

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

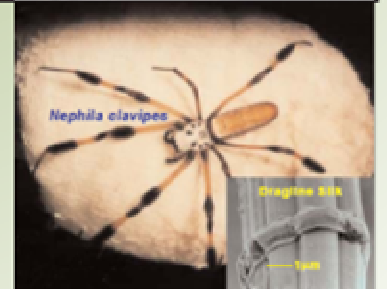
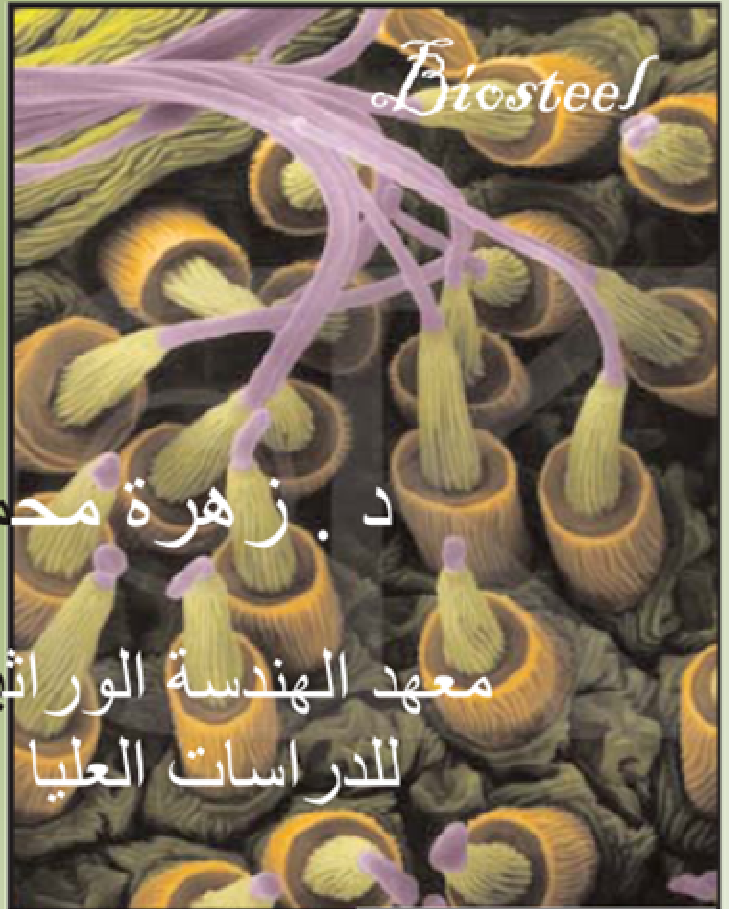
التقنية الحيوية الميكروبية

(توجهات جزئية)

د. زهرة محمود الخفاجي

معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية
للدراسات العليا / جامعة بغداد

2008



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد
معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية
للدراستات العليا

التقنية الحيوية الميكروبية

(نُجْمَان جَزِينَة)

تأليف الدكتورة

زهرة محمود الخفاجي

2008

يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا

فَلَا أَقْسِمُ بِمَا تُبْصِرُونَ ۖ وَمَا لَا تَبْصِرُونَ ۚ إِنَّهُ لَقَوْلُ رَسُولٍ كَرِيمٍ ۝٤٠

سورة الحاقة

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ۝٤١ وَمَا أَمْرُنَا إِلَّا وَاحِدَةٌ كَلَمْحٍ بِالْبَصَرِ ۝٤٢

سورة القمر

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

اللَّهُمَّ صَلِّ وَسَلِّمْ عَلَى
رَسُولِكَ مُحَمَّدٍ

اللهم صلِّ على واليه

ثم

اللهم فذكرى والدي رحمهما الله

شكر وتقدير

احمد الله حمدا طيبا مباركا فيه ، احمده كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه ... واصلي واسلم على نبيينا الكريم الذي أوصل رسالة ربنا " اقرأ باسم ربك الذي خلق ، خلق الإنسان من علق ، اقرأ وربك الأكرم ، الذي علم بالقلم ، علم الإنسان ما لم يعلم " ، وعلى آله الطيبين الطاهرين وأصحابه الغر الميامين ومن تبعهم بإحسان الى يوم الدين

يطيب لي ان أتقدم بشكري بعد شكر الله سبحانه الذي ابتلى وانعم .. الى أخي بشير محمود.. الذي كان العون والسند وكان له التأثير الكبير في انجاز هذا العمل ، فكان يشد في عضدي عندما يفتته التعب وتنهكه الأم الغريبة.... كان الروض الطيب الندي الذي أوي إليه عندما تحرقني الحياة وتهزني الأهوال فأرجو الله ان يجازيه عني وعن كل من ينتفع ولو بكلمة من هذا العمل الجزاء الأوفى ويجعله في ميزان حسناته .

كما أتقدم بالشكر والتقدير الى ابن أخي نذير بشير لمساعدته الكبيرة في التعامل مع عمليات الطبع وفهرسة الكتاب ورسم الأشكال وإعداد الجداول وإخراجها بالشكل الذي أرجو الله سبحانه ان تكون مقبولة فكان نعم المساعد المطواع معي وأبدى سعة كبيرة من الصبر والمهارة في التحكم في العمل .. اسأل الله القدير ان يوفقه في حياته وان يجزيه عني وعن الجميع الجزاء الأوفى

وأقدم بشكري الى كل من أعانني ولو بكلمة او خدمة غير مقصودة او دعوة صامتة وجزا الله الجميع خير الجزاء ...

زهرة الخفاجي
أب / 2007
دمشق

المقدمة

الكل يلحظ وخاصة في مجال التقنية الحيوية مدى التسارع المذهل والتطور الكبير الذي يصعب الإحاطة به ، اذ يدفع زخم الحياة الناس للعمل والعمل للوصول الى الأفضل ، يدفع العاملون لإصلاح ما دمر من جوانب الحياة وأصبح الإصلاح ربما طاغيا على التطور المباشر ... وفي هذا العمل حاولت ان أقدم بعض الجوانب البسيطة والأمثلة القليلة جدا وقطوف متواضعة لكل مجال ليكون منطلقا للعاملين ، فكل جانب من الجوانب المقدمة هي بمثابة أمثلة ، لان كل جانب يشمل معلومات تصعب الإحاطة بها بين دفتي كتاب ، وكل موضوع فيه من التفاصيل التي يعجز المرء الإحاطة بها إحاطة كاملة ، لذلك أرى ان القصور هو الصفة المميزة لما قدم ..

لقد واجهت بشكل كبير مشكلة التعريب ونقل المصطلحات الى العربية لان اغلب المصادر المراجع او المصادر هي ليست باللغة العربية .. وقد عجزت العديد من معاجم اللغة المتوفرة عن إيجاد كلمة مقابل المصطلحات... ولذلك اجتهدت بعض الأحيان وأخرى قبلت ما موجود على مضض أملا في ان توضع في المستقبل القريب ما يقابل او يحل هذه المشكلة ... ومن المشاكل الأخرى هي تداخل المواضيع مع بعضها لذلك حدث تكرار للعناوين دون المضمون ... كما حصل مع موضوع المضادات الحيوية ومقاومتها ، وكذلك موضوع المجسات الحيوية والمشتتات الحيوية اذ ان كل منها يعمل في عدة مجالات وبخصوصية تلائم المجال .

والكتاب يضم أربعة عشر فصلا ، النصف الأول خصص للأساسيات التي لها علاقة بفعاليات الأحياء المجهرية والمشاكل التي يمكن ان تحلها والمشاكل التي يمكن ان تسببها ، وركزت الدراسة على الجوانب الجزيئية في اكثر الأحيان التي رتبت وفق رؤيا العلاقات بين ما مطروح من الجزء النظري مع استحضار ما مطلوب من المواضيع التي تليه وتناول النصف الثاني التطبيقات وعلاقة الأحياء المجهرية بالجوانب الأكثر أهمية في الحياة وهي البيئة وتداخلاتها .. ثم التطرق الى علاقة الأحياء المجهرية ببعض الجوانب الطبية والأغذية ... وفصول تناولت علاقة التنافس بين التقنيات الحيوية الميكروبية في مجالات الصناعة والطاقة ثم تم التطرق الى الجوانب المتاحة والتي يمكن ان تكون مجالات المستقبل للاستغلال مثل البحار وبعض الأحياء التي تكون مهمة في إنشاء صناعات حيوية جديدة . وتطرق الفصل الأخير الى واقع التقنيات الحيوية وما تحتاجه لمنطلقات جديدة والملابس التي حصلت في الممارسات السابقة ، وبعض المقترحات للتوجهات المستقبلية أرجو الله سبحانه ان يكون هذا العمل خالصا لوجهه وان يجعله في ميزان حسناتي انه نعم الولي والقادر على ذلك

زهرة الخفاجي

آب / 2007

دمشق

الفصل الاول

التقنية الحيوية والميكروبات

الفصل الثاني

الفعاليات الحيوية

الفصل الثالث

وراثة الأحياء المجهرية وعلاقتها بالنواحي الفسلجية

الفصل الرابع

تصنيف الأحياء المجهرية

الفصل الخامس

الأحياء المجهرية في الطبيعة

الفصل السادس

ايض الإجهاد

الفصل السابع

التقنية الحيوية الميكروبية والبيئة

الفصل الثامن

التقنية الحيوية الميكروبية والطب

الفصل التاسع

التقنية الحيوية الميكروبية والزراعة

الفصل العاشر

التقنية الحيوية الميكروبية والأغذية

الفصل الحادي عشر

التقنية الحيوية الميكروبية والصناعة

الفصل الثاني عشر

التقنية الحيوية الميكروبية والطاقة

الفصل الثالث عشر

البحار والطحالب الصغيرة

الفصل الرابع عشر

توجهات التقنية الحيوية الميكروبية

التقنية الحيوية والميكروبات

الصفحة	الموضوع
	مقدمة عامة
2	تركيب الأحياء
2	الأحياء بدائية النواة
3	البكتريا
10	الاركيا
11	الفيروسات
14	الأحياء حقيقية النواة

التقنية الحيوية والميكروبات

اتصفت التقنية الحيوية Biotechnology بكافة نواحيها بأنها ثورة خضراء او ثورة سليمة طالت كافة جوانب الحياة . إذ وفرت العديد من المواد لمعظم جوانب الحياة ، كما وفرت العديد من التسهيلات والخدمات في نواحي مختلفة مثل الجوانب الصحية ، وجوانب الزراعة وتوفير الأغذية والجوانب البيئية والجوانب الصناعية وتوفير الطاقة ، سواء بعلاقات مباشرة او غير مباشرة .

وكان لابد للتقنية الحيوية من ان توجد بعد ان جربت البشرية العمليات الصناعية ومنها الكيماوية التي ادت الى كوارث التلوث البيئي والتغير في المناخ وزيادة التصحر ، وتدمير الانظمة الحيوية وخاصة الهشة منها والذي بدوره أدى الى قلة التنوع الحيوي وغيرها من المشاكل ، كل هذه ادت الى جعل الاهتمام بالتقنية الحيوية اهتماما عالميا ، نظرا لبروز علامات استفهام حول الامن الغذائي ومن ورائه بقاء البشرية .

وقد وضعت عدة تعريفات للتقنية الحيوية تتفق في المضمون وهو استعمال الأحياء وخاصة المجهرية أو مشتقاتها في عمليات التصنيع الحيوي أو إداء خدمة مثل معالجة البيئة. ووفق تعريف قاموس أكسفورد " استعمال الكائنات الحية الدقيقة وعملياتها الحيوية ولا تشمل العمليات الزراعية " وتمتاز الأحياء المجهرية سواء كانت بدائية النواة أو حقيقية النواة بعدة ميزات تؤهلها للاستعمال في عمليات التقنية الحيوية او التصنيع الحيوي ، لذلك شكلت الصناعات المعتمدة على الميكروبات قطاعا كبيرا من عمليات التصنيع إن لم يكن كليا . وتمتاز الأحياء المجهرية :

- 1-سريعة النمو نظرا لكبر المساحة السطحية بالنسبة للحجم مما يوفر الفرصة لقيط Uptake كفاء للمواد الغذائية ، ولو ان هذا يجعل الخلية بكاملها معرضة للبيئة والظروف الخارجية ، وقد أدى هذا الى زيادة التنوع الحيوي للأحياء المجهرية بشكل كبير .
- 2-تكون الأنظمة الوراثية فيها أقل تعقيدا من الأحياء الراقية مما يسهل إجراء عمليات التطفير أو الكلونة Cloning .
- 3-تحوي العديد من المسارات الأيضية سواء التخليقية أو الهدمية المتنوعة للمادة الواحدة عكس الخلايا الراقية التي تكون فيها هذه المسارات محدودة .
- 4-معظم الأحياء المجهرية المتمثلة ببداية النواة لا تعاني من الشيخوخة أو الموت المحتم بعد عدة أجيال وإن كانت ذلك فلا بد من أن تنشأ مجموعة من الخلايا تحافظ على النوع .
- 5-يمكن للأحياء المجهرية التطبع السريع لأستهلاك مواد رخيصة ومتوفرة في الطبيعة .
- 6-بالأماكن زراعتها وأنتاج اعداد هائلة منها تصل مستوى الملايين من الخلايا ومثل هذه الأماكن غير متوفرة في الأحياء متعددة الخلايا الكبيرة مثل النباتات والحيوانات .

تركيب الأحياء المجهرية

تقسم الاحياء الى قسمين رئيسيين هي الأحياء بدائية النواة والأحياء حقيقية النواة . وتضم الأولى البكتريا والأركيا Archaea ، وتضم مجموعة الثانية حقيقية النواة في باقي الاحياء .

الاحياء بدائية النواة

احياء تضم البكتريا والأركيا وهي ابسط تركيبا من الاحياء حقيقية النواة ماعدا الغلاف الخارجي الذي يكون معقدا .

وتتكون مادتها النووية من جزيئة واحدة في اغلب الاحيان تترتب في تركيب Nucleoid ولا يوجد غشاء نووي يحيط بها ، وهو يكفيء النواة في الخلايا حقيقية النواة .

وتكون المادة النووية مكونة من DNA ذات الشحنة السالبة التي تتعادل ببعض الجزيئات الصغيرة من الامينات المتعددة وأيونات المغنيسيوم ، وتوجد فيها بروتينات مشابهة للهستونات المرتبطة بكروماتين الخلايا حقيقية النواة وتكون عارية أي بدون غشاء كما ذكر اعلاه ولا توجد فيها اجهزة انقسام خيطي . وعدد نسخ الكروموسوم يعتمد على مرحلة النمو من دورة الخلية وعند وجود عدة نسخ تكون متشابهة . والتركيب الحلقي لكروموسوم الخلايا بدائية النواة هو الشائع ولكن توجد بعض البكتريا تحوي على كروموسوم مفتوح أو مستقيم كما في البكتريا *Borrelia burgdorferi* وكذلك في بعض أنواع جنس *Streptomyces* . وربما ترتبط DNA بانبعاجات من الغشاء الخلوي تسمى الأجسام الوسطية Mesosomes التي يعتقد ان لها دورا في فصل وتوزيع الكروموسومات بعد التضاعف .

التركييب الساييتوبلازمية :

لا تحتوي هذه المجموعة من الخلايا على تراكييب متميزة ، كما انها لا تحتوي على الماييتوكوندريا والبلاستيدات . وتكون انزيمات ومكونات السلاسل التنفسية موجودة في الغشاء الخلوي ، أما الاحياء التي تقوم بعملية التخليق الضوئي من هذه المجموعة فأن الصبغات مثل الكلوروفيل والكاروتينات توجد في الأغشية الخلوية أو انبعاجات منها ضمن تراكييب خاصة تسمى الأجسام الخضر Chlorosomes .

وفي البكتريا المزرقة Cyanobacteria فهي تحوي على أغشية للتخليق الضوئي مكونة تراكييب تتألف من عدة طبقات تعرف Thylakoids التي تحوي الصبغات على سطوحها الخارجية وأهمها Phycobilins .

وتخزن الخلايا بدائية النواة بعض المواد تحت ظروف خاصة على شكل حبيبات غير ذائبة وخاملة من الناحي التنافذية أي تكون بشكل مكوثرات متعادلة Neutral polymers . ويحصل

خزن المواد عند اضطراب بعض العناصر الغذائية مثل الكربون أو النتروجين أو الفسفور أو انخفاض الرقم الهيدروجيني pH وعندها يخزن الكربون الزائد عن الحاجة في الوسط الغذائي على شكل نشأ أو كلايوجين وفي بعض البكتريات يخزن على شكل β - Poly hydroxybutyrate . وتستخدم المواد المخزونة كمصادر للكربون عند استئناف تخليق البروتينات والحوامض النووية .

وتقوم بعض الخلايا بتجميع الفوسفات لتكوين مكوثرات الفوسفات التي تمثل خزين للفوسفات اللاعضوية التي يمكن ان تستعمل لتخليق ATP . وتسمى الحبيبات في بعض الأحيان Metachromatic granules أو Volutin granules والتي تكون صفة مميزة لبعض البكتريا مثل Corynebacteria .

وتخلو الخلايا بدائية النواة من الهيكل الخلوي Cytoskeleton ولو إن بعض الدراسات بالمجهر الالكتروني أشارت الى وجود تراكيب مشابه في بعض الأنواع البكتيرية . وتحوي البكتريا التي تقوم بعملية تثبيت ثنائي اوكسيد الكربون اي ذاتية التغذية Autotroph على حويصلات تسمى الأجسام الكربوكسيلية Carboxysomes التي يحوي على النظام الانزيمي Ribulose biphosphate carboxylase الأساسي في تثبيت الكربون اللاعضوي . ومن محتويات الساييتوبلازم الأخرى التي يمكن أن توجد في بعض الأنواع هي الأجسام المغناطيسية Magnetosomes وتتكون من اغشية تحيط بحبيبات من Magnetite (Fe_3O_4) أو كبريتيد الحديد والتي تساعد البكتريا في اظهار الأنجذاب المغناطيسي Magnetotaxis أي الهجرة أو تغير وضع الخلايا بالاعتماد على المجال المغناطيسي . وتحوي الاحياء المائية بشكل خاص على الحويصلات الغازية لتساعدها على الطفو، وتتكون الحويصلات الغازية من الفجوات الغازية وقد لوحظت للمرة الاولى في البكتريا المزركة . ويمكن ان يحتوي ساييتوبلازم الخلايا على مكونات اخرى تعتمد على النوع والبيئة التي تعيش فيها .

البكتريا : ولها تراكيبها الخاصة ومنها :

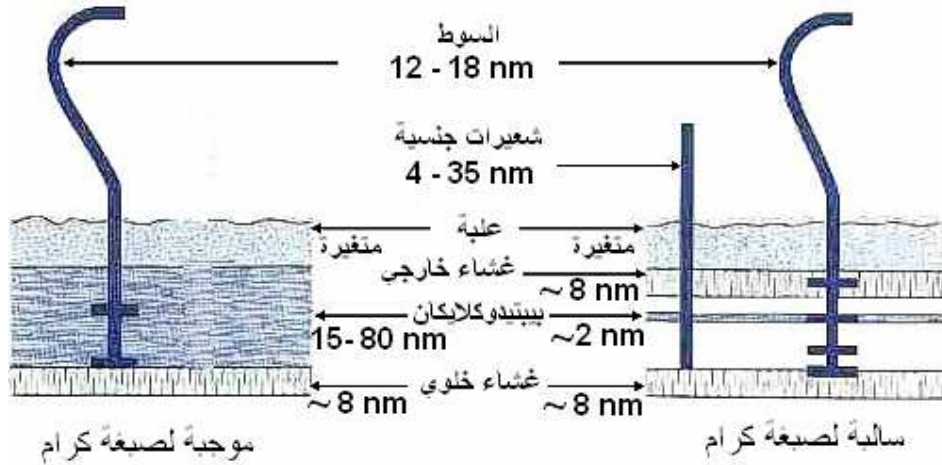
الطبقات الخارجية :

وتقسم البكتريا الى مجموعتين رئيسية هي البكتريا الموجبة لصبغة كرام والأخرى السالبة لصبغة كرام والتي يعتقد إن الاختلاف يكمن أو يعتمد على تركيب الطبقات الخارجية للخلايا .

