هذه المرحلة حسب العوامل التالية:

- أ- نوع الجراثيم وحالتها الفيزيولوجية.
- ب- نوع الوسط الغذائي الجديد ومدى التشابه بينه وبين الوسط الذي كانت فيه الجراثيم.
- ج- مدى التشابه بين الظروف البيئية للوسطين والعوامل الفيزيائية كدرجة الحرارة و pH.
- د- الطور الذي كانت فيه الجراثيم عند النقل، فالجراثيم التي تكون في طور النمو اللوغاريتمي تتجاوز طور التمهد بسرعة وبزمن قصير.

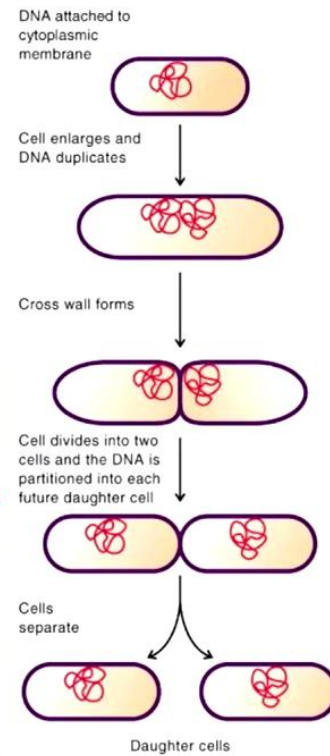
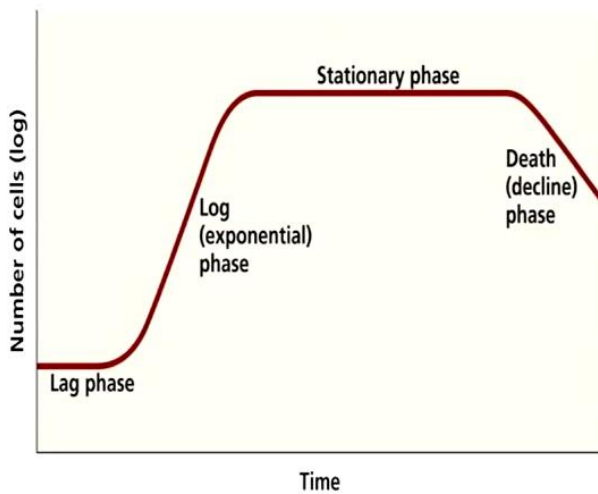
2- الطور اللوغاريتمي: تنقسم خلايا الجراثيم في هذا الطور بأقصى معدلاتها، ويمكن ملاحظة وجود طوري نمو لوغاريتميين مفصولين بطور تمهيدي لازم لتحريض أنزيمات جديدة بعد نضوب مصدر الكربون الأول في حالة استخدام أوساط مغذية معقدة.

3- طور الثبات: تتباطأ معدلات نمو الجراثيم في المرحلة الأخيرة من الطور اللوغاريتمي فعند زيادة عدد الخلايا تبدأ ظاهرة تحسس الزحام ويكون العدد عموماً في الجراثيم حوالي 10^7 / مل كفاياً لحدوث الظاهرة، ثم يصبح النمو ثابتاً، ولا يلاحظ زيادة أو نقص في أعداد الجراثيم الحية.

- إنّ ثبات عدد الجراثيم في هذا الطور يعود إلى تساوي معدلات النمو مع معدلات الموت، وإلى توقف الخلايا عن الانقسام مع عدم تعرضها للموت وذلك بسبب العوامل التالية:
- أ- حصول الازدحام الفيزيائي.
 - ب- انخفاض المواد الغذائية والأكسجين وعوامل النمو في الوسط.
 - ج- تراكم النواتج الاستقلابية السامة خلال النمو.
- 4- **طور الموت:** هو طور التدهور للوسط من حيث نفاذ المواد الغذائية وتأثير النواتج الثانوية للجراثيم وتغيير العوامل الفيزيائية كالرقم الهيدروجيني pH، وتؤثر جميع هذه العوامل على الجراثيم مؤدية إلى هلاكها بشكل أسي.



- Cell Division
- Generation time
- Phases of growth

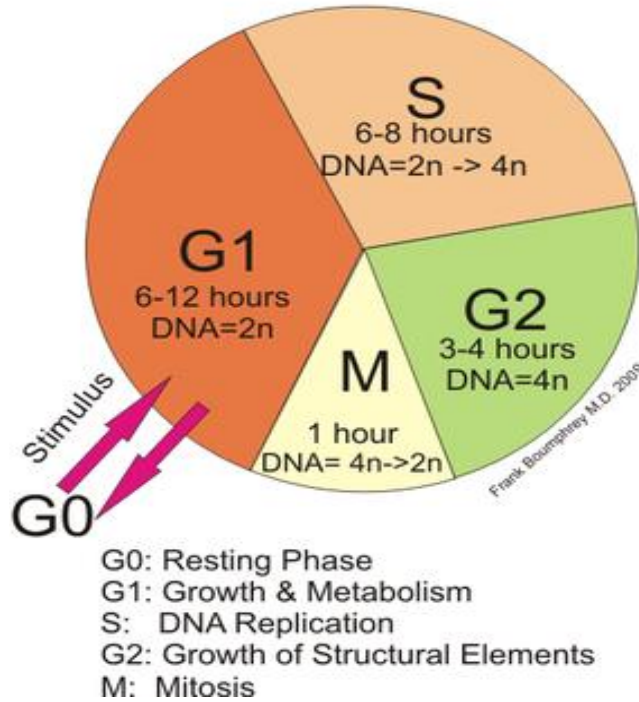


الشكل 3- أطوار نمو الأحياء الدقيقة

يلاحظ أنّ طور التآقلم والطور اللوغاريتمي يرتبطان بعمليات النمو والبناء وتسمى بالأطوار المرتبطة بالنمو لذلك في حالة استخدام الأحياء في هذه الأطوار تكون المواد الناتجة هي مواد استقلاب أولية، منها إنتاج الحموض العضوية والأمينية والفيتامينات والكتلة الحيوية. أما في الجزء الثاني من محور النمو خصوصاً طور الاستقرار أو الثبات وطور الموت فتسمى بالأطوار غير المرتبطة بالنمو والمواد التي تنتج عنها هي مواد استقلاب ثانوية منها إنتاج المضادات الحيوية والسموم والصبغ وغيرها. يرتبط إنتاج مواد الأيض أو الاستقلاب الثانوية بانخفاض معدلات النمو لذلك يمكن تغيير معدلات النمو بتعديل المستتباتات أو المزارع بعد بناء كتلة حيوية مناسبة وذلك بخفض درجة الحرارة أو إضافة مواد غذائية بطيئة الاستهلاك من قبل الأحياء، وعندها تصبح الخلايا بمثابة مصانع للمواد المراد إنتاجها (مفاعلات حيوية).

تنمو الأحياء حقيقية النواة بدورة معقدة تسمى دورة الخلية، وتمرّ بطورين أساسيين هما الطور البيني وطور الانقسام الخيطي حيث يشكل الانقسام الخيطي وانقسام السيتوبلازما حوالي 5% من مدة دورة الخلية أما الباقي 95% فتقضيهِ الخلايا في الطور البيني، ويحدث تضاعف DNA

Eukaryotic Replication Cycle (S). في طور معين (S). (Times are for Cells Growing in Culture)



انتهت المحاضرة