البكتريا السالبة لصبغة كرام

الغلاف الخارجي Cell envelope ويطلق على الطبقات التي تحيط الخلايا بدائية النواة

وهو يختلف بين البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام كما موضح في الشكل الآتي (شكل 1)



شكل 1 : الطبقات الخارجية في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام

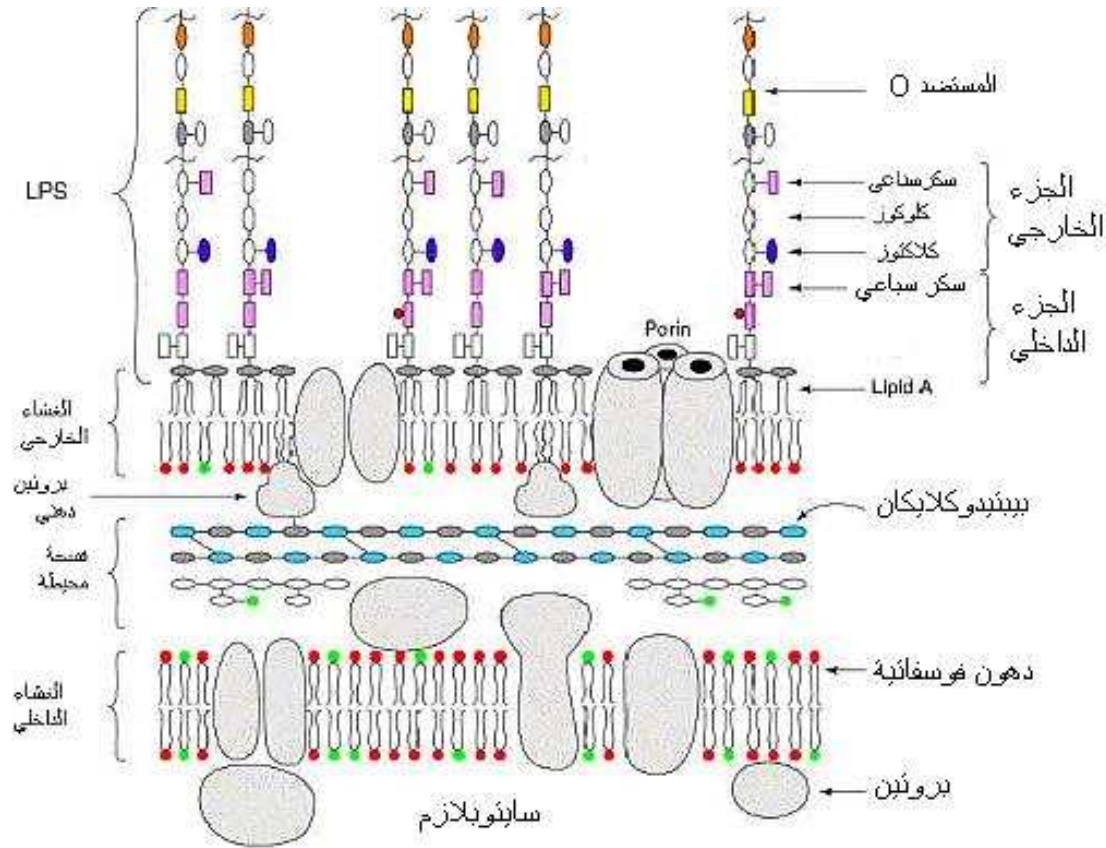
الطبقات الخارجية S - Layers : وتوجد في العديد من البكتريا الموجبة لصبغة كرام وكذلك في الأركيا . وتكون وحداتها بشكل شبكة بلورية ثنائية الأبعاد ، مكونة من البروتينات أو البروتينات السكرية ، وفي البكتريا الموجبة لصبغة كرام تكون مكونة من بروتينات سكرية وهي تكافئ طبقة الدهون السكرية المكوثة Lipopolysacchades (LPS) في البكتريا السالبة لصبغة كرام .

أما وظيفتها فهي يمكن ان تحمي الخلايا من تأثير الأنزيمات المحللة للجدران الخلوية وكذلك الحماية من البكتريا *Bdellovibrio bacteriovorus* التي تفتقر البكتريا الأخرى ، وكذلك تساعد في منع الأصابات بالعائيات Phages ، كما انها تحافظ على شكل الخلايا في بعض أنواع الأركيا ، وتشارك في التصاق البكتريا الى مناطق معينة من المضاييف .

وعلى العموم تكون الطبقات الخارجية للبكتريا السالبة لصبغة كرام معقدة جدا مقارنة بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام كما موضح في الشكل الآتي (شكل 2)

البكتريا الموجبة لصبغة كرام : وتكون الطبقات الخارجية لها مكونة من 2-3 طبقات وهي الغشاء الخارجي Outer membrane وطبقة المكوثر الجداري البكتيري Peptidoglycan السميكة . وبعض الانواع تحوي على العلب S - layers وتخلق بعض الخلايا مواد تفرز الى خارج الأغلفة الخارجية مثل العلب و Glycocalyx البعض منها متجانسة الوحدات وأخرى متباينة . وهذا الاختلاف يعتمد على نوع البكتريا وتستعملها الخلايا لاغراض مختلفة .

ويمكن ان تحوي الخلايا على تراكيب خارجية أخرى مثل Pili (Fimbriae) اضافة الى ما يسمى بالمكملات Integrins وتمثل مستقبلات على سطح الخلية وهي جزيئات الالتصاق مع الخلايا الأخرى .



شكل 2 : الطبقات الخارجية في البكتريا السالبة لصبغة كرام

الجدران الخلوية Cell walls : من التراكيب الأساسية للعديد من الخلايا مثل البكتريا والفطريات والخلايا النباتية وله وظائف متعددة ، وبصورة عامة فإن وجوده يؤدي الى جعل تغذية الخلايا الحاوية عليه تغذية تنافذية Osmotroph اي يجب ان تكون المواد ذائبة في المحاليل .

البكتريا الموجبة لصبغة كرام : يتكون الجدار الخلوي في البكتريا الموجبة لصبغة كرام بشكل اساسي من البيبتيدوكلايكان Peptidoglycan وحامض التيكويك Teichoic acid ، وتوجد حوالي 40 طبقة أو صفيحة منه ويشكل حوالي 50 % من المواد الجدارية ، أما في البكتريا السالبة لصبغة كرام فيشكل حوالي 5 - 10 % من المواد الجدارية وتوجد منه 1 - 3 طبقات ويحاط بالغشاء الخارجي Outer membrane . ومن وظائف الجدار الخلوي الحفاظ على الخلايا من الانفجار وذلك لأن الضغط التنافذي لسايتوبلازم الخلايا البكتيرية يتراوح بين 5 - 25 ضغط جوي نظرا لوجود المواد في السايتوبلازم وفي اغلب البيئات يكون هذا كافيا لانفجار الخلايا . وعليه تكون وظائف الجدار الخلوي :

1- المحافظة على الخلايا من الانفجار .

2- إعطاء الشكل المميز للخلايا .

3- يساهم في انقسام الخلايا .

4- يكون موضعاً للعديد من مستلمات العاثيات و غيرها .

5- بعض مكوناته تعمل كمحددات مستضدية Antigenic determinants

وفي حالة غياب الجدران الخلوية كما في *Mycoplasma* يلاحظ ان هذه الاحياء اصبحت مجبرة على التطفل للحصول على حالة التوازن التنافي . ولكن من الجدير بالذكر ان نضوحية الجدران غير متخصصة ولكن في البكتريا السالبة لصبغة كرام فإن الغشاء الخارجي يمنع مرور الجزيئات الكبيرة او الجزيئات الخاصة .

طبقة البيبتيدوكلايكان : مكوثر معقد ، تكون طبيعة كوثرته ثنائية الاتجاه ليكون تراكيبا مستوية ويتكون من وحدات متبادلة من N-actylglucosamine و N-acetylmuramic acid إضافة الى بيبتيديات قصيرة من الحوامض الامينية التي تربط وحدات حامض الميواراميك .

وفي الاتصالات العرضية يوجد Diaminopimelic acid الذي يوجد فقط في جدران الخلايا بدائية النواة وهو مركب وسطي لتخليق الحامض الأميني اللايسين ، ويشترك في تكوين الاتصالات العرضية لوحدات البيبتيدوكلايكان . والاتصالات العرضية تظهر اختلافات في الانواع من البكتريا السالبة أو الموجبة لصبغة كرام .

وتلحق بالمكوثرات الجدارية بعض التراكيب الخاصة والتي تختلف بين البكتريا السالبة أو الموجبة لصبغة كرام :

في البكتريا الموجبة لصبغة كرام توجد مكوثرات تذوب في الماء هي حامض التيكويك وحامض Teichouronic acid وتحوي على ثملات من الكليسرول والريبitol وبعض الحوامض الامينية ويشكل حامض التيكويك أهم المستضدات Antigens السطحية .
السكريات المكوثرة وتوجد في بعض انواع البكتريا ، وتتكون من سكريات مختلفة منها السكريات المتعادلة مثل المانوز ، العرابينوز ، كلاكتوز ، رامينوز و Glucosamine وسكريات حامضية مثل Mannuronic acid ، Glucuronic acid

البكتريا السالبة لصبغة كرام : تتمثل التراكيب الخاصة بالغشاء الخارجي المكون من ثلاث

تراكيب رئيسة وهي البروتينات الدهنية ، والغشاء الخارجي والسكريات الدهنية المكوثرة .
1- البروتينات الدهنية جزيئات غير طبيعية من البروتينات الدهنية تربط بين الغشاء الخارجي والبيبتيدوكلايكان وتوجد بكميات كبيرة في هذه المجموعة من البكتريا إذ يصل عددها الى حوالي 70000 جزيئة في الخلية الواحدة ، تقوم بتثبيت الغشاء الخارجي وإرساءه في البيبتيدوكلايكان .

2- أما الغشاء الخارجي فهو تركيب ثنائي الطبقة ، الداخلية منه تشبه الغشاء الخلوي Cell membrane من حيث التركيب ، أما الخارجية فتتكون من الدهون السكرية المكوثرة (LPS)

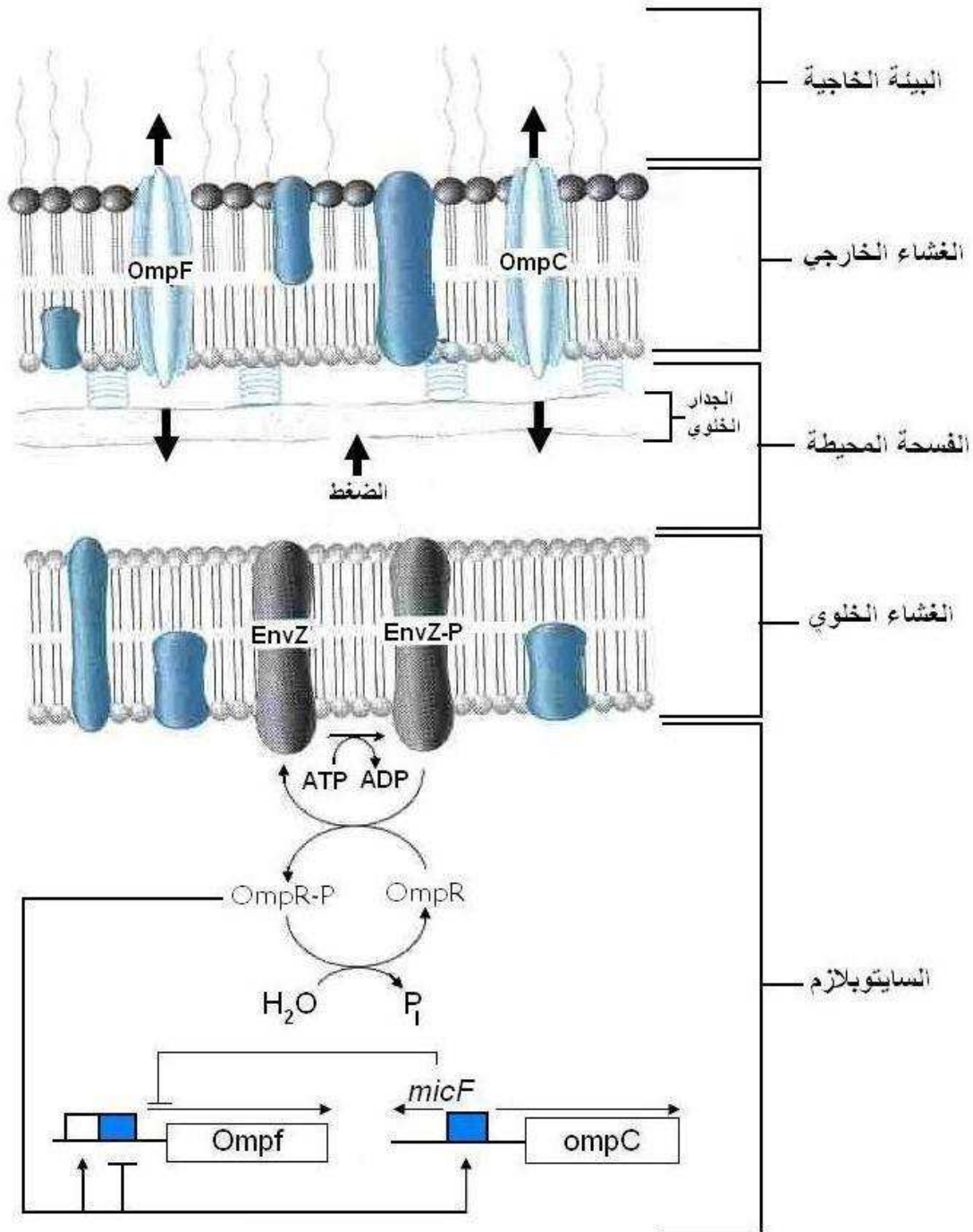
، أي انه يكون غير متناظر التركيب ، يقوم بطرد الجزيئات الكارهة للماء وهذه حالة غير طبيعية بالنسبة للأغشية الخلوية ولكن يساعد في حماية البكتيريا المعوية من تأثير املاح الصفراء ، ونظرا لطبيعة الدهنية فهو يمنع الجزيئات المحبة للماء من الدخول . والأخيرة يمكن أن تدخل من قنوات تدعى Porins التي تسمح بمرور الجزيئات الصغيرة المحبة للماء مثل بعض السكريات والحوامض الأمينية وبعض الأيونات .

ويشكل الغشاء الخارجي في البكتيريا السالبة لصبغة كرام حاجزا نضوحيا أمام المضادات الحيوية ذات الوزن الجزيئي الكبير والتي إن مرت فأنها تمر ببطيء مما يضيف المقاومة لهذه المضادات . وبصورة عامة تختلف نضوحية الغشاء الخارجي من نوع الى اخر ، فبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* مقاومة للعديد من المضادات البكتيرية وذلك لأن غشائها الخارجي أقل نضوحية بحوالي 100 مرة من نضوحية الغشاء الخارجي لبكتيريا *Escherichia coli* ويحوي الغشاء الخارجي على عدد من البروتينات المهمة مثل OmpA الذي يعمل على إرساء الغشاء الخارجي على الببتيدوكلايكان ، إضافة الى انه يكون مستلما لارتباط عدد من العاثيات ، كما إنه يعمل كمستلم عند الأقتران ببلازميد الخصوبة F . ويحوي الغشاء الخارجي على عدد أو مجاميع من البروتينات التي تعمل في نقل جزيئات خاصة مثل فيتامين B₁₂ ومعقدات الحديد مع حاملاتها Iron-siderophore complexes . كما انه يحوي على بعض البروتينات الأخرى مثل الأنزيمات الحالة للدهون الفوسفاتية Phospholipases والبروتينات التي ترتبط بالبنسيلين Penicillin - binding proteins (PBP) .

وتخلق البروتينات الموجودة في الغشاء الخارجي على الرايبوزومات المرتبطة للسطح الداخلي للغشاء الخلوي ، ثم تنتقل - ربما - خلال مناطق الالتصاق بين الغشاء الخارجي والغشاء الداخلي والتي تعرف Bayer's junctions (على اسم الشخص الذي اكتشفها بالفحص المجهرى) ، وفي النموذج الدراسي *E. coli* يوجد حوالي 200 منطقة اتصال في الخلية الواحدة .

3- السكريات الدهنية المكوثة LPS وتتكون من الدهون أهمها Lipid A ترتبط بسكريات مكوثة ، وترتبط الطبقة الى الغشاء الخارجي بأواصر كارهة للماء ، وتخلق داخل الخلايا على الوجه الداخلي للغشاء الخلوي . وترتبط هذه المركبات السالبة الشحنة بأواصر لا تساهمية مع ايونات موجبة ثنائية الشحنة لتثبيتها . وتكون ضرورية للعديد من وظائف الغشاء الخارجي فهي تشكل حاجزا أمام المواد الكارهة للماء وتقوم بأزالة الأيونات المشحونة واستبدال المضادات الحيوية Polycationic مثل Polymyxins ومجموعة Aminoglycosides التي تجعل الخلايا ناضحة للجزيئات الكارهة للماء .

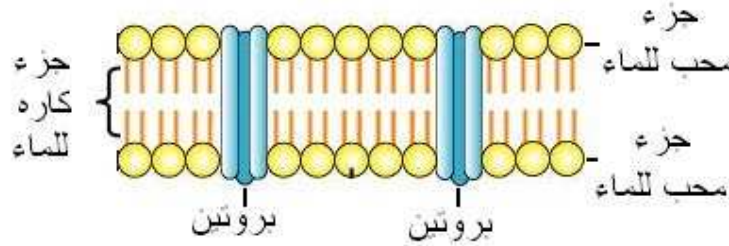
تكون LPS سامة للحيوانات ولذلك سميت بالسموم الداخلية والسمية مرتبطة بـ Lipid A ، وتعد هذه الطبقة الأساس للمستضدات السطحية (O antigens) والتي يوجد منها في بكتريا *Salmonella* حوالي 1000 مستضد . وتختلف LPS في البكتريا المختلفة وبعض الأنواع تحوي على سلاسل قصيرة من السكريات Lipooligosaccharides (LOS) **الفسحة المحيطة Periplasm** : وهي الفسحة الواقعة بين الجدار الخلوي أو الطبقات الخارجية والغشاء الخلوي وتشكل حوالي 20-40 % من حجم الخلية وتحوي على طبقة من الميورين Murine ومحلول هلامي يحوي العديد من البروتينات ومنها البروتينات الرابطة لبعض مواد الاساس Substrates مثل الحوامض الأمينية والسكريات والفيتامينات والأيونات . كما إنها تحوي على الأنزيمات مثل الفوسفيتيز القاعدي و nucleotidase - 5' الذي يفكك الأشرطة النووية غير القادرة على الدخول الى الخلية ويحولها الى اشكال قادرة على الانتقال Transportable ، كما تحوي الأنزيمات المزيلة للسمية لبعض المضادات الحيوية مثل β - lactamases و Aminoglycoside phosphorylases التي تفكك المضادات الحيوية ، وتحوي الفسحة على العديد من المواد التي تعمل في مجال تنظيم التناظية Osmolarity إذ تزداد عند انخفاض التناظية خارج الخلايا . وموقع الفسحة بالنسبة للبكتريا السالبة لصبغة كرام مبين في الشكل الاتي (شكل 3)



شكل 3 : موقع الفسحة المحيطة في الطبقات الخارجية للبكتريا السالبة لصبغة كرام

الغشاء الخلوي Cell membrane : يمثل الغشاء الخلوي في البكتريا وحدة غشائية مثالية ، ويتكون من الدهون الفوسفاتية والبروتينات . وتمتاز الأغشية الخلوية في الخلايا بدائية النواة بغياب الستيرويدات Sterols ماعدا في *Mycoplasma* التي تدمج الكولسترول في أغشيتها عند نموها في وسط يحوي على الستيرويدات .

ويتكون الغشاء من طبقتين من الدهون الفوسفاتية التي تكون الأجزاء المحبة للماء الى الخارج وتكون الطبقة الوسطى طبقة كارهة للماء والتي تعد الأساس في نضوحية الأغشية ويوضح الشكل التالي التركيب النموذجي للأغشية (شكل 4)



شكل 4 : تركيب الأغشية الخلوية (التركيب الاساسي)

وتحصل انبعاجات للأغشية الخلوية مكونة الأجسام الوسطية التي تشارك في عمليات تكوين الجدران العرضية عند الانقسام ، إذ يعتقد أنها تزود تلك المناطق بالطاقة نظرا لأحتوائها على السلاسل التنفسية.

وظائف الأغشية الخلوية : للغشاء الخلوي العديد من الوظائف يمكن تلخيصها بالآتي

- 1- يكون الغشاء شبه ناضح وتنتقل خلاله المواد الذائبة في الدهون .
- 2- يحوي على مكونات السلاسل التنفسية ونقل الألكترونات وأنظمة توليد الطاقة في حالة الفسفرة التأكسدية Oxidative phosphorylation في الأحياء الهوائية .
- 3- تنقل من خلاله معظم انزيمات التحلل المائي أي الأنزيمات الخارجية .
- 4- يحمل عددا من الجزيئات والحوامل والأنزيمات التي تشارك في تخليق عدد من مكونات الخلية مثل الجدران الخلوية والدهون الفوسفاتية الغشائية و DNA .
- 5- يحمل المستلمات والبروتينات الخاصة بظاهرة الإنجذاب Taxis بأنواعها وكذلك بعض مكونات مسارات نقل الإشارات البيئية الخارجية .

ويلاحظ ان حوالي 50 % من مكونات الغشاء الخلوي تكون في حالة شبه سائلة Semifluid ليتمكن الخلايا من النمو ، وعند انخفاض درجات الحرارة تتم المحافظة على هذه الميوعة من زيادة تخليق أو إدماج الحوامض الدهنية غير المشبعة .

الاركية Archaea

المجموعة الثانية من الأحياء بدائية النواة والتي يمتاز معظم أفرادها في العيش في ظروف متطرفة ، كما تعيش في القناة الهضمية للحيوانات المجترة بشكل تعايشي مع أحياء أخرى منها الهوائية واللاهوائية وأحياء متباينة التخمر وأخرى متباينة التخمر الاختيارية وغيرها .

وتعد المجموعة مهمة في التقنيات الحيوية نظرا لأن بعضها يستطيع العيش بدرجات حرارية أكثر من 100 °م لذلك تكون أنزيماتها ثابتة بالحرارة كما في استعمال إنزيم كوترة DNA Taq polymerase المنتج من *Thermus aquaticus* في تقنيات PCR . وتمتاز مجموعة الأركيا بالآتي :

1- غياب البيبتيدوكلايكان من الجدار الخلوي ولو إن بعضها تحوي على مكوتر مشابه يحوي على N - acetyl sugar وحامض الميوراميك وأرتباطات عرضية مكونة من ثلاث حوامض أمينية وبعضها تحوي على طبقة بروتينية .

2- تكون دهونها في الأغشية من نوع Isoprenoid diether أو دهون ثنائية الكليسيرات Diglycerol tetraether lipids .

3- تكون جزيئات rRNA بتواليات خاصة بالمجموعة .

4 - أكثر شبيها بالخلايا حقيقية النواة (كما سيأتي ذكره لاحقا)

وتكون خلاياها مختلفة الأشكال مثل كروية أو بشكل صفائح ، أو عصوية ، وتكزن خلاياها مفردة أو متعددة مكونة خيوط ، تنقسم الخلايا بالانشطار البسيط أو بالتبرعم ، أو التجزؤ أو طرق أخرى .

الفيروسات Viruses

عوامل إصابة صغيرة (20-300 نانومتر) ، تفتقد للعديد من مقومات الخلايا الحية ومنها عدم قابليتها على القيام بمعظم الفعاليات الحيوية ولكن عندما تصيب الخلايا تكتسب هوية الكائنات الحية تحوي احد الحوامض النووية DNA او RNA وبتشكيلات مختلفة فقد تكون مزدوجة اشربة dsRNA أو مفردة ssRNA ولكن توجد فيروسات مفردة اشربة DNA (ssDNA) أو مزدوجة dsDNA محاطة بغلاف بروتيني يسمى القفيصة Capsid ، وبعض الفيروسات تكون محاطة بغشاء دهني مكتسب من الخلايا التي تصيبها . وتسمى وحدة الأصاب Virion ، والفيروسات متطفلة اجبارية .

وتكون الفيروسات متخصصة في الخلايا التي تصيبها مثل الخلايا الحيوانية او النباتية وكذلك تصيب الأحياء المجهرية وتحوي المعلومات الوراثية اللازمة لتوجيه وبرمجة مكائن الخلايا المصابة لتخليق الجزيئات اللازمة لتخليق الفيروسات الجديدة .

وتكثر الفيروسات في بيئات مختلفة ولعلها أكثر العوامل الموجودة في البحار إذ تصل أعدادها الى البلايين لكل لتر ، ويعتقد أنها تصيب كل الأحياء الموجودة في البيئة البحرية وتؤدي الى تحللها مما يؤدي الى إعادة إغناء البيئة البحرية بالمواد الغذائية وبالتالي تؤثر على العديد من العمليات البيئية المهمة في البحار ، ولذلك يمكن إجمال تأثيرها :

- 1- تدوير المواد الغذائية .
- 2- التأثير على أنظمة التنفس بالنسبة للأحياء الموجودة في البيئة البحرية وعمليات نقل الطاقة .
- 3- التأثير على حجم الجزيئات في مياه البحر ومعدلات ترسبها .
- 4 - تزيد من التنوع الحيوي للأحياء البحرية مثل الطحالب والبكتريا .
- 5- تؤثر على توزيع الأحياء في البيئة البحرية .
- 6 - تسيطر على عمليات عنفوان الطحالب Algal bloom .

أصل الفيروسات

- هناك عدة نظريات تبحث في أصل الفيروسات ومنها
- يعتقد انها جزء من الحوامض النووية RNA أو DNA للخلايا المضيفة انفصلت وأصبحت قادرة على التضاعف الذاتي وتطورت بشكل مستقل .
 - النظرية الأخرى يعتقد أن الفيروسات تمثل أشكال أو بقايا للطفيليات التي توجد داخل الخلايا والحقيقة لا يوجد أدلة أن الفيروسات اشتقت من البكتريا .

تصنيف الفيروسات

هناك بعض الموصفات التي يعتمد عليها في تصنيف الفيروسات ولكن هذه الصفات ليست كلها موجودة لكل مجموعة ، وعملية التصنيف للفيروسات متغيرة ولكن في الآونة الأخيرة تم اعتماد توالي القواعد النروجينية في جينوم الفيروس Genome sequence . وهذه تحتاج الى قواعد معلوماتية Databases التي يمكن ان تساعد في تصنيف الفيروسات المكتشفة حديثا . والطرق التقليدية المستعملة في التصنيف :

- 1- الصفات المظهرية الخارجية للفيروس مثل الحجم والشكل ونوع التناظر بين أجزائه ووجود أو غياب الغشاء الدهني ووحداته Peplomers .
- 2- صفات جينوم الفيروس مثل نوع الحامض النووي هل هو RNA أم DNA ، وحجم الجينوم مقاسا بالكيلو زوج قاعدة (Kilo base pair) . ونوع الأشرطة هل هي مفردة أم مزدوجة ، حلقية أم مفتوحة هل ان الشريط هو + ام - أي احتواء الفيروس على انزيم كوترة RNA (RNAP) . وعدد قطع الجينوم وحجمها ، ومحتوى الجينوم من القواعد النروجينية (الكوانين والسايترين) G+C .

- 3- تركيب الجينوم وطريقة تضاعفه مثل تركيب الجينات وعدد ومواقع ORFs (Open Reading frames) . وطرق التضاعف مثل نمط الانتساخ Transcription ، والترجمة ومواقع تجميعها في الخلايا المضيفة أي تجميع جزيئات الفيروس وتجميع البروتينات الخاصة به وأنطلاق الفيروسات بعد تعبئة الجينومات الكاملة في الأغلفة البروتينية .

- 4- تستعمل بعض الصفات الخاصة مثل وجود العناصر المتكررة ووجود terminal cap - 5' أو وجود البروتينات المرتبطة بالنهاية 5' وكذلك وجود 3'-terminal poly(A) .
- 5 - الصفات الفيركيماوية للفيروس مثل الكتلة الجزيئية والكثافة الطافية Buoyant density وكذلك الثباتية بالحرارة والرقم الهيدروجيني وحساسيتها للعوامل الكيماوية والفيزيائية وخاصة الايثر .
- 6- صفات بروتينات الفيروس وتشمل عدد وحجم الوحدات وكذلك وظيفة البروتينات التركيبية وغير التركيبية . وفي هذا المجال يستعمل توالي الحوامض الأمينية فيها والتغيرات التي تطرأ عليها مثل التسكر (اضافة السكريات) ، الفسفرة . إضافة الى دراسة وظائف بعض البروتينات الخاصة مثل انزيم النسخ Transcriptase أو إنزيم النسخ العكسي Reverse Transcriptase .
- 7- دراسة الصفات المستضدية للفيروسات .
- 8 - الصفات الحيوية مثل مدى المضايق التي يصيبها ، طريقة الانتقال ، علاقته مع الفيروسات والنواقل الأخرى ، توليد الأمراض ، وتخصصه للأنسجة أو الانتحاء Tissue tropism .

: Prions

من عوامل الإصابة التي تفتقد مقومات الحياة كما هو الحال مع الفيروسات . وتراكيبها تكون أجسام بروتينية قادرة على الإصابة لا تحوي على الحوامض النووية ، وتسبب بشكل عام أمراض انحلال الجهاز العصبي المركزي ومنها مرض الرعاش Scrapie في الأغنام ومرض جنون البقر Bovine spongiform encephalopathy (BSE) . وأمراض أخرى قد تصيب الإنسان منها Kuru ، Creutzfeldt-Jacob disease (CJD) وغيرها .

وتوجد بروتينات نظيرة في الإنسان Prp^c يشفر له بالـ DNA على الكروموسومات وهو من البروتينات السكرية بوزن جزيئي حوالي 33000-35000 دالتون يحوي على تراكيب خاصة في تركيبه مكونة من حلزونات - ألفا (α - helix) حساسة للبروتينات يتم التعبير عنها على سطوح الوحدات العصبية Neurons في الخلايا السليمة والخلايا المصابة ، والنظير Isoform غير الطبيعي $Pr p^{res}$ وهو الذي ينتقل ويختلف عن النظير الطبيعي بإحتوائه على تراكيب مخالفة هي High beta - sheets ويميل للتجمع مع بعضه وفي هذه الحالة لا يذوب في المنظفات ويكون أيضا مقاوم للهضم بالبروتينات جزئيا . ويعتقد انه يوجد بروتين آخر سمي البروتين X الذي يتداخل مع البروتين الطبيعي Prp^c ويحوله الى Prp^{res} .

الأحياء المجهرية حقيقية النواة

وتتضمن بشكل رئيس الخمائر والاعفان والتي يطلق عليها الفطريات ، إضافة الى الخلايا النباتية والحيوانية .

اهم ميزات هذا النوع من الخلايا هو احتوائها على النواة أي تكون مادتها النووية محاطة بغشاء يظهر نضوحية انتقائية نظرا لوجود الثقوب التي تتكون من معقدات بروتينية تسيطر على دخول المواد وخروجها من النواة ، تتكون مادتها النووية من DNA تترتب بشكل حلزونات مزدوجة وتتصل بالهستونات وهي بروتينات قاعدية بواسطة تداخلات أيونية . وتحتوي على النوية Nucleolus وتكون منطقة غنية بالحامض النووي RNA وهي مكان لتخليق RNA الرايبوزومي .

التركيب الساييتوبلازمية

تتميز الخلايا حقيقية النواة بوجود التخصص وأنعزال العضيات Organelles عن بعضها بواسطة الأغشية . ويضم الساييتوبلازم الفجوات والبلاستيدات والشبكة الأندوبلازمية Endoplasmic reticulum وأجسام أخرى إضافة الى وجود الهيكل الخلوي الذي يعطي الخلية شكلها ويتكون عادة من الخيوط الصغيرة Microfilaments والأنابيب الصغيرة Microtubules إضافة الى خيوط متوسطة ، ويساهم الهيكل الخلوي أيضا في تكوين خيوط المغزل عند الانقسام وكذلك تكوين الاسواط في الأحياء المتحركة ، كما إنه يساعد في حركة الأميبا بدون اسواط . ويتكون من الناحية التركيبية من بروتين الأكتين Actin و Myosin والخيوط المتوسطة تقوم بتكوين الخيوط الجديدة في الساييتوبلازم . ويساعد الهيكل الخلوي في مقاومة الخلايا للأجهادات Stresses التي تتعرض لها الخلايا (كما سيأتي ذكره) .

الشبكة الأندوبلازمية : شبكة من القنوات الغشائية المستمرة مع الغشاء النووي ويوجد منها الخشن الذي يرتبط على سطوحها الرايبوزومات . وتشارك الشبكة الخشنة في تخليق البروتينات السكرية وكذلك تشارك في تخليق الأوليات التي تصدر لتخليق الأغشية الخلوية . أما الملساء فهي تشارك في تخليق الدهون وكذلك في بعض العمليات الأيضية للكاربوهدرات .

أجسام كولجي Golgi apparatus : تمثل تكدسات من الأغشية تعمل بشكل متناسق مع الشبكة الأندوبلازمية لأجراء التحويرات الكيماوية على البروتينات المخلقة وإفراز النواتج من الشبكة الأندوبلازمية وتوجيهها الى الإفراز . إضافة الى عمل مجموعة منها في التراكيب الغشائية في الخلايا .

البلاستيدات والمائتوكوندرية : تراكيب تقارب بحجمها الخلايا بدائية النواة وتتكون من تراكيب ثنائية الأغشية ويكون الداخلي منها في المائتوكوندرية مطويا مكونا ما يسمى بالأعراف Cristae وهي مراكز التنفس وتحوي على سلاسل نقل الإلكترونات .

والبلاستيدات الخضر Chloroplasts هي المراكز الخلوية التي تحدث فيها بعملية التخليق الضوئي في الاحياء التي تقوم بهذه العملية والتي يتم بواسطتها تحويل الطاقة الضوئية لضوء الشمس الى طاقة كيميائية على شكل ATP بشكل اساسي . وشكل البلاستيدات وحجمها وعددها يختلف بين الخلايا وهي عادة أكبر من الخلايا بدائية النواة .

وكل من البلاستيدات الخضر والمائتوكوندرية تحوي على DNA خاص بها ويكون بشكل حلقي ولذلك يعتقد ان هذه العضيات نتجت من تطفل الخلايا بدائية النواة داخل الخلايا حقيقية النواة اثناء عمليات التطور . وتقوم جينومات هذه العضيات بالتشفير لبعض البروتينات وليست كلها وكذلك تشفر لتصنيع RNA الناقل tRNA . وتكون بعض الخلايا حقيقية النواة لاهوائية (وهي حالات قليلة) واخرى متحملة للهواء وبعضها لا تحوي على المائتوكوندرية مثل *Trichomonas vaginalis* الذي يتطفل على الإنسان ولكن الطفيلي يحوي على تركيب غشائي تنفسي يسمى الجسم الهيدروجيني Hydrogenosome ويمثل المائتوكوندرية في الحجم ولكن لا يحوي على الأعراف ولا يحوي على انزيمات دورة الحوامض ثلاثية الكربوكسيلية (Tricarboxylic acid cycle) TCA ، ويتم نقل البايروفات الى الجسم الهيدروجيني وتكوين الهيدروجين وثنائي اوكسيد الكربون والطاقة بشكل ATP .

والأحياء الميكروبية من الأحياء حقيقية النواة تحوي على جدار خارجي الذي يتكون من سكريات مكثرة مثل السيليلوز والكايتين أو يحوي على مواد لاعضوية مثل Silica كما في الدايتومات Diatoms من الطحالب .

ومن اهم الأحياء المجهرية حقيقية النواة والتي لها دور فعال في التقنية الحيوية هي الخمائر والفطريات .

الخمائر

أحياء فطرية وحيدة الخلايا في معظم الأحيان ، تعيش بشكل رمي على المواد النباتية والحيوانية . خلاياها المفردة عادة كروية أو بيضوية الشكل بأقطار تتراوح بين 3 - 15 مايكرومتر . وبعضها تتكاثر بالتبرعم وتحت ظروف معينة لا ينفصل البرعم وإنما يستطيل ويكون عليه برعم آخر عند قطبه وهكذا مكونا سلسلة من خلايا الخمائر المتطاوله تسمى المايسليوم الكاذب Pseudomycelium او الهيافات الكاذبة .

بعض الخمائر تكون ثنائية الأطوار Dimorphic اعتمادا على الظروف المحيطة مثل درجة الحرارة وبذلك تكون ثنائية الأطوار بالاعتماد على الحرارة فعند درجة حرارة 37 م° تكون بشكل الخمائر وعند 25 م° تكون بشكل اعفان ، وتتكون الهيافات الكاذبة من الأنبوب الجرثومي خاصة في جنس *Candida* ، الخمائر عندما تتبرعم يترك البرعم ندبة التبرعم Bud scar على الخلية الأم الذي يختلف في تركيبه عن باقي الجدران الخلوية ، اما الخلية الجديدة فتحتوي فقط على ما يسمى ندبة الولادة Birth scar .

تساهم الخمائر في التقنية الحيوية بإنتاجها للعديد من المواد مثل الكحولات البسيطة والكحولات المتعددة والحوامض العضوية والأمينية وغيرها من المواد . كما انها تعد نموذجا دراسيا لفهم العديد من الجوانب الوراثية والفسلجية . وبما انها من الخلايا حقيقية النواة لذلك تعد مضيفا ملائما لانتاج البروتينات العلاجية التي تجري عليها التحويلات اللازمة لفعاليتها مثل التسكر والتي لا يمكن ان تتم عند استعمال الخلايا بدائية النواة .

الفطريات

الصفة المميزة انها احياء ذات تراكيب متفرعة لا تقوم بعمليات التخليق الضوئي ، وحدة التركيب الجسمي لها هي الهيافات Hyphae وتكون بشكل تراكيب اسطوانية قد تكون مقسمة بحواجز عرضية وبقطر من 2-10 مايكرومتر والحواجز تحتوي على ثقب تسمح بمرور الأنوية والسيتوبلازم وتكون الهيافات المقسمة صفة مميزة للفطريات الراقية . أما عندما تكون الهيافات غير مقسمة فأنها تكون المدمج الخلوي Coenocyte يكون متعدد النوى وسيتوبلازم واحد وهو ميزة للفطريات الواطئة .

تتجمع الهيافات بشكل تراكيب يطلق على مجموعها الميسيليوم او الحصيرة . وتتميز هيافات الميسيليوم الى هيافات خضرية تقوم بامتصاص المواد الخضرية ومجموعة اخرى هوائية هي هيافات الخصوية المسؤولة عن عمليات التكاثر وعند نمو الفطريات على سطوح الاوساط الغذائية تنتج مستعمرات مميزة من ناحية الحجم والنسجة واللون الناتج من الوان الأبواغ اللاجنسية والتي تسمى الكونيديا Conidia ، وتستعمل هذه الصفات في عمليات التصنيف .

وتتكون الجدران الخلوية من سكريات مكثرة وتشكل حوالي 80 % من الجدار وتشمل الكايتين ، السيليلوز ، المنان ، الكلوكان وغيرها ، وهناك سكريات مكثرة تجعل الخلايا مقاومة لتأثير الحوامض والقواعد ، وتحوي الجدران على البروتينات والبروتينات السكرية ومركبات اخرى مثل الدهون ، وتساعد الجدران الخلوية الفطريات المرضية للألتصاق بالخلايا او المضايغ اذ ان جدران بعض الفطريات تحتوي على اللاصقات Adhesins التي ترتبط الى خلايا المضيف ، كما ان وجود الجدران الخلوية تجعل التغذية تنافذية ولذلك تفرز الفطريات العديد من الإنزيمات

الخارجية لتحليل المواد العضوية لإنتاج المواد الغذائية الذائبة التي تنقل الى داخل الخلايا ، ولذلك تكون الفطريات مهمة من ناحية انتاج العديد من الانزيمات الخارجية التي تستعمل في مجالات مختلفة اضافة الى انتاجها مواد مفيدة اخرى مثل المضادات الحيوية ومحبطات المناعة مثل Cyclosporine وغيرها من المواد . كما ان الفطريات وكذلك الخمائر تنتج الصبغات أي انها Dematiaceae اي إنتاج صبغات الميلانين التي تكون ذات علاقة بضرارة Virulence الفطريات .

تصنيف الفطريات والخمائر

تستعمل الصفات الخارجية الشكلية بشكل اساسي في عمليات التصنيف ، اضافة الى استعمال عملية تكوين الأبواغ الجنسية واللاجنسية . وتستعمل الحالة اللاجنسية في تصنيف الفطريات الناقصة Anamorphic او Imperfect اما الحالة الجنسية Teleomorph (اي الهوية الجنسية Sexual identity) يكون لها اسم مختلف للفطر نفسه وذلك لان الأطوار الجنسية واللاجنسية للعديد من الفطريات درست واكتشفت بشكل منفصل لذلك اعطيت اسماء مختلفة للفطر الواحد فمثلا *Malassezia furfur* هي الطور اللاجنسي للفطر *Pityrosporum orbiculare* وبصورة عامة تصنف الفطريات اعتمادا على الطور الجنسي الى :

1 - Zygomycotina (Phycomycetes) وهي فطريات واطئة من حيث التطور، تكاثرها الجنسي يتم بتكوين Zygosporangia ، اما التكاثر اللاجنسي فيتم بتكوين ابواغ داخل علب Sporangiospores التي تكون صفة مميزة للفطريات الواطئة ، وهايفاتها نادرة ما تكون مقسمة وتضم الأجناس المهمة للصناعات الحيوية وهي *Mucor* و *Rhizopus* .

2 - Ascomycotina (Ascomycetes) الفطريات الكيسية وهي اكثر الفطريات انتشارا ، وتكون بعد التكاثر الجنسي والانقسام الاختزالي Meiosis للنواة الابواغ الكيسية وتقع خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* ضمن هذه المجموعة .

3 - Basidiomycotina (Basidiomycetes) التكاثر الجنسي في هذه المجموعة يؤدي الى تكوين 4 من Basidiospores محمولة على تركيب منتفخ يدعى Basidium . هايفاتها مقسمة ودورة حياتها معقدة وتضم مجموعة العرهود Mushroom .

4 - Deuteromycotina (Deuteromycetes) الفطريات الناقصة وهي مجموعة اصطناعية تجمع فيها كل الفطريات الناقصة التي يكون Teleomorph أي الطور الجنسي غير معروف ، والطور اللاجنسي Anamorph يتكاثر بتكوين الكونيديا وهي المجموعة الوحيدة التي لها تسمية واحدة للفطر وهي تسمية للطور اللاجنسي ومنها *Candida albicans*

الطور اللاجنسي يؤدي الى انتاج Mitospores او افراد ناتجة عن الانقسام التي تكون متشابهة وراثيا ، في حين ان التكاثر الجنسي يسمح بتبادل المعلومات الوراثية ، وتكون هذه الأدوار (اي الجنسي واللاجنسي) في بعض الاحيان معقدة وقد لا يكتمل اندماج النوى (كما سيأتي ذكره) .

وتوجد مجموعة اخرى تسمى الفطريات المخاطية Slime molds التي تمتاز بأن الفطر في احد مراحل حياته يكون على شكل كتلة من الساييتوبلازم اميبي الشكل متعدد النوى يسمى Plasmodium وهو يماثل المايلسيوم في الفطريات الاخرى ويكون من نوع المدمج الخلوي .

فعاليات الأحياء المجهرية وتكاثرها

الصفحة	الموضوع
19	التضاعف في الفيروسات
27	التغذية وإنتاج الطاقة
44	تنظيم الفعاليات الحيوية
45	نمو الأحياء المجهرية
46	النمو في البكتريا
47	نمو المجموع البكتري
52	نمو وتكاثر الأحياء المجهرية حقيقية النواة

فعاليات الاحياء المجهرية وتكاثرها

تختلف درجات فهم ودراسة الاحياء المجهرية اعتمادا على اهميتها مثل اهميتها في النواحي الطبية او النواحي التصنيعية – وهي موضوع الكتاب – لذلك يلاحظ بعض الكائنات لا يعرف الا اسمها ، ولكن في مجال التقنية الحيوية بدأت برامج دراسة الاحياء المهمة من الناحية الجزيئية لتجاوز الكثير من العقبات التي ستناقش لاحقا . كما ان هناك بعض الفعاليات التي تكون عامة بالنسبة للاحياء قاطبة .

التضاعف والتكاثر في الفيروسات :

الفيروسات تتضاعف داخل الخلايا الحية ، لذلك فإن الطاقة التي تحتاجها والمواد الاولية تكون مجهزة من قبل الخلايا المضيفة ، اضافة الى استغلال الفيروس للمكانن الخلوية لتخليق فيروسات جديدة . والجينوم الفيروسي يحوي على المعلومات اللازمة لبناء فيروسات جديدة مرتبة بشكل دقيق . اما الفقيصة او الغلاف البروتيني المكون من بروتينات سكرية في العادة فتحمي الجينوم ، كما انها تحدد تداخلات الفيروسات مع الخلايا اذ تساعد الفيروس على الالتصاق واختراق الخلايا ليبدأ دورة حياة جديدة . وداخل الخلية يقوم الفيروس بتعطيل المكانن الخلوية وتوجيهها لتكوين فيروسات جديدة لتعبأ في الغلاف البروتيني وبعض الأحيان يندمج الجينوم الفيروسي مع كروموسوم الخلية . اما الجزئيات التي تعبأ وتكون وحدات فيروسية متكاملة فيمكن ان تتطلق الى البيئة الخارجية .

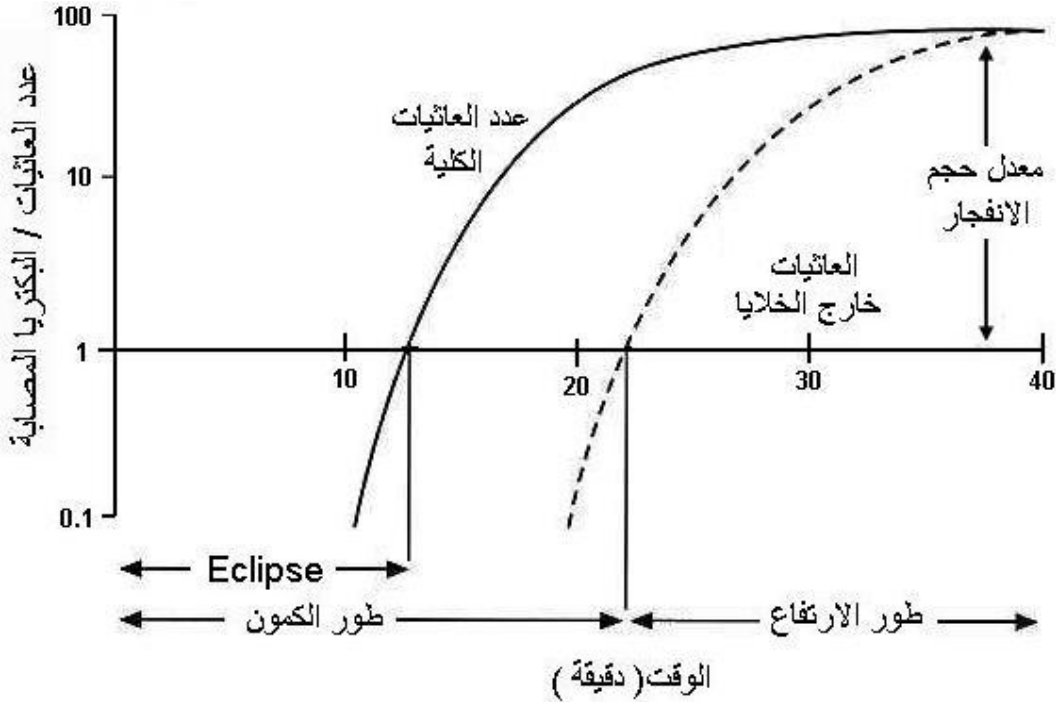
وتختلف الفيروسات في الطرق التي تسلكها في التضاعف اعتمادا على تركيب جينوماتها ، فقد تكون مكونة من اشرطة مفردة من RNA وهذه ليست فيها جينات تشفر للغلاف البروتيني لذلك تعتمد على الخلية المضيفة ومثل هذه الفيروسات تحوي على تواليات نووية (IR) Inverted repeats بشكل يشبه العناصر القافزة Transposable elements (التي سيأتي ذكرها لاحقا) ومثل هذه الفيروسات القهقرية Retroviruses التي يعتقد انها نشأت من العناصر القافزة .

ودورة حياة الفيروسات وخطوطها العريضة تختلف في بالتفاصيل والطرق التي تسلكها الفيروسات للتضاعف في الخلايا التي تتطفل عليها . والشكل (5) يوضح مراحل او اطوار حياة احد الفيروسات وهو من الفيروسات المكونة من DNA التي تصيب الخلايا البكتيرية .

المرحلة الاولى : تشمل التصاق الفيروس للخلية المضيفة واختراق الحواجز الخارجية لها بعد ازالة الاغلفة البروتينية . ويتم الالتصاق بتداخل الفيروس مع مواقع لمستلمات خاصة على سطوح الخلايا .

وتختلف جزئيات المستلم للفيروسات المختلفة ولكن بصورة عامة هي بروتينات سكرية ، وبعض الأحيان تكون من البروتينات او تجمعات بروتينية ، وعلى كل حال فهذه المستلمات تمثل تكامل في التركيب الفراغي للمستلم للتركيب الفيروسي ، فمثلا يرتبط فيروس HIV المسبب لمرض

نقص المناعة المكتسبة AIDS للمستلم CD4 على الخلايا التائية (T - cells) ويرتبط فيروس Epstein Bar virus الى المستلم CD21 على الخلايا البائية (B- cells) للجهاز المناعي كما ان وجود المستلم على سطوح الخلايا يؤثر في تحديد انتحاء الفيروس نحو الخلايا Cell tropism وبالتالي يساعد في امراضية الفيروس . وعلى العموم فليس كل الخلايا تملك المستلمات الفيروسية على سطوحها ولكنها يمكن ان تصاب فمثلا فيروس شلل الأطفال Poliovirus يستطيع الوصول الى خلايا الجهاز العصبي المركزي عن طريق القناة الهضمية .



شكل 5 : الاطوار المختلفة بعد اصابة البكتريا بالعاثيات

وكل خلية مستهدفة (في حالة وجود المستلمات) يمكن أن تحمل حوالي 100000 موقع مستلم على سطحها لانواع من الفيروسات . وعملية الارتباط بالمستلمات تؤدي الى حدوث تغيرات تجسيمية أو فراغية في المكونات التي ارتبطت وتكون عادة غير قابلة للرجوع .

وبعد عملية الالتصاق تحصل عملية الأختراق والتي تتم في بعض الاحيان بطريقة الإحتساء الخلوي Endocytosis لتدخل الفيروسات الى داخل الخلية عبر الغشاء الخلوي ضمن ما يسمى بالجسيمات الداخلية Endosomes ، وفي حالات أخرى يندمج غلاف الفيروس مع غشاء الخلية إذ يندمج بروتين الدمج الفيروسي Viral fusion protein مع مستلم خلوي اخر يقع على الغشاء الخلوي يسمى المستلم المساعد Co receptor مثل مستلمات Chemokine في حالة فيروس نقص المناعة المكتسبة HIV .

وعند دخول الفيروسات تبقى اغلفته البروتينية على السطح ، لذلك تقوم الفيروسات بأنتاج mRNA لبناء هذه البروتينات عند اكتمال الدورة ، وعملية ازالة الاغلفة البروتينية او القفصية تكون متزامنة او بعد مدة قصيرة من عملية الاختراق . وهذا يعني حصول تغير او فصل فيزيائي للحوامض النووية للفيروس عن مكونات التراكيب الخارجية ، كي تتمكن الحوامض النووية من ممارسة وظيفتها . والجينوم يمكن ان ينطلق كحوامض نووية حرة كما في مجموعة Picornaviruses او على شكل Nucleocapside كما في Reoviruses وهذا يعني انطلاق الحوامض النووية مع بعض البروتينات ومنها انزيمات الكوثرية Polymerases .

جدول 1 : المسارات المختلفة لانتساخ الحوامض النووية لمجاميع مختلفة من الفيروسات

نوع الحامض النووي الفيروسي والمجموعة الممثلة	التراكيب الوسطية	نوع mRNA	الملاحظات
+ ssDNA Paroviruses	±ds DNA	+ mRNA	
± dsDNA اكثر فيروسات DNA مثل الفيروسات الغدية والهربس		+ mRNA	
+ ssRNA Picornavirus, Togavirus , Flavivirus	± dsRNA	+ mRNA	الحوامض النووية الفيروسية تعمل كعوامل الإصابة ويمكن ان تعمل كـ mRNA
± ds RNA Reovirus	-	+ mRNA	يحيوي الفيروس يقوم RNAP بنسخ كل قطعة من الفيروس الى mRNA+
- ss RNA Rhadoviruses , Paramyxoviruses , Orthomyxoviruses	-	+ mRNA	الحوامض الفيروسية لا تحدث الاصابة ويحيوي الفيروس على RNAP
+ ss RNA Retrovirus	- DNA ± DNA	+ mRNA	جزيئات الفيروس تحوي على انزيم النسخ العكسي ، وجزيئات RNA الفيروسي لا تسبب الإصابة ولكن نواتجها من DNA المكمل تقوم تقوم بتحويل الخلايا

اشرطة مزدوجة . ds
 اشرطة مفردة ss
 - اشرطة سالبة
 + اشرطة موجبة
 ± حلزونات تحوي على اشرطة سالبة وموجبة

المرحلة الثانية : وتشمل مرحلة تخليق الحوامض النووية ودورة تضاعف الفيروس وتلي عادة دخول الفيروسات وازالة الاغلفة البروتينية ، ويكون ذلك بانتساخ جزيئات خاصة من mRNA وتستعمل الفيروسات (DNA) المختلفة مسارات مختلفة لتخليق mRNA اعتماداً على تركيب الحوامض النووية التي تحويها ، وهناك عدة اليات تعمل على جعل mRNA الفيروسي يتنافس مع mRNA الخلوي لانتاج البروتينات بكميات كافية ، والبعض منها موضح في الجدول (1)

في الفيروسات ذات الأشرطة المزدوجة dsDNA فإن البروتينات المبكرة تتكون بسرعة بعد الإصابة والبروتينات المتأخرة مثل بروتينات القفيصة تتكون في مرحلة متأخرة من الإصابة ، والجينات المبكرة قد تغلق أو تبقى مفتوحة التعبير عند المراحل النهائية من الدورة .

أما الفيروسات المكونة من RNA فيتم التعبير عن الجينات كلها في الوقت نفسه ، ولكن توجد سيطرة على عمليات تخليق البروتينات اعتماداً على الحاجة اليها وبالكميات اللازمة والتنظيم يتم ببعض البروتينات الفيروسية التي تسيطر على عمليات استمرار انتساخ وترجمة mRNA .

وفي حالة التواليات المتداخلة (Overlapping sequences) وهي حالة شائعة في الفيروسات وذلك يعني اشتراك بعض التواليات في تخليق بروتينين ، فإن التحديد يتم باستعمال آلية قراءة الإطارات Reading frames أو استعمال اثنين من جزيئات mRNA تبدأ بقراءة الجينات من مناطق مختلفة . ومن الملاحظ ان اكثر التغيرات تحصل في التعبير عن الجينات في الفيروسات RNA . أما فيروسات DNA فهي تتضاعف في النواة وتستعمل RNAP و DNA Polymerase وأنزيمات المعالجة الأخرى العائدة للخلية . وتكون الفيروسات الكبيرة اقل اعتماداً على المكاين الخلوية من الفيروسات الصغيرة لذلك تكون حساسة لمواد العلاج الكيماوية ضد الفيروسات . وبشكل عام تختلف مواضع تكاثر الفيروسات داخل أقسام الخلية وكذلك مواقع نضجها ومدة تضاعفها والجدول (2) يوضح بعض هذه المؤشرات .

ويمكن إجمال بعض المعلومات عن الفيروسات التي تصيب الخلايا حقيقية النواة بالآتي :

1- أن فيروسات DNA تتضاعف في النواة ، في حين ان فيروسات RNA تتضاعف في الساييتوبلازم بشكل عام مع وجود بعض الاستثناءات .

2- عمليات تخليق البروتينات الفيروسية تحصل في الساييتوبلازم على تجمعات الرايبوزومات

. Polyribosomes

3- العديد من البروتينات الفيروسية تعاني من تحويرات بعد الترجمة مثل التسكر او اضافة مجاميع الأسيل (Acy) وغيرها .

المرحلة الثالثة : وتمثل مرحلة التجميع أو التشكل والانطلاق ، فبعد تكون الأشرطة النووية وبروتينات القفيصة تتجمع مع بعضها لتكون الأفراد الجديدة من الفيروسات ، وبعد ذلك تنفجر الخلية التي قد تصل اعداد الجزيئات الفيروسية فيها الى حوالي 100000 ، ولكن في بعض الأحيان وخاصة في الفيروسات المغلفة باغلفتها البروتينية تخرج من الخلايا بعملية تشبه عملية التبرعم ، إذ يتم اقحام الغلاف الفيروسي المكون من البروتينات السكرية في غشاء الخلية ثم تندفع Viral nucleocapsids في البرعم وفي أثناء هذه العملية تكتسب الفيروسات الغلاف الخارجي Envelope

جدول 2 : بعض مواصفات الفيروسات ومواقع تضاعفها في الخلايا

العائلة الفيروسية	وجود الغلاف الفيروسي	تضاعف الجينوم	موقع تكوين الوحدة الفيروسية	نضج الفيروس	مدة التضاعف (ساعة)
DNA					
Parvoviridae	-	النواة	النواة	النواة	
Polyomaviridae	-	النواة	النواة	النواة	48
Adenoviridae	-	النواة	النواة	النواة	25
Hepadnaviridae	+	النواة	ساييتوبلازم	اغشية الشبكة الاندوبلازمية	
Herpesviridae	+	النواة	النواة	الاعشية الخلوية	72 – 15
Poxviridae	-	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	20
RNA					
Picornaviridae	-	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	8 - 6
Reoviridae	-	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	15
Togaviridae	+	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	الغشاء البلازمي	24 - 10
Flaviviridae	+	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	أغشية الشبكة الاندوبلازمية	
Retroviridae	+	النواة	ساييتوبلازم	الغشاء البلازمي	
Bunyaviridae	+	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	أغشية أجسام كولجي	24
Orthomyxoviridae	+	النواة	النواة	الغشاء البلازمي	30 – 15
Paramyxoviridae	+	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	الغشاء البلازمي	48 – 10
Rhabdoviridae	+	ساييتوبلازم	ساييتوبلازم	الغشاء البلازمي	10 – 6

وفي بعض الخلايا حقيقية النواة فان بعض الفيروسات قد لا يتم نضجها بشكل كامل لذلك تتجمع في الخلية مكونة الاجسام الاشتمالية Inclusion bodies ، وتظهر على الخلايا اعراض مرضية

وبالتالي تؤدي الى موت الخلايا . وفي بعض الحالات تبقى الفيروسات دون ان تتجمع داخل الخلية ولا تدمرها .

ويلاحظ ان الفيروسات يمكن ان تظهر آليات مختلفة لحدوث الاستماتة Apoptosis (التي سيأتي ذكرها لاحقا) . وبشكل عام فان ظاهرة الاستماتة هي احداث وراثية مبرمجة تؤدي بالخلايا الى تدمير نفسها ، وبعض الفيروسات تؤخر الاحداث المبكرة للاستماتة لغرض السماح لمزيد من الافراد الجديدة بالتكون . كما ان بعض الفيروسات تحفز بشكل نشط المراحل الاخيرة للاستماتة والتي تسمح بانتشار الافراد الناتجة لتنتقل الى خلايا جديدة .

والحقيقة ان ليس جميع اصابات الفيروسات تؤدي الى انتاج افراد جديدة من الفيروسات فالاصابات المنتجة تحدث في الخلايا التي تسمح بذلك Permissive cells اما الاصابات المجهضة Abortive infections تفشل في انتاج الافراد الجديدة وذلك لان الخلايا تكون غير متاحة Non-Permissive cells ولا تستطيع تدعيم التعبير عن الجينات الفيروسية ، او ان الإصابة تكون ناقصة او معطوبة وفيها نقص لبعض الجينات الفيروسية الفعالة . وفي احيان اخرى تحدث الإصابة الكامنة Latent infection وفيها تحدث الإصابة بالجينوم الفيروسي الكامل ولكن لا يمكن التعبير عن الجينات او التعبير عن عدد قليل منها وتبقى محافظة على الخلايا المصابة .

العاثيات البكتيرية Bacteriophages

وهي عوامل تصيب البكتيريا وتتضاعف كطفيليات مجبرة داخل الخلايا ، وتكون هذه الجزيئات خاملة من النواحي الايضية خارج الخلايا . وتعد احد اجار الاساس في الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية ، وهي من الوسائل الفعالة في دراسة الفيروسات على كافة المستويات .

تتكون العاثيات من غلاف بروتيني يحوي في داخله حوامض نووية RNA او DNA . ويتراوح جينوم العاثي من 2 - 200 كيلو قاعدة وتكون الجينومات من اشربة مفردة او مزدوجة . وجينوم العاثي يشفر للوظائف التي يحتاجها العاثي للتضاعف داخل الخلية البكتيرية وهو مثل البلازميدات ولكنه يشفر لبروتينات الغلاف الفيروسي وبروتينات اخرى غير تركيبية لازمة لغرض تجمع جزيئات العاثي .

وتتخذ العاثيات اشكالا مختلفة مثل Polyhedral او الشكل الخيطي او الأشكال اخرى معقدة . والمعقدة منها تحوي على الرأس مع ذنب وبعض الاحيان توجد زوائد تدعى صفائح او الياف الذنب .

وتصنف العاثيات الى مجموعتين رئيسة وهي الضارية Virulent والمعتدلة Temperate

والضارية تدمر الخلايا المضيفة ، واصابة الخلايا بالعاثيات المعتدلة يؤدي الى حالتين

1- النمو المؤدي الى التحلل Lytic growth .

2- حدوث الاستدابة Lysogeny .

في حالة النمو الذي يؤدي الى تحلل الخلايا يكاد يكون متشابهها للعائيات الضارية و المعتدلة ، وفي النهاية يؤدي الى تكوين جزيئات العائى وموت الخلايا المضيقة .

الاستذابة

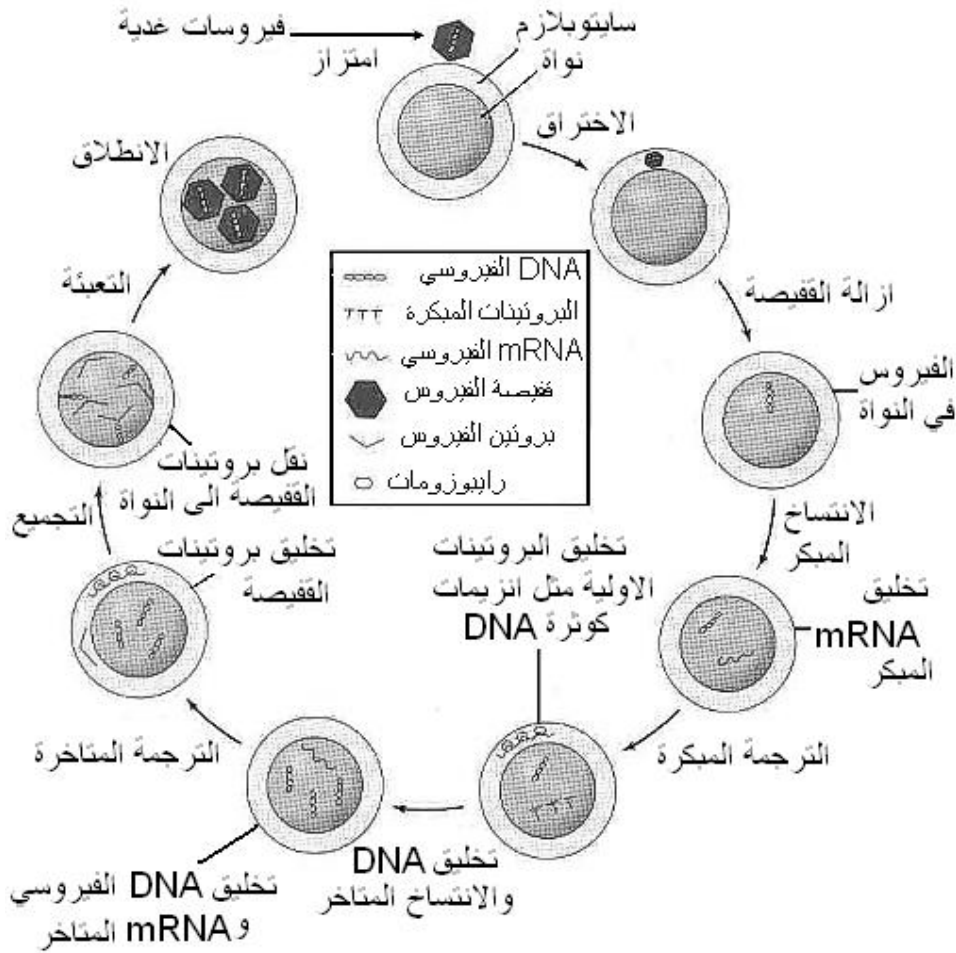
حالة خاصة من الاصابة الفيروسية الكامنة وفيها يتضاعف العائى كعائى اولي Prophage وفي اغلب البكتيرية المستذابة Lysogenic bacteria فان الجينات المسؤولة عن تحليل الخلايا لا يتم التعبير عنها ، وتكون الخلايا المستذابة ذات مناعة للاصابة بالفيروس نفسه عندما تكون حاوية عن العائى الاولى داخلها . والحالة الفيزيائية للعائى الاولى لا تكون متماثلة لكل العائيات فمثل العائى Phage 1 الذي يصيب البكتريا *E.coli* يندمج مع كروموسوم الخلية عند مواقع خاصة ويتضاعف معه بينما العائى الاولى P1 Prophage الذي يصيب البكتريا نفسها يتضاعف كبلازميد Extrachromosomal plasmid .

وعلى العموم ان العائيات الحالة التي تحلل الخلايا بشكل تلقائيا ولكن تبقى بعض الخلايا في حالة استذابة . وتحت العائيات المستذابة في الخلايا بشكل متزامن عند معاملة الخلايا بعوامل تؤدي الى ضرر في DNA مثل الاشعة فوق البنفسجية او Mitomycin C . وفقدان الخلايا المستذابة للعائى يعود بها الى حالة عدم الاستذابة وتصبح حساسة للاصابة بالعائى الذي كان في داخلها كعائى اولي .

ومن الجدير بالذكر ان العائيات يمكن ان تمتلك جينات ليس لها علاقة بتحليل الخلايا او استذابتها ، والتعبير عن هذه الجينات يسمى تحول العائى Phage conversion او تحول الاستذابة ، ومن هذه الحالات والتي تعد مهمة من الناحية الطبية او من عوامل الضراوة ما يحدث في انتاج سم الخناق في البكتريا *Corynebacterium diphtheriae* ، وانتاج سم botulinum في البكتريا *Clostridium botulinum* ، وانتاج سموم الشيكات Shiga-toxins في *E.coli* وغيرها من الحالات . وفي كل هذه الحالات فان الجين المسئول عن التفسير للسم البكتيري هو موجود في جينوم عائى معتدل ، اضافة الى ذلك فان تخصص المستضدات الجسمية O antigens في بكتريا *Salmonella* يسيطر عليها بواسطة تحول العائى .

وتفيد العائيات البكتيرية ايضا في عمليات التصنيف بواسطة استعمال التنميط بالعائى Phage typing اذ تفحص حساسية الخلايا للاصابة بالعائيات للحصول على المعلومات حول العلاقة بين العزلات السريرية والتي تكون مهمة في الدراسات الوبائية .

وعند اصابة الخلايا فان نمط الاصابة يكون بنمط خاص كما موضح في الشكل (6)



شكل 6 : المراحل الاساسية لدورة الفيروسات

تكاثر العاثيات :

بعد اضافة العاثيات الى الخلايا الحساسة ، تبدأ الاصابة بعملية الامتزاز الى مستلمات خاصة على سطوح الخلايا ، وتبقى القفيصة او الغلاف البروتيني على سطح ويحقن الحامض النووي (RNA او DNA) بعملية الاختراق يلي ذلك طور الكمون Eclipsed period (شكل 5) وفي هذه المرحلة يحصل اضطراب في جزيئات الفيروس وتفقّد امكانية قياس قابليتها على الاصابة ، وطول هذه الطور يعتمد على كل من الفيروس والخلية المضيفة (وهذا يحدث مع الفيروسات الاخرى وليس العاثيات) . وفي الحقيقة تحدث فعاليات تخليقة مكثفة ، اذ يحصل فيها اعادة توجيه الفعاليات الحيوية لتلائم متطلبات الفيروس الغازي ، لانتاج نسخ من جينومات الفيروس وكذلك انتاج بروتيناته . وفي اكثر العاثيات يتم تجميع الحوامض النووية والبروتينات في الساييتو بلازم وتنطلق العاثيات الكاملة الجديدة بعد تحلل الخلايا .

اما في العائيات الخيطية فان مكونات العائي تتجمع عند غلاف الخلية وتتطلق دون ان تقتل الخلايا . ينتهي طور الكمون عندما تظهر الجزيئات العائي في الخلية اما طور Latent period فهو يمثل المدة من الاصابة الى حين ظهور العائيات خارج الخلايا .

اما طور الارتفاع Rise period فهو يمثل المدة من نهاية طور الكمون الى حين تصبح كل العائيات خارج الخلايا والتي يمكن ان تتم عندما تصل الخلايا حجم الانفجار Burst size والآخر يمثل معدل عدد جزيئات العائي التي تنتج من كل خلية مصابة ، وتكون خاصة لكل عائي وعادة تكون بين 50 - عدة مئات .

التغذية ونتاج الطاقة

توجد بعض الفعاليات التي تكون مشتركة في الكائنات الحية ، فالفيروسات التي سبق ذكرها لاتقوم بإنتاج الطاقة لأنها تعتمد على الخلايا المضيفة نظرا لوضعها الخاص بالنسبة للحياة . أما خلايا الأحياء المجهرية سواء كانت بدائية النواة او حقيقية النواة فتعتمد في الأغلب الى انتاج الطاقة بنفسها ، يتناول هذا الجزء بعض المعلومات حول انتاج الطاقة تمهيدا لدراسة النمو على المستوى الخلوي او المجموع الكلي للخلايا . ويمكن تقسيم الأحياء عامة اعتمادا على طريقة تغذيتها والطاقة المستعملة أي تقسيم الأحياء من الناحية الفلسجية وفي هذا التقسيم هنالك بعض المؤشرات المعتمدة ، ويحصل التداخل بين المجاميع إذ يمكن لبعض الأحياء أن تشغل أكثر من موضع :

1- المصدر الكربوني : وفيه تقسم الاحياء الى ذاتية التغذية Autotroph وهي التي تستطيع استخدام صور الكربون الأكثر أكسدة المتمثلة بثنائي اوكسيد الكربون CO_2 ويكون الرقم التأكسدي للكربون $+4$ ، ويحول الكربون بعمليات اختزال متعاقبة ليصل الى رقم تأكسدي -4 - والمتمثل بالكربون في المركبات العضوية ويمكنه الدخول الى الانظمة الحيوية التي تكون صفتها العامة والمميزة انها انظمة مختزلة . وتتمثل هذه المجموعة بالنباتات التي تقوم بعمليات التخليق الضوئي والاحياء المجهرية التي تستطيع ان تثبت ثنائي اوكسيد الكربون وتتصف بشكل عام بوجود الاجسام الكربوكسيلية .

والمجموعة الاخرى وهي متباينة التغذية Heterotrophic وهي التي تستطيع ان تستخدم الكربون المختزل فقط كما في المركبات العضوية . وتتمثل بأغلبية الأحياء الموجودة على الأرض وتعتمد على الأحياء التي تقوم بعملية التخليق الضوئي وإستخدام الطاقة الضوئية من ضوء الشمس لتحولها الى طاقة كيميائية تخزن في الأواصر الموجودة بين ذرات الكربون في المواد العضوية وتعمل هذه المجموعة على اكسدة الاواصر للحصول على الطاقة .

وتوجد ضمن هذا التقسيم بعض الاحياء التي تستطيع ان تبدل نمط تغذيتها من الذاتية الى المتباينة وبالعكس اعتمادا على الظروف المحيطة .

2- **مصدر الطاقة** : اعتمادا على هذا المؤشر تقسم الاحياء الى احياء ضوئية التغذية Phototrophic التي تستعمل الضوء مصدرا لاختزال الكربون المؤكسد وتحويله الى كاربون مختزل وتتمثل بالنباتات وبعض البكتريا التي تقوم بعمليات التخليق الضوئي الخاص .

المجموعة الثانية ضمن هذا المجال هي كيميائية التغذية Chemotroph التي تستخدم الطاقة الكيميائية المخزونة بين ذرات الكربون المختزل في الجزيئات العضوية لغرض الحصول على الطاقة لتقوم بفعاليتها الحيوية .

3- **مصدر الهيدروجين** : ويستعمل الهيدروجين كمعط للالكترونات لغرض اختزال الكربون المؤكسد او غيره من المواد ، وهنا يمكن ان تقسم الاحياء الى احياء ذات تغذية صخرية Lithotroph عندما تستخدم مركبات لاعضوية لاختزال الكربون كما هو الحال في النباتات التي تستخدم الماء مصدرا للهيدروجين وكذلك بعض البكتريا التي تستخدم مركبات الهيدروجين اللاعضوية اخرى مثل كبريتيد الهيدروجين H_2S .

وعلى الطرف الثاني يمكن ان تكون مصادر الهيدروجين مركبات عضوية غير قابلة للتخمر وتسمى الاحياء عندها Organotroph ، وتستعمل عادة مركبات عضوية قليلة الطاقة مثل اللاكتات او اللبنات (Lactate) والتي لا تصلح لعمليات التخمر وانتاج الطاقة منها .

وعليه فيمكن اشتقاق الموقع التصنيفي للكائن الحي من دراسة المؤشرات وتذكر في التسمية اولا مصدر الطاقة يليه مصدر الكربون ثم مصدر الهيدروجين لذلك يمكن ان تكون النباتات ضمن مجموعة Photoautolithotroph ، في حين تكون الخلايا الحيوانية ومن ضمنها خلايا الانسان ضمن المجموعة التصنيفية Chemoheteroorganotroph .

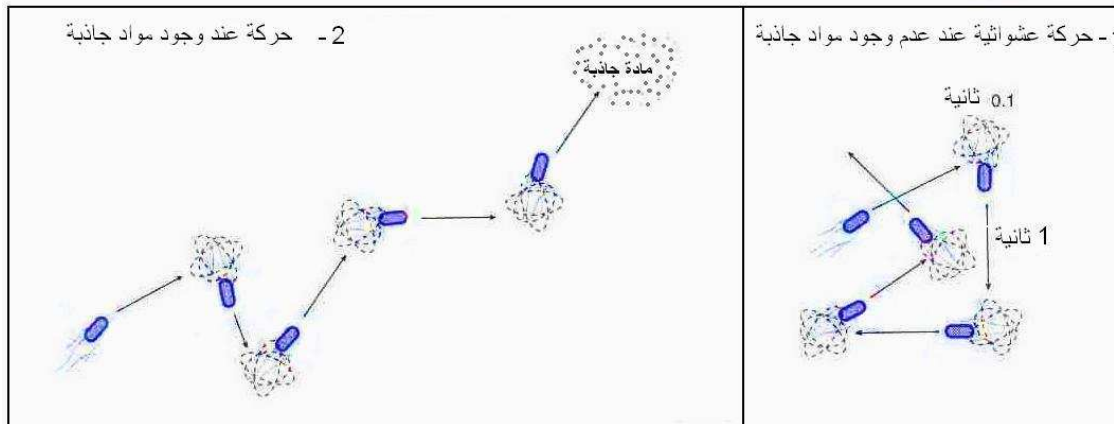
الانجذاب للمواد الغذائية

تظهر الاحياء وخاصة المجهرية المتحركة ظاهرة الانجذاب Taxis باتجاه عدة عوامل مثل المواد الكيميائية (الغذائية) او تجاه الضوء أو جهد الأكسدة والاختزال أو غيرها من العوامل ولعل اهمها في هذا المجال هو الانجذاب الكيماوي Chemotaxis . فالاحياء المتحركة ومن اهمها البكتريا يمكن ان تحدد مكان وجودها بالنسبة للمحفزات الكيميائية . ويكون الانجذاب الكيماوي الذي يعمل بشكل رئيس كعامل مهم في التغذية ، فانه يعتمد في مجالات على عوامل ليست خاصة بالتغذية او ايض الخلايا . ومن جهة اخرى فان الخلايا يمكن ان تنصرف للحصول على الطاقة ليس عند وجود المواد الغذائية وانما استجابة لحالة الطاقة الايضية داخل الخلية اي نتيجة لتغير مستويات الطاقة داخل الخلية وليس للمؤثر الخارجي وهو المادة الغذائية ، وتعطي إشارات انجذاب كيماوي نتيجة لتغير مستوى الطاقة او تغير جهد الاكسدة والاختزال داخلها .

في البكتريا يوجد نظام للانجذاب الكيماوي Chemotactic system لا يعمل في مجال وجود المواد الغذائية فقط . فمثلا في *E. coli* يوجد حوالي 20 من المستلمات المختلفة يشترك بعضها في عمليات نقل المواد الغذائية ، ولذلك يلاحظ ان الخلايا يمكن ان تغير تصرفاتها نتيجة لعبور بعض المواد للاغشية الخلوية . والانجذاب الكيماوي يمكن ان يكون ايجابيا عند الانجذاب للمواد الجاذبة Attractants او الابتعاد عن المواد المنفرة Repellants هو نوع من الاستجابات الخلوية التي يتم بواسطة المستلمات الموجودة على سطوح الخلايا .

والأحياء التي لا تستهلك الهيدروكربونات مثلا تتحرك بعيدا عنها لتقليل الاثر السام لها ، في حين ان الاحياء المستهلكة لها تمتلك الوسائل التي تقربها منه ، فمثلا الاحياء التي تقوم بتفكيك الهيدروكربونات مثل *Pseudomonas putida* G7 التي تحلل النفثالين تحوي على البلازميد NAH7 الحاوي على الجين *nahY* الذي يشفر للبروتين NAHY وهو بروتين غشائي نهايته الكربوكسيلية مشابه للبروتينات الناقلة لإشارة الانجذاب الكيماوي المعروفة في البكتريا العامة MCPs) Methyl – accepting chemotaxis protein (وعليه فان البروتين NAHY قد يكون هو المستلم للنفثالين او مشتقاته .

وعندما تتحرك البكتريا باتجاه المواد او بعيدا عنها فان ذلك لا يكون اعتمادا على تحسسها لتدرج التركيز وذلك لان سطح البكتريا صغير بالنسبة للبيئة وانما تعتمد على الحركة لمسح مكان واسع من البيئة ، فهي تتحرك لمدة ثانية وتتقلب لمدة 0.1 ثانية ثم تسبح ثانية ، وعند وجود مواد جاذبة تسبح البكتريا اتجاه المادة لمدة اطول معطيا توجه اتجاه المادة وكما موضح في الشكل (7)



والغشاء الخلوي للبكتريا المتحركة يحمل عدد من المستلمات MCPs ويوجد جزء منها في الفسحة المحيطة (كما موضح في الشكل 8) وهذا الجزء يستعرض الغشاء الخلوي ، ويرتبط بجزء

آخر على جهة الغشاء الخلوي الداخلية . كما ان بعض مستلمات المثيل يمكن ان تتصل ببروتينات رابطة في الفسحة المحيطة ذات الالفة العالية .

فعند وجود مادة منفرة فانها تتداخل مع MCPs وتؤثر على درجة مثيلته لمساعدة البروتين Che w والذي يؤثر على بروتين آخر هو Che A الذي يتفسر ذاتيا باستعمال ATP مصدرا للفوسفات . ويقوم البروتين المفسر الأخير P-Che A بفسفرة بروتينات أخرى هي Che Y و Che B . و CheB يقوم بعد مدة باعادة MPCs الى وضعه الطبيعي بازالة مجموعة المثيل منه ، في حين يكون Che Y الأساس في إرسال اشارات الى السوط (عضو الحركة) اذ يتداخل الشكل المفسر منه P - Che Y مع بروتينات خاصة موجودة عند قاعدة السوط وهي Fli M , Fli N , Fli G مؤديا الى جعل السوط يدور باتجاه عقرب الساعة مما يؤدي الى اضطراب حركة الخلايا وتبدأ بالتقلب بدون هدف . وتوجد بعض المركبات يمكن ان تعمل على مثيلة Che Y مثل فوسفات الاستيل وغيرها وتؤدي ايضا الى اضطراب حركة الخلايا .

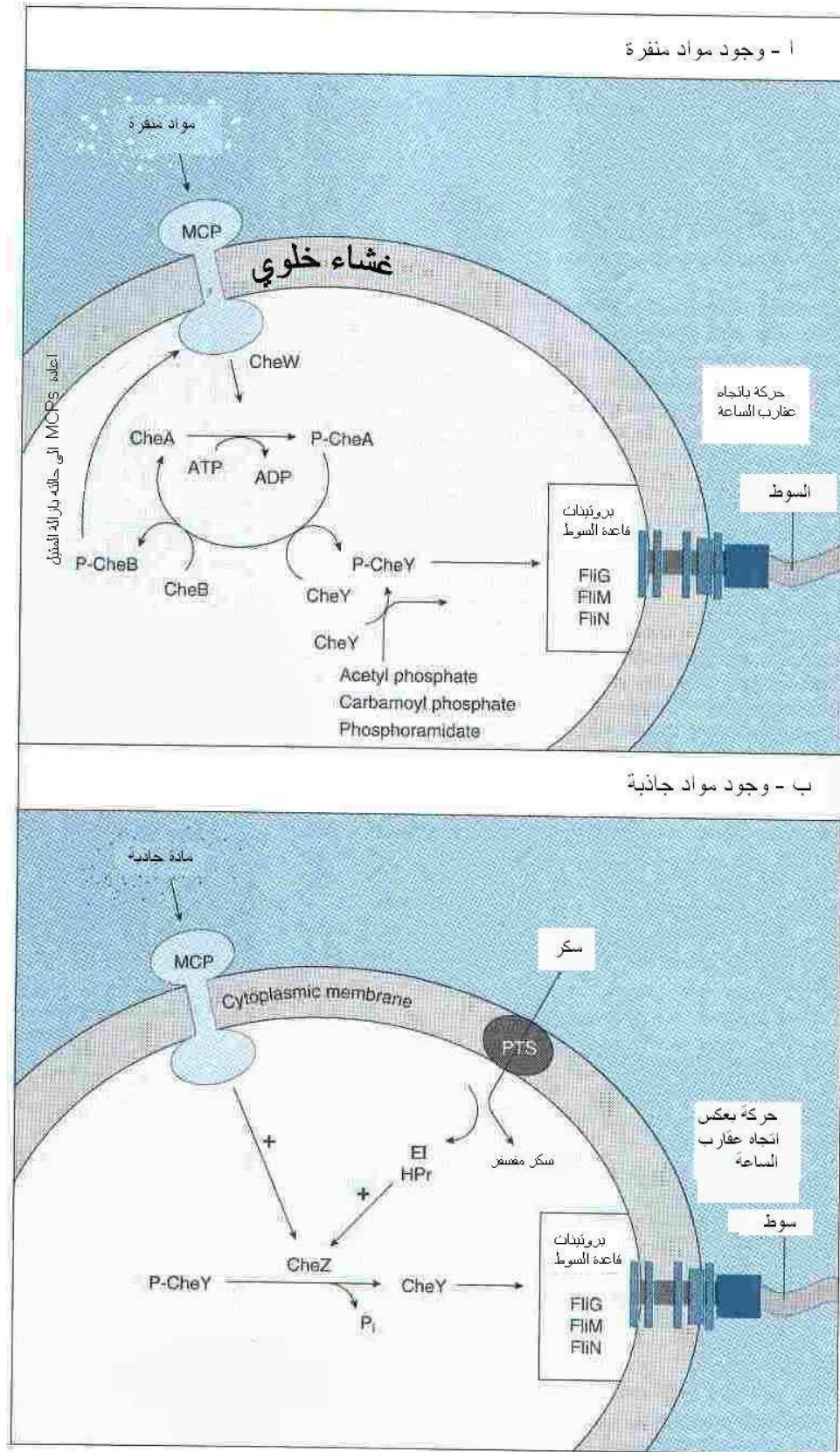
أما عند وجود مواد جاذبة فانها تتداخل مع المستلمات MCPs مؤدية الى زيادة فعالية البروتين Che Z الذي يساعد في إزالة الفوسفات من P- Che Y والشكل غير المفسر منه يتداخل مع البروتينات الموجودة عند قاعدة السوط الذي يبدأ بالحركة الدورانية باتجاه عكس عقارب الساعة مما يؤدي الى سباحة الخلايا بشكل منتظم كما موضح بالشكل (8) .

والبروتينات الموجودة عند قاعدة السوط تستلم اشارتين ، واحدة سريعة وأخرى بطيئة وتبقى لمدة طويلة ، مما يسمح للخلايا التمييز بين الأشارتين على مدى معين من الوقت وهو نوع من الذاكرة للجاذبات الكيماوية ويمكنها من السباحة الطويلة باتجاه المواد الجاذبة المذكورة اعلاه .

اما أنظمة نقل المواد الغذائية في الاغشية الخلوية يمكن ان تؤثر على عملية استجابة الخلايا وحركتها فمثلا نظام نقل السكريات PTS يزيد من كمية Che Y والذي بدوره يؤدي الى زيادة انتظام حركة البكتريا وقد يكون ذلك نتيجة لزيادة فعالية Che Z . ولذا يعد PTS جزءا مهما من ظاهرة الانجذاب الكيماوي في البكتريا المتحركة اذ ان جزيئاته تعمل بمثابة مستلمات كيماوية ، وفعاليتها هذه تساعد البكتريا على الحركة باتجاه التراكيز الملائمة من مواد الأساس التي يعمل عليها النظام .

نقل المواد الغذائية

ان تركيب الغشاء الخلوي المذكور سابقا ووجود المنطقة الوسطية الكارهة للماء يعد حاجزا نضوحيا مهما امام الجزيئات المحبة للماء . كما إن وجود الجدران الخلوية يجعل الخلايا ذات تغذية تنافذية . ولتسهيل نقل المواد يحتوي الغشاء الخلوي على أنظمة لنقل المواد الغذائية وكذلك أنظمة لطرح الفضلات . وغالبا ما تنقل المواد الغذائية ضد التركيز لان الخلايا وخاصة البكتريا تعيش في معظم الاحيان في بيئات منخفضة المواد الغذائية وهذا يعني الحاجة الى الطاقة . وهناك عدة أنظمة



شكل 8 : تداخلات المواد المنفرة والجاذبة المؤثرة على حركة البكتيريا

لنقل المواد الغذائية والتي تختلف باختلاف الخلايا وكذلك باختلاف مواد الاساس التي تنقلها ومن هذه الانظمة :

1 - انظمة الانتشار الميسر Facilitated diffusion systems انظمة نقل لا تحتاج الى الطاقة

اي يكون نقل غير فعال Passive transport يعتمد على التراكيز على جانبي الغشاء ومنها نقل الكليسرول .

2- انظمة نقل معتمدة على وجود بروتينات رابطة وتوجد في البكتريا السالبة لصبغة كرام ويكون النقل بوجود بروتينات رابطة توجد في الفسحة المحيطة . وعملية النقل تزود بالطاقة من ATP أو غيره من المركبات الحاوية على مجاميع فوسفات مرتبطة بأصـــــرة عالية الطاقة ، وتسمى الانظمة الحساسة للصدمات وذلك لأنها تدمر عند تعرض الخلايا لبعض المحاليل . ومن الجدير بالذكر ان حوالي 45 % من المواد تنقل بهذه الطريقة في *E. coli* .

3- النقل المعتمد على الضخ الكيماوي Chemiosmotic – driven transport وبهذه الطريقة تنقل المواد بالاعتماد على القوة الدافعة للبروتون (pmf) Proton motive force - التي سيأتي ذكرها لاحقا - او بالاعتماد على القوة الدافعة للصوديوم والتي تكون قد تكونت قبل عملية النقل ، وتنقل الخلايا حوالي 40 % من موادها بهذه الطريقة . ان عملية النقل تحدث نتيجة لتكون تدرج في تراكيز الايونات عبر الغشاء الخلوي ويوجد منها ثلاثة انواع :

أ – النقل الموحد Uniport وتنقل فيه المواد مع انتقال البروتون الى داخل الخلية بشكل غير معتمد على المادة المنقولة .

ب - النقل المتوافق Symport وفيه تنقل مادتين في الوقت والاتجاه نفسه واستعمال ناقل واحد

ج – النقل المتعاكس Antiport وهذا النظام يساعد في النقل المتزامن لمادتين متشابهة الشحنة والتي تنقل باتجاهين متعاكسين وتتم بواسطة نواقل غير متخصصة مثل H^+ / Na^+ .

4- إزفاء المجموعة Group translocation الطريقة التي تمتاز بنقل المواد التي تكون متغيرة داخل الخلية و تستعملها الخلايا لنقل مجموعة من السكريات التي تكون داخل الخلية سكريات مفسفرة ، وهذا يؤدي الى توفير الطاقة للخلايا بشكل امثل وذلك من جعل عملية النقل مزدوجة مع عملية أيض قادمة وهي الفسفرة . وتسمى الأنظمة العاملة في هذه الطريقة بأنظمة Phosphotransferase systems ومنها PTS الذي يساهم في حركة الخلايا بظاهرة الإنجذاب الكيماوي باتجاه المصدر الكربوني المذكورة انفا ، وكذلك تشارك في تنظيم عدد من المسارات ضمن الكبح بمواد الهدم Catabolite repression .

الطاقة

تحتاج الخلايا الى الطاقة لغرض استمرار حياتها وللحفاظ على انظمتها بشكل مختزل . والمصدر الأساسي للطاقة على الارض هو ضوء الشمس الذي يحول الى طاقة كيميائية بواسطة عمليات التخليق الضوئي وتستعمل نواتجه من قبل الاحياء الاخرى للحصول على الطاقة المتداولة في الانظمة الحيوية وهي ATP .

وتختلف الأحياء في تعاملها مع الطاقة ، فالنباتات والطحالب الخضراء والبكتيريا المزرقسة تقوم باستعمال الضوء لعملية التخليق الضوئي وإنتاج الأوكسجين الجزئي من الماء الذي يمثل معط الهيدروجين اللاعضوي - كما مر ذكره - أما البكتيريا الإرجوانية Purple bacteria فتحول الطاقة الضوئية الى طاقة ايضية ولكن دون إنتاج الأوكسجين .

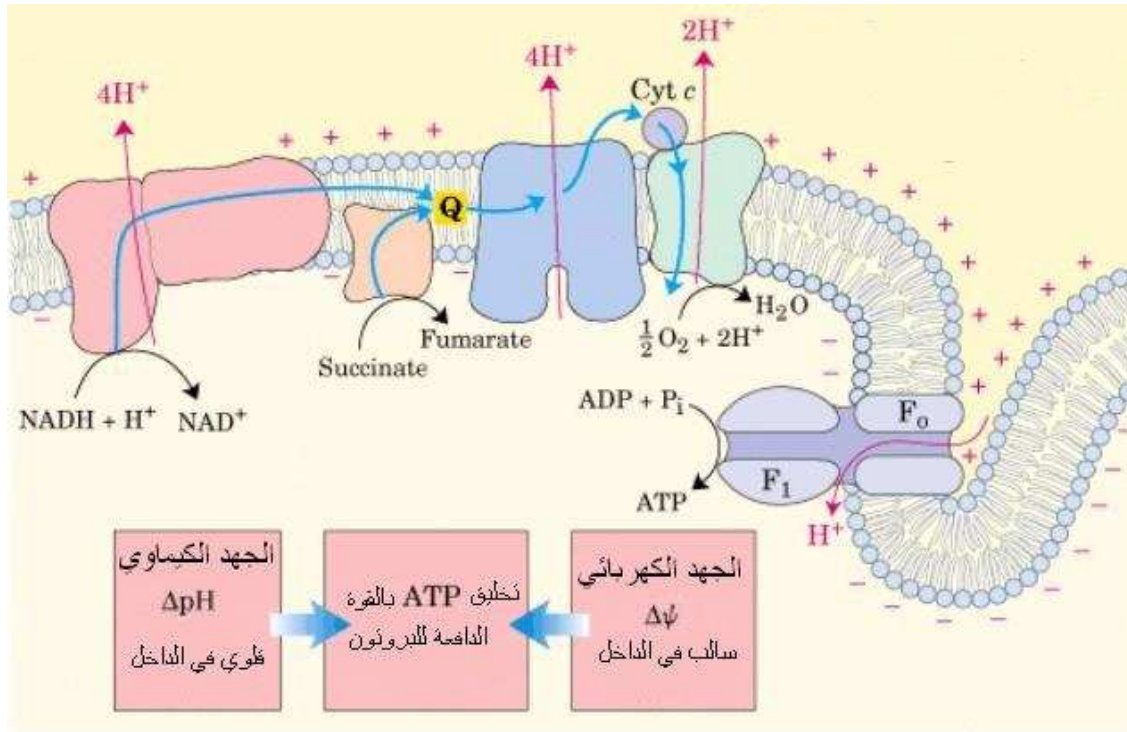
أما الأحياء الأخرى والتي تعتمد بشكل غير مباشر على الطاقة الضوئية فتحرر الطاقة بواسطة التنفس الهوائي بالنسبة للأحياء الهوائية ، واللاهوائية تستعمل بدائل الأوكسجين كمستلمات نهائية للإلكترونات مثل النترات والفيوميرات والكبريتات وثنائي اوكسيد الكربون وبعض الامينات في عملية التنفس اللاهوائي . والأحياء أخرى تستعمل التخمر للحصول على الطاقة والذي يمثل إعادة ترتيب لذرات مواد الأساس للحصول على الطاقة بغياب الأوكسجين .

طرق الحصول على الطاقة

تستعمل الأحياء أثناء التنفس الهوائي واللاهوائي :

I - طريقة الفسفرة التأكسدية Oxidative phosphorylation والتي تحتاج الى غشاء مغلق شبه ناضح وفي البكتيريا يقوم الغشاء الخلوي بالمهمة كما هو في الماييتوكوندريا . وتستعمل البكتيريا الطريقة بشكل مشابه كما يحدث في الماييتوكوندريا في الأحياء حقيقية النواة . ويتم إنتاج الطاقة عن طريق السلاسل التنفسية وهذه تختلف في مكوناتها وعددها في الأحياء بدائية النواة والأحياء حقيقية النواة .

وعلى العموم في داخل الخلية فإن العديد من تفاعلات الأكسدة والاختزال تساهم بالبروتونات والألكترونات التي تزود NAD ، ولكن بعضها يمكن ان تساهم بهدرجة او اختزال مركبات أخرى مثل FMN او FAD أو NADP . بعد الاختزال ينتج $NA DH + H^+$ ويكون بمثابة معط للإلكترونات لباقي مكونات السلسلة التنفسية مثل البروتينات الفلافينية ، ثم تمر الى مركبات الكينون الذائبة مثل Ubiquinone او Coenzyme Q الموجود في الأغشية الخلوية ، وآخر مكونات السلسلة هو احد الساييتوكرومات يعطي الإلكترونات للأوكسجين الجزئي لتكوين الماء كما موضح في الشكل (9)



شكل 9 : إنتاج الطاقة عبر الأغشية الخلوية بالفسفرة التأكسدية

ويلاحظ في الشكل ان ذرات الهيدروجين تعاني من تفكك ، اذ تفصل البروتونات وتضخ الى الخارج والالكترونات المتحررة تذهب الى مكونات السلاسل التنفسية مثل الساييتوكرومات الحاوية على الحديد الذي يتذبذب بين حالات الاكسدة والاختزال (حديدوز - حديدك) .

ونظرا لانتقال البروتونات الى خارج الخلية فانه يؤدي الى شحن الغشاء الخلوي اذ يكون السطح الخارجي موجب والداخلي سالب ويعني وجود فرق في الجهد الكهربائي $\Delta \Psi$ كما ان عملية ضخ البروتونات الى الخارج يؤدي الى حدوث فرق في الرقم الهيدروجيني ΔpH بين داخل وخارج الخلايا ونتيجة لذلك تتكون القوة الدافعة للبروتون pmf والعلاقة بين التدرج الكيمائي الالكتروني يمكن ان تحسب بالمعادلة الآتية :

$$pmf (\Delta p) = \Delta \Psi + 0.06 \Delta pH$$

ولذلك تسحب البروتونات من خارج الخلية الى داخلها من خلال قنوات خاصة بالبروتونات ورجوعها يمكن ان يرتبط مباشرة بعدد من الفعاليات :

- 1- تكوين ATP بواسطة انزيمات مرتبطة بالغشاء من ADP والفوسفات اللاعضوية
- 2- حركة مرافقة للمذابات أو المواد الغذائية عبر الغشاء الخلوي .
- 3- حركة الأسواط البكتيرية ، أو أنواع أخرى من الحركات في الخلايا التي لا تحوي على أسواط

وتختلف الأحياء فيما بينها في السلاسل التنفسية وكذلك الاختلاف يعتمد على مستلم الإلكترونات النهائي هل هو الأوكسجين أو بدائله في التنفس اللاهوائي ، ويكون الاختلاف في السالبية الكهربائية Electronegativity مهما في ذلك والتي على ضوءه تترتب المكونات ، وكذلك تختلف المكونات في عددها لذلك اختلفت كمية الطاقة الناتجة في الخلايا ، ففي بعض الخلايا يتم الحصول على 1 - 3 من ATP لكل جزيئة NADH_2 ، فنظريا تحصل الخلايا الهوائية على 38 مول من ATP لكل مول من الكلوكوز تتم اكسدته بشكل كامل ، اما تحت الظروف اللاهوائية فيكون الناتج النظري 2- 3 مول من ATP لكل مول من الكلوكوز .

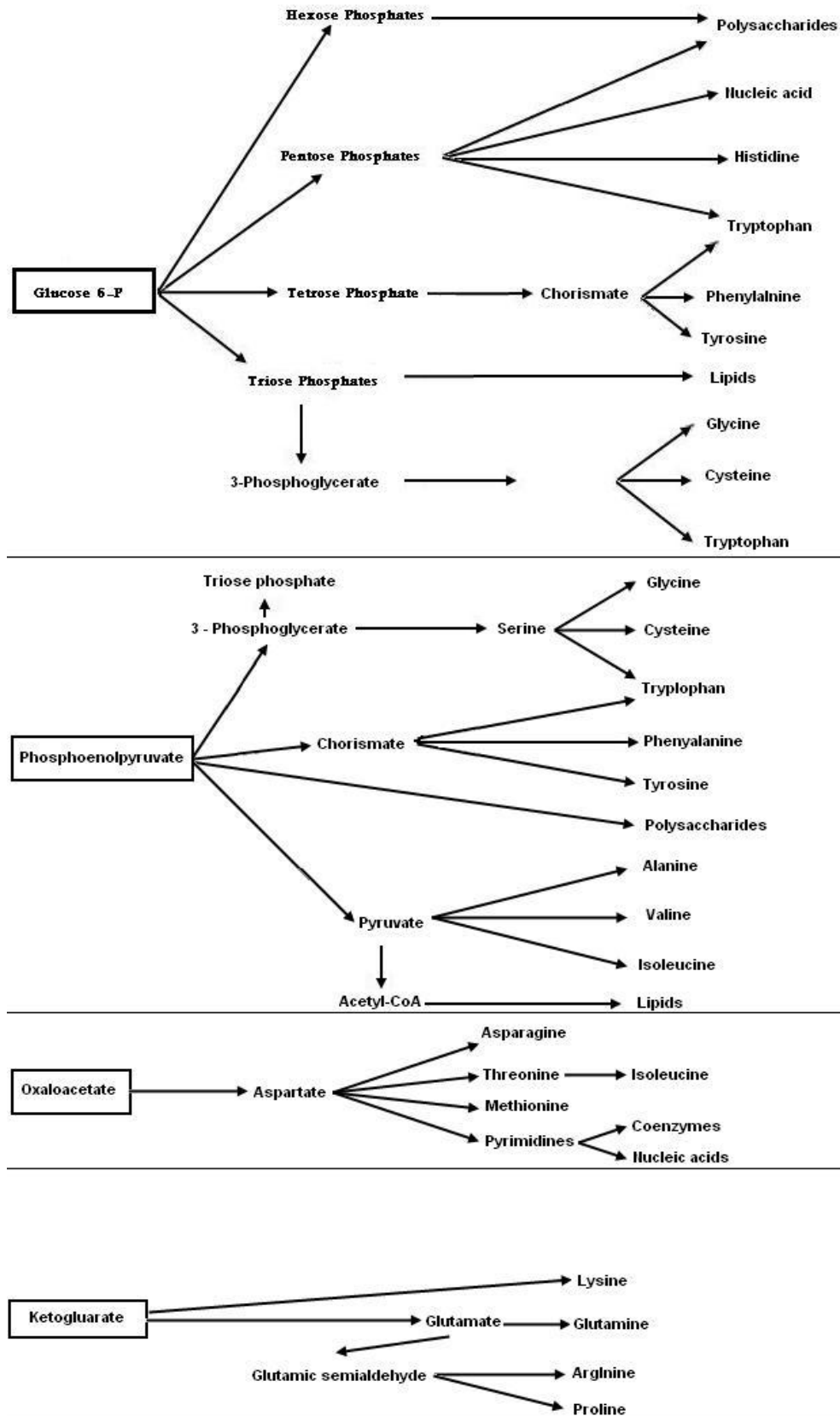
اما في حالة التخليق الضوئي فان طاقة الضوء تؤدي الى توليد التدرج الكيميائي الكهربائي وتتكون pmf عند رجوع الإلكترونات الى حالة الاستقرار ، وهذا يعني استعمال الطاقة الضوئية لفصل الإلكترونات عن البروتونات ، وتنتقل الإلكترونات من المواد المختزلة الى المواد المؤكسدة ولذلك فالعديد من البكتيريا تقوم بعملية التخليق الضوئي بشكل مستقل عن الأوكسجين ، اما الكربون فيشتق من المواد العضوية او من ربط المختزلات اللاعضوية مثل Thiosulfate مع الكربون المؤكسد CO_2 في تفاعلات خاصة .

وفي الاحياء Chemolithotroph فتستطيع استعمال المختزلات اللاعضوية للتنفس مثل الهيدروجين او ايونات الحديدوز Fe^{2+} واشكال اخرى من مركبات الكبريت والنيتروجين المختزلة II - الطريق الثاني للحصول على الطاقة يتم بطريقة الفسفرة بمواد الأساس Substrate level phosphorylation وهي التي تحدث اثناء عمليات التخمر ، اذ تنتج بعض المركبات المفسفرة لتفصل منها مجموعة الفوسفات الغنية بالطاقة لتكوين ATP من ADP والفوسفات اللاعضوية .

العمليات الايضية :

بعد التطرق الى نقل المواد الغذائية وطرق انتاج الطاقة ، فان الاحياء المجهرية وغيرها من الاحياء تتعامل معها بشكل مختلف . فالاحياء تحتاج الى كوثره الوحدات الاساسية لتخليق التراكيب الخلوية مثل تخليق البروتينات والحوامض النووية والسكريات المكوثره والدهون والتراكيب الخلوية الاخرى . والاوليات لها تكون آتية للخلايا في البيئة المحيطة . وتحتاج عمليات التخليق الى ATP الذي يمثل الشكل المتداول للطاقة في الانظمة الحيوية ويمكن تتبع اصول المسارات التخليقية ومكوناتها من الوحدات البنائية والانزيمات المشاركة بالبحث عن الطلائع التي تكون قليلة نسبيا وهي مواد الايض الاساسية Focal metabolites والموضحة في الشكل (10) .

وتمثل هذه الكلوكوز المفسفر ومركب Phosphoenol pyruvate ومركب Oxaloacetate و α -ketoglutarate ويمكن تقسيم العمليات الايضية في الاحياء المجهرية الى :

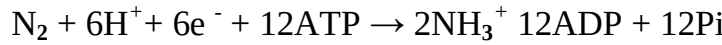


شكل 10 : مواد الايض الاساسية ومشتقاتها

- 1- مسارات تحويل المواد الايض الاساسية
 - 2- مسارات تمثيلية Assimilatory لتكوين مواد الايض الأساسية .
 - 3- مسارات متوالية لتحويل مواد الايض الاساسية الى نواتج نهائية .
 - 4- مسارات لانتاج الطاقة الايضية اللازمة للنمو والإدامة .
- وعند تزويد الخلايا بمواد الايض الاساسية المذكورة اعلاه ومصادر الطاقة تقوم الخلايا بتكوين الجزيئات الحيوية الكبيرة لبنائها ومنها .
- تخليق DNA والتي تستعمل كقوالب لتخليق mRNA والذي يترجم الى بروتينات .
 - تخليق الكربوهيدرات والدهون وغيرها من المواد فينتج من اعادة ترتيب الوحدات البنائية بواسطة الانزيمات ، وعند تخليق او تكوين الجزيئات الكبيرة تتجمع الوحدات الصغيرة لتكوين التراكيب الخلوية مثل الجدران الخلوية والاعشية الخلوية والرايبوزومات والاسواط وغيرها من التراكيب .
- ومعدلات تخليق الجزيئات الكبيرة والمسارات التخليقية لها تخضع لعمليات تنظيم لغرض جعل المسارات التخليقية متوازنة والابقاء على الخلايا حية .
- وبما ان الاحياء المجهرية تمثل تفرعات بعيدة عن بعضها في شجرة الحياة لذلك يتوقع وجود اختلافات في المسارات الايضية لها وعمليات تنظيمها ، فتخليق او تمثيل مركبات وسطية ذات علاقة وثيقة يوجد اكثر من مسار تختلف في تتابع تفاعلاتها وتنظيمها.
- تايض العناصر الأساسية :**
- يعد الكربون والنيتروجين من اهم العناصر التي تدخل في تركيب المادة الحيوية .
- تثبيت ثنائي اوكسيد الكربون :** بعض الميكروبات تستطيع استعمال ثنائي اوكسيد الكربون مصدرا وحيدا للكربون مثل بعض البكتريا والطحالب وفي اغلبها يتم عن طريق دورة كالفن Calvin cycle ويتم ذلك في الأجسام الكربوكسيلية الحاوية على انزيم Ribulose diphosphate carboxylase الذي يتحد مع ثنائي اوكسيد الكربون ليعطي جزئين من 3-phosphoglycerate وتضاف اليها مجموعة فوسفات اخرى لاعطاء 1,3-di phosphoglycerate والمركب الاخير يختزل ليكون مركبات ثلاثية الكربون Triose وهي جزئين من Glyceraldehyde-3p . وتحصل اعادة ترتيب للذرات لاعطاء مركبات ثلاثية الذرات الكربون التي تحول الى مركبات كربو هيدراتية اخرى . وتحتاج الخلايا الى مصادر طاقة كافية من ATP و NAD (P) H ومجموعة من الانزيمات الخاصة . وفي الاركيا فان ثنائي اوكسيد الكربون يختزل الى الخلات للحصول على الطاقة .
- تمثيل النيتروجين :** ان عملية التمثيل الاختزالي للنيتروجين الجزئي والتي تدعى بعملية تثبيت النيتروجين تكون اساسية لاستمرار الحياة على الأرض . والحلقة التي تقوم بتحويل النيتروجين الجوي

بتكافؤ صفر الى نيتروجين مختزل بشكل NH_3 وبعدد تأكسدي 3- تقوم بها الأحياء المثبتة للنيتروجين والذي يكون قادرا على الدخول الى الانظمة الحيوية نظرا لتشابه درجة الاختزال .

وتتم عملية تثبيت النيتروجين اما بشكل حر في التربة كما في البكتريا المزرقة او *Azotobacter* او بشكل متعايش مع جذور البقول مثل افراد جنس *Rhizobium* او البكتريا *Azospirillum* التي تتعايش مع جذور بعض انواع العائلة النجيلية ، ويمكن ان يتم التثبيت بواسطة بعض البكتريا اللاهوائية مثل بعض انواع جنس *Clostridium* . وتتم عملية التثبيت في نظام Nitrogenase الذي يتكون من إنزيمين رئيسيين أحدهما يحوي الحديد والاخر يحوي على الموليبدنم Mo ، وتحتاج العملية الى كميات كبيرة من الطاقة اذ يتم تحليل 12-16 جزيئة من ATP لاختزال جزيئة واحدة من النيتروجين N_2 الى جزيئة من الامونيا واستعمال 3 جزيئات من $\text{NADH} + \text{H}^+$ ، ويكون التفاعل المجمل كما موضح في المعادلة :



وتتم عملية الاختزال على عدة مراحل كما موضح في الشكل (11) .

واضافة الى ما ذكر اعلاه فان عملية تثبيت النيتروجين لها متطلبات فلسجية اخرى وذلك لان نظام تثبيت النيتروجين حساس جدا للأوكسجين ويثبط به ، ولذلك فان الاحياء الهوائية قد طورت عدة آليات للحفاظ على النظام الانزيمي منها

1- يكون التثبيت في خلايا خاصة محاطة باغلفة وبعيدة عن الهواء كما في

Heterocysts في البكتريا المزرقة

2- أحياء اخرى طورت سلاسل تنفسية ثانوية لاستهلاك الاوكسجين وحماية نظام تثبيت

النيتروجين كما في *Azotobacter* .

3- اما الاحياء التي تثبت بشكل تعايش مثل بكتريا *Rhizobium* فاتخذت طريقة تكوين

العقد الجذرية التي تكون غنية بمركب الهيموغلوبين البقولي Leghaemoglobin الذي

يمنع وصول الاوكسجين الى النظام .

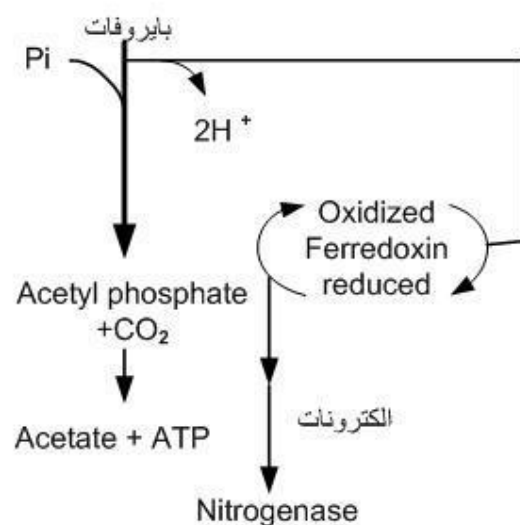
اما باقي الاحياء المجهرية تستهلك النيتروجين المختزل كما في الامونيا ، وأول مدخل للنيتروجين

يكون عن طريق اندماج الامونيا في الكلوتامات التي تتكون من عملية اضافة الامين الاختزالية الى α -ketoglutarate ويكون ذلك بالتين :

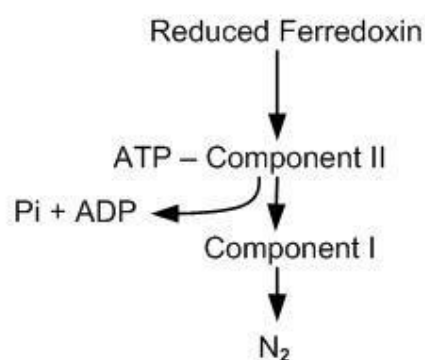
1- عند وفرة كميات كافية من الامونيا تحصل العملية الاختزالية بخطوة واحدة بواسطة الانزيم

النازع لهيدروجين الكلوتامات (GDH) Glutamate dehydrogenase كما في المعادلة الاتية :

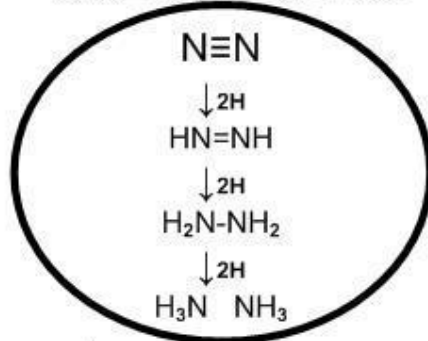
• تهيئة وتوليد القوى المختزلة



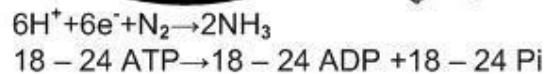
• اختزال النتروجين



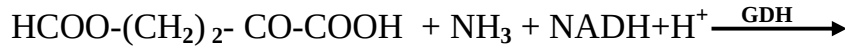
• نقل 6 الكثرونات لاختزال النتروجين



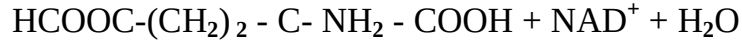
• التفاعل الكلي



شكل 11 : مراحل تثبيت النتروجين



α - ketoglutaric acid



حامض الكلوتاميك

2- وعندما تكون كميات الامونيا متوسطة الوفرة والتي تحصل في البيئات العامة ، تسلك الخلايا في هذه الحالة عملية ذات خطوتين وفيها تستعمل الطاقة الناتجة في تحلل ATP لغرض سحب الامونيا من البيئة وتكوين Glutamine بواسطة انزيم Glutamine synthetase ومنها يمكن نقل مجموعة الامين مباشرة الى مركبات عضوية اخرى لتكوين الحوامض الامينية الاخرى وكذلك تكوين القواعد النيتروجينية البيورينات والبريميديات و Glucosamine ولذلك يلاحظ ان فعالية الانزيم Glutamine synthetase تنظم بتركيز الامونيا المزودة للخلايا وكذلك بالمواد الايضية الحاوية على النيتروجين المشتقة من النيتروجين الاميدي في الكلوتامين .

واغلب النيتروجين العضوي (الحوامض الامينية) يشتق من α - amino group للكلوتامات اذ تنقل مجموعة الامين والمستلم لعملية النقل هي حوامض α - Keto acids التي تتحول الى ما يقابلها من الحوامض الامينية .

التخميرات :

وتعد هذه التفاعلات من العمليات المهمة في عمليات التقنية الحيوية الانتاجية ، وفيها يكون بناء الكتلة الحيوية Biomass عادة قليلة مقارنة بالتنفس الهوائي وذلك لان بناء الكتلة الحيوية يحتاج الى كميات كبيرة من الطاقة التي لا تتوفر تحت ظروف التخمر وفيها تبقى كميات من الطاقة مخزونة في اواصر المواد الناتجة من التخمر غير المؤكسدة . وتحصل التخمرات عند غياب التنفس والتخليق الضوئي .

وتعتمد الخلايا فيها على انتاج الطاقة ATP على عمليات الفسفرة بمواد الاساس بعيدا عن الاغشية الخلوية اي ان عمليات التخمر تجري بشكل اساس في سايتو بلازم الخلايا . ونواتج التخمر يمكن ان تستعمل للنمو لذلك طورت الاحياء العديد من المسارات للحصول عليها وتتصف هذه المسارات بوجود ثلاث مراحل رئيسية .

1- تحويل المركب القابل للتخمر الى معط الفوسفات لغرض حدوث الفسفرة بمواد الاساس وتتم

التفاعلات باشتراك NAD^+ الذي يختزل الى NADH .

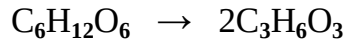
2- فسفرة ADP بواسطة معطي الفوسفات الغني بالطاقة .

3- حصول عمليات ايضية تؤدي الى ارجاع او جلب نواتج التخمر الى حالة التوازن الكيمائي مع المواد التي بدا بها . واهمها اعادة اكسدة NADH التي تكون في المرحلة الاولى لانتاج NAD^+ لغرض استمرار عملية التخمر .

ويلاحظ ان انتاج بعض المواد لا يكون لغرض الحصول على الطاقة او مواد تدخل في بناء المادة الخلوية وانما تكون فقط لاعادة التوازن الايضي كما يحصل في حالة توليد حامض اللاكتيك من حامض البايروفيك (او البايروفات) في بكتريا حامض اللاكتيك اذ تكون هذه الخطوة هو لاستعادة NAD^+ المؤكسد نظرا لمحدودية كمياته في الخلية .

تخمر الكلوكوز : وهناك مساران لتخمير الكلوكوز تؤدي الى انتاج الطاقة بعملية فسفرة مواد الأساس .

1 - المسار الاول وهو التخمر المتجانس ويكون الناتج الرئيس حامض اللاكتيك والذي يحصل في بكتريا حامض اللاكتيك متجانسة التخمر Homofermentative وكما في المعادلة



الكلوكوز حامض اللاكتيك

2- التخمر المتباين والذي يحصل في العديد من الاحياء المجهرية ويؤدي الى انتاج الكحول الايثلي وثنائي اوكسيد الكربون وفق المعادلة :



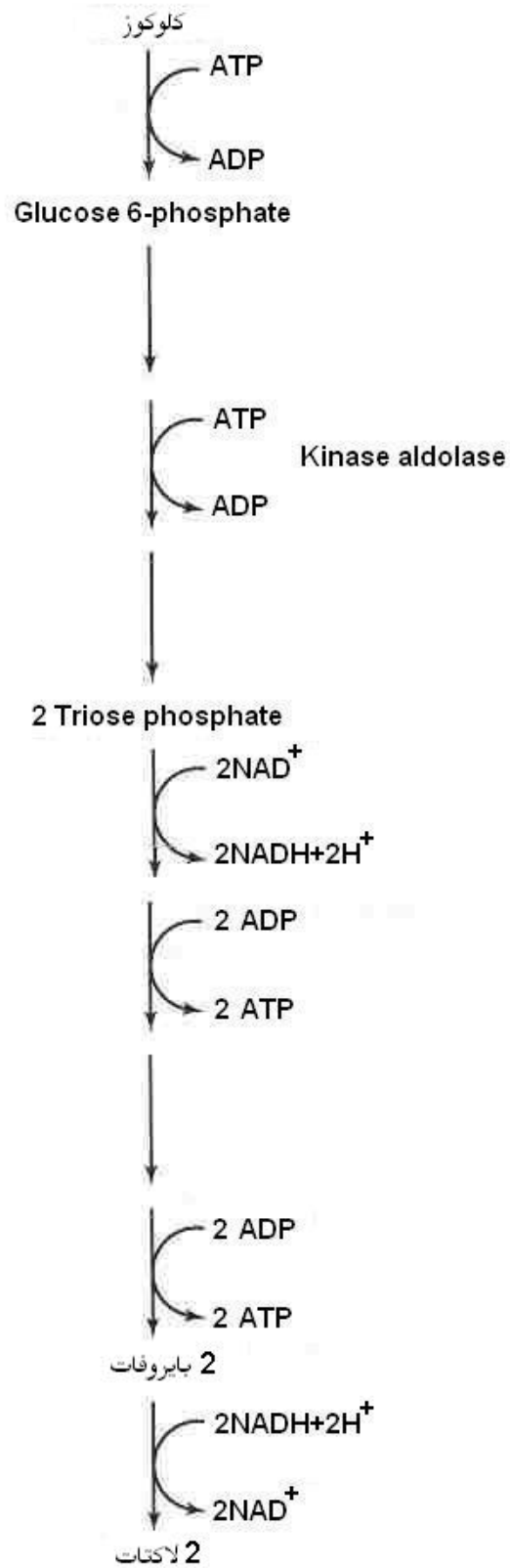
كحول ايثلي

وهذه التفاعلات تحصل بطرق مختلفة بشكل كبير وان تشابهت في النواتج النهائية .
تبدأ الخطوات العامة لتخمير الكلوكوز بفسفرته عند ذرة الكربون السادسة وهذه تكون بالاعتماد على الكائنات الحية :

1- يمكن ان يدخل الكلوكوز عبر الاغشية ثم تتم فسفرته بـ ATP لاعطاء ADP و Glucose - 6p

2- في بعض الاحياء المجهرية يدخل الكلوكوز ويفسفر اثناء دخوله بمركب Phosphoenol pyruvate (PEP) ليعطي Glucose-6p والبايروفات داخل الخلية وهذا يعني ارتباط نقل المركب من ناحية المكان والتركيب .

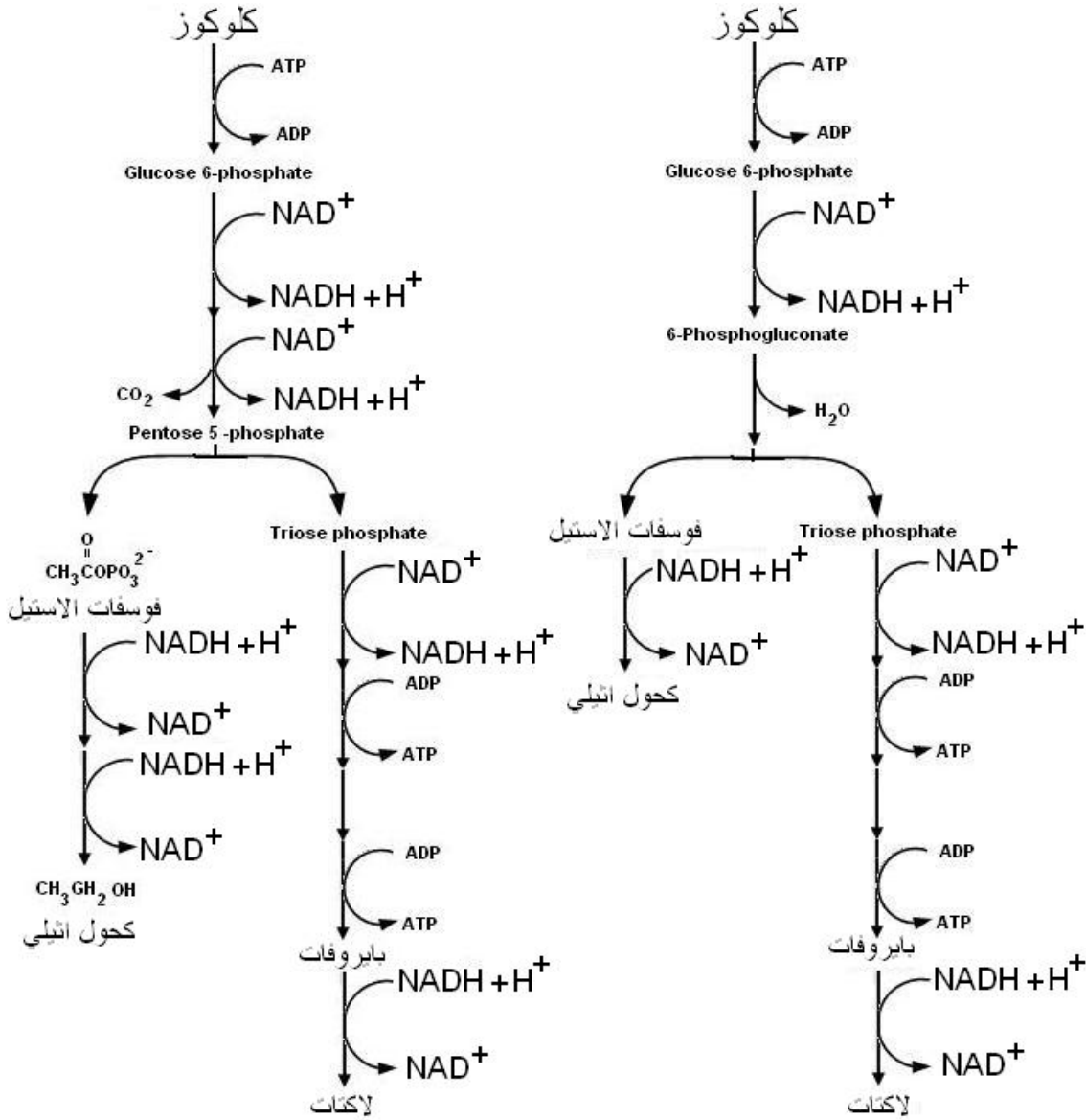
وبعد دخول الكلوكوز الى داخل الخلية يخضع لبعض المسارات منها مسار Embden Meyerhof pathway (EMP) الذي يوجد في الاحياء الهوائية ، وتخضع السكريات السداسية المفسفرة الى تاثير انزيمات الكاينز و Aldolase ليتحول الى مركبين ثلاثية الكربون مفسفرة كما موضح في الشكل (12)



شكل 12 : مسار

Embden - Meyerhof pathway

وتحدث اثناء المسار اربعة تفاعلات تنتج طاقة بطريقة الفسفرة بمواد الاساسية و ينتهي المسار بتكوين جزئين من البايروفات ، واثناء المسار يلزم استعمال جزئين من ATP لفسفرة المركبات ثلاثية الكربون وبذلك يكون صافي انتاج الطاقة من المسار جزئين من ATP وتتعرض البايروفات الناتجة الى العديد من التفاعلات تعتمد على الكائن الحي والمسار الذي تدخله ومنها :



شكل 14: التخمر اللاكتيكي المتباين

شكل 13: Entner - Doudorff

- 1- الاختزال المباشر للبايروفات بـ NADH الذي يؤدي الى الحصول على NAD⁺ مرة ثانية وانتاج حامض اللاكتيك مما يؤدي الى تحميض الوسط .

2- ازالة ثنائي اوكسيد الكربون لتتحول الى الاستالديهايد Acetaldehyde الذي يستعمل لأكسدة NADH مؤديا الى انتاج الكحول الايثلي وهو مركب متعادل .

وفي بعض الاحيان يدخل الكلوكوز الى مسار اخر هو Entner - pathway (ED) Doudoroff ويتم بوجود انزيمات خاصة وفي هذا المسار تتم ازالة جزئية ماء من المركب 6-phosphogluconate يليه تفاعل يشترك فيه انزيم الالدوليز لانتاج البايروفات ومركب ثلاثي ذرات الكربون المفسفر والمسار موضح في الشكل (13)

وفي التخمرات اللاكتيكية المتباينة وبعض التخمرات الاخرى يكون الانزيم الفعال فيها Phosphoketolase والمركبات الناتجة من جراء التغيرات على الكربوهيدرات (وهي في هذه الحالة Xylulose-5-p) تنشط لتعطي فوسفات الاستيل وسكر ثلاثي الكربون مفسفر . وفوسفات الاستيل تقوم باكسدة NADH الى NAD^+ ويتحول مركب فوسفات الاستيل بالاختزال الى الكحول الايثلي ومجمل التفاعلات كما موضح في الشكل الاتي (شكل 14) اعلاه . وهذا المسار يعطي كمية اقل من الطاقة مقارنة بالمسار EMP .

ويمكن ان تسلك الاحياء مسارات متعددة لتخمير كربوهيدرات اخرى لغرض اكسدة NADH على حساب البايروفات كما ان الاحياء يمكن ان تحصل على الطاقة من تايض الحوامض الامينية والبيورينات والبريميدينات بطريقة الفسفرة بمواد الاساس ويمكن ان تستعمل بعض الحوامض الامينية معطيا لالكترونات والاخر مستلما لالكترونات .

تنظيم الفعاليات الحيوية

تعد عمليات تنظيم الفعاليات الحيوية عمليات معقدة جدا في الاحياء المجهرية ومتقنة جدا وتحدث بطرق وأساليب مختلفة حتى في الكائن الواحد تحت ظروف مختلفة وسيتم التطرق في هذا الجزء للخطوط العريضة وستذكر كل حالة على انفراد عند مناقشة تعرض الخلايا لظروف غير ملائمة والتي تحتاج الخلايا الى تنظيم فعاليتها لتلائم مع ما يحيط بها .

وتنظم الخلايا فعاليتها بحيث لا تتكون مركبات وسطية او غيرها لا تحتاجها . كما ان تنظيم تفاعلات في مسار ايزي معين تاخذ بنظر الاعتبار المسارات الايضية الاخرى اي يكون العمل بشكل شبكة ، مع التلاؤم مع ظروف البيئة الخارجية مثل وجود المواد الغذائية وغيرها من الظروف .

وتكون عمليات التنظيم على مستويين :

- 1- السيطرة وتنظيم فعالية الانزيمات الموجودة في الخلية .
- 2- السيطرة على عمليات تخليق الانزيمات .

تنظيم الفعالية الإنزيمية

1- استعمال الإنزيمات الألوسثيرية التي هي Allosteric proteins : وعادة تكون في بداية المسارات الأيضية التخليقية إذ تثبط بالنواتج النهائية للمسار الحيوي ، ولا يمكن ان يكون هذا التثبيط تنافسيا على مواقع ارتباط مادة الاساس في الإنزيم ، وذلك لأن تركيب النواتج لا يشبه مادة الأساس التي بدأ فيها وإنما يكون التثبيط معتمدا على ارتباط الناتج النهائي في موقع اخر من الأنزيم هو الموقع Allosteric site والذي يؤدي الى احداث تغيرات تركيبية في جزيئة الأنزيم ويصبح غير قادرا على الارتباط بمادة الأساس الأولى ويسمى هذا بالتثبيط الألوسثيري .

2- التثبيط الرجعي : وهي آلية موجودة بشكل عام في الأحياء المجهرية لتنظيم انسياب الكربون في المسارات التخليقية وتكون هذه كفاءة جدا . وبعض الأحيان من الأفضل تنشيط انزيم معين دون تثبيطه فمثلا عند زيادة الكلوكوز والمواد الوسطية الناتجة منه تأتي اشارات لتحويل الكلوكوز الزائد الى كلايوجين ويتم ذلك بالتنشيط الألوسثيري للأنزيم الذي يحول الكلوكوز المفسفر الى -ADP glucose ثم الى كلايوجين .

3- التعاونية الإنزيمية Enzyme Cooperativity : وتشارك فيها بعض الأنزيمات قليلة التعدد وتحوي على اكثر من موقع للارتباط بمواد الأساس . وهذه يمكن ان تظهر تداخلات تعاونية مع جزيئات مواد الاساس فالارتباط الى جزيئة واحدة من مادة الأساس الى موقع فعال يزيد من الفة المواقع الأخرى للارتباط الى جزيئات اخرى ، وبذلك يكون صافي التداخلات هو زيادة مضطردة في الفعالية الأنزيمية بشكل متزايد مع زيادة تركيز مواد الأساس .

4- تحويل الأنزيمات تساهميا : العديد من الانزيمات تتغير صفات فعاليتها وتنظيمها عند حصول تغيرات تساهمية في بروتيناتها . مثل تغير استجابة الأنزيم Glutamine synthetase عند ارتباطه للمنقدات الأيضية . وتحصل مثلا في عملية Adenylation أي الارتباط التساهمي للـ ADP الى السلسلة الجانبية من الأنزيم خاصة ثمالة التايروسين Ttrosyl side chain في الوحدة الفرعية للأنزيم والأنزيمات المسؤولة عن اضافة الأدينين يمكن السيطرة عليها ايضا بالتحويلات التساهمية .

5- تعطيل الأنزيمات ——— : هنالك العديد من الأنزيمات تعطل عند تفكيكها وهي حقيقة بالنسبة لكل البروتينات ولكن هذه العملية يمكن ان تنظم في بعض الاحيان بإشارات يمكن ان تنتج من التحويلات التساهمية للأنزيم المراد تفكيكه .

نمو الاحياء المجهرية

عمليات نمو الأحياء المجهرية تختلف باختلاف الظروف التي توجد فيها الاحياء كما انها تختلف بالنسبة للأحياء وحيدات الخلية ومتعددة الخلايا . والنمو يعرف على انه الزيادة الرتبية لكل مكونات الكائن الحي . فالأحياء التي تنمى في المختبر يختلف نموها في البيئات الطبيعية والتي

تميل فيها للعيش بشكل جوقة او مجموعة Consortia مع احياء اخرى وفيها تختلف الصفات الفسلجية والشكلية الخارجية لتساهم في الحفاظ على الأحياء الحية وعليه فأن الفعاليات الحيوية في المجمعات تختلف تماما عن تصرفات وفعالية الخلية المفردة . وسيتم في هذا الجزء مناقشة نمو وتكاثر الاحياء من الناحية النظرية لاحياء وحيدات الخلية مثل البكتريا تحت الظروف المختبرية المثلى لتكون منطلقا للتحويلات التي يمكن ان تحدث تحت ظروف اخرى .

وللنمو مؤشرات منها النمو على مستوى حجم الخلية والذي يكون مسيطرا عليه وراثيا ويمكن ان يكون عرضة للتغير تحت الظروف المختلفة ، أما المؤشر الآخر وهو الزيادة في الوزن والمؤشر الاخر هو الزيادة في العدد ، والاخير يعد مهما جدا في الأحياء وحيدات الخلايا ، وذلك لان في الخلية الواحدة يلاحظ ان المساحة السطحية تتناسب طرديا مع مربع نصف القطر (في الاحياء الكروية والاسطوانية او العصوية) بينما يتناسب الحجم مع مكعب نصف القطر ، ولذلك يلاحظ ان ازدياد حجم الخلية بشكل مضطرب يجعل النسبة بين المساحة السطحية والحجم مختلة ، ولان المكونات الخلوية تحتاج الى مصادر طاقة وإدامة تأتي من خارج الخلايا بالاعتماد على المساحة السطحية وكذلك الحال مع طرح الفضلات ، ولذلك وعندما تصل النسبة الى قيمة حرجة فإنه لابد من انقسام الخلايا ، وهذه الظاهرة قد تعالج في الأحياء العصوية أو الاسطوانية بشكل أني بتكوين الخيوط وعليه فان مؤشر النمو العددي هو الأكثر اهمية في الأحياء المجهرية وحيدات الخلية

النمو في البكتريا

انقسام الخلية : تتكاثر البكتريا بصورة عامة بالانشطار الثنائي ، بعد أن تكون الخلايا قد استطالت أو وصلت القطر المقرر والذي يكون كافيا لإعطاء خليتين . وتحدث هذه بعد تضاعف المادة النووية التي توزع على الخلايا الجديدة وتنقسم الخلايا بتكوين الغشاء الخلوي والجدار الخلوي الى الداخل بمساعدة الأجسام الوسطية الغشائية . والبكتريا تنقصها خيوط الانقسام المغزلية لذلك يقوم الغشاء بمهمة توزيع المكونات النووية وذلك لأن التراكيب النووية متصلة بالغشاء على الأقل قبيل عملية الانقسام . فبعد تضاعف DNA تتحفز عمليات تخليق الغشاء الخلوي بين مواقع اتصال الكروموسومات الشقيقة بالغشاء ، ثم تتباعد بعد نمو الغشاء في تلك المنطقة ويلي ذلك ترسب مواد الجدار الجديدة وتؤدي الى الاستطالة وبالنهاية تضاعف غلاف الخلية الخارجي .

تجمع الخلايا : في بعض الأحيان تبقى الخلايا متصلة مع بعضها بشكل مؤقت بعد الانقسام مما يؤدي الى ظهور الخلايا بتجمعات خاصة وبعض الاحيان مميزة للجنس . والتجمعات الظاهرة تعتمد على مستويات الانقسام وعدد الانقسامات مثل انتاج التجمع المسبحي في الكروية

Streptococci وفي العصوية Steptobacteria او Streptobacilli . ويمكن ان تحصل حركة للخلايا بعد الانقسام مباشرة تؤدي الى جلب الخلايا بوضع متوازي مؤدية الى تكوين تراكيب وندية Palisade التي تكون مميزة لبكتريا الخناق *Cory . diphtheriae* . وفي المزارع القديمة لبعض البكتري التي أعطبت فيها أنظمة الانقسام تظهر فيها أشكال غير منتظمة Involution forms وتشمل تكوين الخيوط او البراعم أو تكوين خلايا متفرعة وأغلب هذه الخلايا لا تكون حيوة .

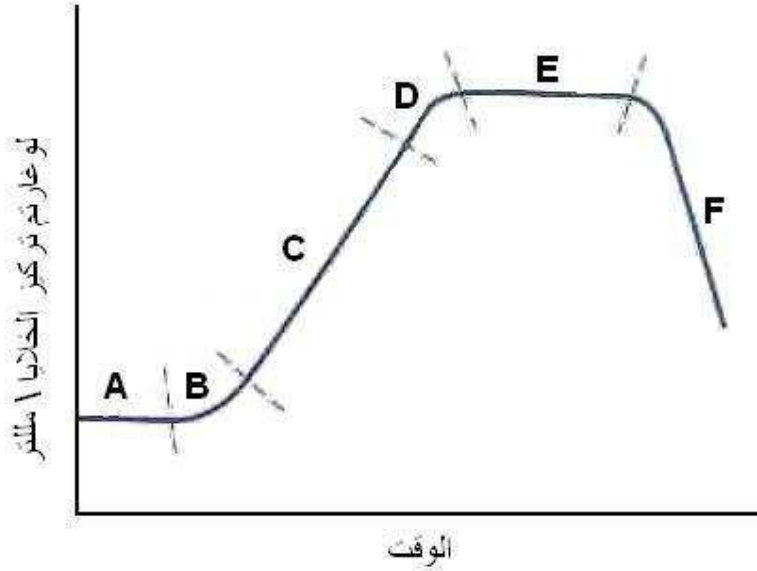
نمو المجموع البكتيري

يوجد عدد من الطرق لقياس نمو الخلايا بعضها مباشرة واخرى غير مباشرة ولكل من الطرق له محاسن ومساوى ، وتعد طريقة تحديد العدد العيوشي Viable count هي الطريقة المرجعية على الأقل في المختبر وفيه يقاس عدد الخلايا الحية التي تكون قادرة على انقسام وتكوين المستعمرات وبذلك تكون طريقة غير مباشرة واهم اهداف قياس نمو المجموع البكتيري هو تحديد منحنى النمو الذي يكون بمثابة مصدر ملائمة للعديد من المعلومات .

منحنى النمو : يتم رسم وقياس منحنى النمو عادة في مزارع سائلة مغلقة مثل استعمال الدوارق الزجاجية والتي تحدث فيها تبادل الغازات فقط ، ويتم عند الظروف المثلى من حيث توفر المواد الغذائية بكميات كافية واستعمال المزارع المهزوزة لغرض التخلص من البيئات الموضعية ودرجة حرارة ملائمة ، وكذلك البدء بأعداد كبيرة تتراوح بين 10^3 - 10^4 خلية أو وحدة تكوين المستعمرات/ ملتر لتتلافى الزحام الذي يؤدي الى تغير نمط الفعاليات الحيوية للخلايا كما سيأتي ذكره . ويتم تلقيح الوسط الغذائي الجديد من مزروع قد نمي مسبقا لحد التشبع وبمتابعة النمو ينتج الشكل الموضح الاتي (شكل 15)

ويلاحظ ان المنحنى ينقسم الى اربعة مراحل رئيسية يتخللها دورين انتقالية . وهذه الأطوار هي التطبع أو التلكؤ (A) Lag phase والطور التزايدي أو الطور اللوغارثيمي (C) Log phase وطور الاستقرار أو الثبات (E) Stationary phase ، والطور الرابع هو طور الانحدار أو الموت (F) Death phase .

وهناك طور انتقالي هو طور التعجيل (B) Acceleration phase والذي يقع بين الطور الاول اي طور التطبع وطور النمو المتزايد ، والطور الانتقالي آخر هو الذي يقع في نهاية طور النمو المتزايد وطور الاستقرار ويسمى طور التباطؤ (D) Deceleration phase .



شكل 15: منحنى نمو أحياء وحيدة الخلية (بكتريا) في مزارع سائلة مغلقة

طور التظبع

ويسمى خطا بطور التلكؤ وذلك لان التلكؤ في هذه الحالة يكون على مستوى المؤشر العددي للنمو ، اما على مستوى الفعاليات والتخليق فتكون على اوجها ، اذ تحدث عمليات الكبح Repression للعديد من المسارات الأيضية المستعملة في البيئة السابقة قبل ان توضع الخلايا في البيئة الجديدة ، اضافة الى ان الخلايا تقوم بحث مسارات ايضية جديدة تلائم البيئة الجديدة وقد يستغرق الطور مددا مختلفة قد تصل اضعاف وقت الجيل للخلايا وذلك اعتمادا على عدد من الظروف :

1- الحالة الفسلجية للخلايا وتأريخها قبل بدء عملية التنمية ، فالخلايا المأخوذة من مزارع قديمة تكون اعداد الخلايا الحية فيها أقل من المزارع الفتية ، لذلك فإن الخلايا الحية تحتاج الى وقت لتصل الاعداد التي يمكن التحسس بها وتسجيلها ، كما ان الخلايا المأخوذة من بيئات قاسية والتي حدث ضرر في موادها الوراثية بشكل خاص وموادها الخلوية بشكل عام تحتاج الى وقت قبل البدء ، إذ إن نقاط السيطرة Check points في الخلية تمنع عملية الانقسام قبل ان يحدث اصلاح تام لموادها الوراثية . كما إن الخلايا المكونة للأبواغ وكثرتها في اللقاح يؤدي الى اطالة الطور ، إذ تحدث فيها عمليات الإنبات قبل ان تشرع بالنمو .

2- درجة الحرارة ويفترض عند دراسة منحنى النمو ان يكون المزروع محضونا بالدرجة الحرارية المثلى لنمو الخلايا ، ولكن مع هذا فإن درجات الحرارة المثلى إن كانت واطئة نوعا ما فإنها تؤدي الى انخفاض الفعاليات الأنزيمية لذلك يلاحظ طول الطور بانخفاض الحرارة

، ويقصر عندما تكون درجة الحرارة عالية وقد تصل اقصر مدة عند استعمال درجات حرارة 37-40 م° أو أكثر ، ويزداد معدل النمو ولكن على محور نمو الخلية وزيادة حجمها ووزنها أما معدل النمو بالنسبة لمؤشر العدد فيقرب من الصفر

3- طبيعة الخلايا — تؤثر أيضا في طول طور التأقلم ، فالخلايا بطيئة النمو بحالتها الطبيعية يكون طور تأقلمها طويلا في حين أن الاحياء سريعة النمو وذات معدلات نمو عالية يقصر فيها الطور .

4- الضغط التنافذي يجب ان يكون عند الحدود التي تتحملها الخلايا وبذلك تتوجه الخلايا الى البناء والنمو بدلا من التوجه لعلاج هذا الإجهاد وهذا ينطبق على كافة المواد التي قد تؤدي الى رفع الضغط التنافذي .

5- الرقم الهيدروجيني يجب ان يكون ملائما لطبيعة الخلايا ، فإذا كان منحرفا عن الحد الأمثل فإن الخلايا لا تستطيع النمو وتتحلل ، وإن كان بعضها يسلك مسلكا آخر وهو معالجة الوضع وتوجيه الفعاليات الحيوية البنائية لحماية الخلايا أولا ثم النمو في مثل هذه البيئات وهذا بدوره يؤدي الى اطالة وقت التأقلم .

6- هناك ظروف أخرى يمكن أن تؤدي الى طول الطور وبعض الأحيان عدم النمو مثل انتقال المواد المؤذية مع اللقاح . وكذلك طبيعة الوسط الغذائي الجديد المستعمل ، فالأوساط الغنية تؤدي عادة الى سرعة النمو ولكن غنى هذه الأوساط يجب أن يكون بالوحدات الأساسية مثل الحوامض الأمينية والكاربوهيدرات سهلة الإستهلاك من قبل الخلايا ، أما إذا كانت المواد المستعملة مكثورة ومعقدة فإن الخلايا تحتاج الى وقت لإنتاج الإنزيمات الخارجية لغرض تفكيك المواد المعقدة الى مواد بسيطة يمكن قبطها من قبل الخلية . ولذلك يلاحظ أن نمو الخلايا في هذا الطور يكون نموا غير متوازن بالنسبة لمؤشرات النمو المذكورة اعلاه .

وعندما تجمع الخلايا كل المقومات اللازمة للإنقسام تستأنف نموها على مستوى العدد وتبدأ بالإنقسام بسرعة وذلك يحدث ضمن طور التعجيل B الذي يحصل فيه زيادة معدل النمو ، وعادة تبدأ الخلايا بالنمو في هذا الطور بشكل متزامن . ويلاحظ ان النمو في هذا الطور يكون غير متوازنا حيث يطغى المؤشر العددي على المؤشرات الأخرى خاصة الحجم وتكون الخلايا صغيرة الحجم ويمثل اصغر حجم وصله وهي في حالة الفعالية .

الطور اللوغاريتمي

ويمثل هذا الطور نموا متوازنا على مستوى مؤشرات النمو الثلاثة الحجم والوزن والعدد إذ تكون الخلايا بالحجم الطبيعي ولذلك يفضل قياس ابعادها وأشكلها وتفاعلها مع صبغة كرام في هذا الطور كما يمكن قياس وقت الجيل لها .

قياس وقت الجيل :

ويمثل وقت الجيل الذي يرمز له gt أو td الوقت اللازم لتضاعف المجموع البكتيري أو الكتلة الحيوية ، ويعتمد على معدل النمو الذي يكون معادلة من الدرجة الأولى عند عدم محدودية المواد الغذائية وكون المؤشرات البيئية الأخرى عند حدودها المثلى . وتقاس الأعداد باللوغاريتمات العشرية لسهولة التعامل او بالغرامات عند قياس الكتلة الحيوية .

ويمكن حساب وقت الجيل وكذلك ثابت معدل النمو k من معرفة أعداد الخلايا في بداية طور اللوغارثمي ونهايته (أي تؤخذ نقطتين يكون الخط مستقيماً بينهما قدر الإمكان) ، مع اعتماد قيمة 0.301 قيمة $\log 2$ وذلك لأن الخلايا الأحادية عادة تنشط لتعطي خليتين التي تنشط بدورها لتعطي 4 خلايا وهكذا ، وتستعمل الحسابات اللوغارتمية للحصول على معادلة من الدرجة الأولى أي خط مستقيم أو استعمال Semilog paper .

$$N_t = N_0 + 2^n$$

N_t هي النقطة النهائية من طور اللوغارثمي التي اختيرت لإجراء الحسابات
 N_0 النقطة الأولية من طور اللوغارثمي التي اختيرت لإجراء الحسابات .

n عدد الأجيال المتكونة في المدة الواقعة بين N_0 و N_t

$$\log N_t = \log N_0 + n \log 2$$

$$\log N_t = \log N_0 + 0.301 n$$

$$n = (\log N_t - \log N_0) / 0.301$$

ومنها يمكن حساب وقت الجيل :

$$g_t (td) = t / n$$

حيث تمثل t الوقت المستغرق لعدد الخلايا N_0 ليصل إلى العدد N_t .

ويمكن حساب (k) معدل النمو الذي يمثل عدد مرات التضاعف للساعة الواحدة :

$$K = \log_{10} (N_t / N_0) / 0.301 t$$

ويلى طور اللوغارثمي طور التباطؤ وذلك يحدث نتيجة لزيادة عدد الخلايا في الوحدة الحجمية والتي تكون لها سعة معينة تعتمد على حجم الخلايا بشكل اساس وعند زيادة الأعداد تبدأ ظاهرة تحسس الزحام Quorum sensing وفي البكتريا عموماً يكون العدد 10^7 / ملتر كافياً لحدوث الظاهرة في الخلايا التي تؤدي إلى تغير شبه كامل في العمليات الأيضية ، إضافة إلى أن المواد الغذائية تستنفد من البيئة المغلقة المحيطة بالخلايا ، وكذلك زيادة الفضلات التي قد تكون سامة للخلايا خاصة عند استعمال أوساط غنية :

● فإذا كانت الأوساط غنية بالكاربوهيدرات أدى ذلك الى زيادة الحوامض العضوية حول الخلايا وانخفاض الأرقام الهيدروجينية .

● أما إذا كانت الأوساط الغذائية غنية بالمواد البروتينية فإن ذلك يؤدي الى رفع الأرقام الهيدروجينية .

وفي كلا الحالتين تنحرف الأرقام الهيدروجينية عن الحد الأمثل لنمو الخلايا .
كما إن الأوكسجين يقل ذوبانه في مثل هذه الأوساط الغنية بالفضلات والخلايا المزدهمة مما يؤدي الى تأثر الأحياء الهوائية . اضافة الى تغير جهود الاكسدة والاختزال وتغير ظروف اخرى كلها تؤدي الى تباطؤ نمو الخلايا ويصبح النمو غير متوازنا مرة اخرى ، ويصبح معدل النمو واطنا .
وتعاني الخلايا في هذه المرحلة من تغيرات كبيرة في انظمتها وتراكيبها ، والاحياء المكونة للابواغ تبدأ بعملية التبرغ Sporulation (والتي سيأتي ذكرها لاحقا) .

ويمكن معالجة بعض العوامل في هذه المرحلة مثل التغلب على نقص الأغذية يتم باستعمال المزارع المفتوحة او المستمرة باستعمال جهاز الناظم الكيماوي Chemostat ، وادخال الهواء من خلال وسائل معينة ، وسحب جزء من وسط النمو للتخلص من الفضلات . ولكن عندما يصل عدد الخلايا الى 10^9 / ملتر يصبح تزويد الاوكسجين غير مجديا ولا يلئم الخلايا لذا يتضاءل النمو بشكل كبير .

طـور الاستقرار Stationary phase

في هذا الطور يصل معدل النمو الى الصفر (عند اعتماد المؤشر العددي) وتستمر بعض الخلايا بالنمو على حساب موت وتفكك الخلايا الاخرى ، لذا يكون النمو غير متوازنا ولكن يحافظ بالمجمل على حالة الاستقرار العددي .

طور الموت او الانحدار Decline phase

بعد ان تبقى المزارع في طور الاستقرار لمدة والتي تعتمد على الكثير من الظروف ويبدأ عدد الخلايا الحية بالتناقص ، ويزداد عدد الخلايا الميتة ، ولكن يبقى عددا من الخلايا التي تدعى بالخلايا المثابرة Presistors حيا مقاوما لعدة شهور او سنين للحفاظ على النوع .

كما ان انحدار الطور يعتمد على طرق قياس النمو فالطرق المعتمدة على العد العيوشي تظهر انحدارا شديدا في الميل في الاحياء غير المكونة للابواغ . اما اعتماد طريقة العد الكلي وقياس الكتلة الحيوية وكذلك قياس الكثافة الضوئية Optical density فهي تظهر ميلا ضحلا للطور . وكذلك يعتمد على درجة الحرارة ، فالقياسات التي تتم للاحياء المحبة للحرارة مثلا تظهر ميلا شديدا ، اضافة الى تأثير ظروف اخرى .

واعتمادا على الاطوار التي ذكرت يلاحظ ان الطور التطبع والطور اللوغارتمي ترتبط بعمليات النمو والبناء لذلك تسمى الاطوار المتربطة بالنمو ويطلق عليها ايضا Trophophase، وفي حالة استعمال الاحياء في هذه الاطوار تكون المواد الناتجة هي مواد ايض اولية Primary metabolites ومنها انتاج الحوامض الامينية والحوامض العضوية والفيتامينات والكتلة الحيوية . اما في طور الاستقرار وبعد تغير الفعاليات الايضية فيطلق على الجزء الثاني من منحنى النمو وخاصة طور الاستقرار بشكل اساسي و طور الموت بالاطوار غير المرتبطة بالنمو وتسمى Idiophase والمواد التي تنتج منها هي مواد الايض الثانوي Secondary metabolites او Idiolites ومنها انتاج المضادات الحيوية والسموم والصبغات وغيرها من المواد .

ويرتبط انتاج مواد الايض الثانوي عادة بانخفاض معدلات النمو ، ولذلك يمكن تغير معدلات النمو ليس بالتتابع الزمني ودخول الاحياء طور الاستقرار بشكل طبيعي وانما يمكن ان تحور المزارع بعد بناء كتلة حيوية مناسبة وذلك اما بخفض الحرارة او اضافة مواد اساس بطيئة الاستهلاك من قبل الاحياء او اي وسيلة يمكن ان تبطيء من معدلات النمو ، وعندها تصبح الخلايا بمثابة مصانع للمواد المراد انتاجها .

والنمو في الاوساط السائلة يختلف تماما عن النمو على الاوساط الصلبة اذ انه على الأوساط الأخيرة لا يمكن ملاحظة الاطوار المذكورة وانما يمكن ان تظهر الاحياء انماطا من النمو وظواهر خاصة بالنمو على الاوساط الصلبة مثل تكوين الأغشية الحيوية او غير من الظواهر التي سيتم تناولها فيما بعد .

نمو وتكاثر الاحياء حقيقية النواة :

تكون الخلايا حقيقة النواة متشابهة بشكل أساس ولذلك يمكن دراستها في الاحياء المجهرية حقيقية النواة حتى يمكن توفير معلومات عن أساسيات السيطرة عليها في خلايا الاحياء الراقية وتأتي السرطانات في مقدمتها ، وهي اكثر تعقيدا من الخلايا بدائية النواة وهذا ينعكس على مختلف الجوانب المتعلقة بها ، فنمو الخلية يمر بدورة معقدة تسمى دورة الخلية Cell cycle والتي يمكن ان تستمر ساعات .

وتكون ضمن احداث منظمة مسيطرة عليها وتمر اثناء النمو بطورين اساسية وهي الطور البيني Interphase و طور الانقسام الخيطي Mitosis ، والطور البيني يلي انقسام السايكوبلازم Cytokinesis لتكوين خليتين بنوية جديدة ، ويشكل الانقسام الخيطي وانقسام السايكوبلازم حوالي 5 % من مدة دورة الخلية ، اما الباقي 95 % فتقضيها الخلايا في الطور البيني الذي يمثل المدة الواقعة بين انقسامين خيطية او نووية متتالية . وتمر الخلايا ضمن مراحل محددة يكون النمو والفعاليات الحيوية مستمرة ما عدا تضاعف DNA الذي يحدث في طور معين . واجهزة التنظيم اثناء الدورة

اضافة الى السيطرة الصارمة على احداث الدورة تربط مع الإشارات والمحفزات الآتية من خارج الخلايا او من داخلها والتي تسيطر على تكاثر الخلايا .

و أثناء الطور البيني تكون الكروموسومات رفيعة وغير مكثفة ومنتشرة في النواة لذلك تظهر النواة متجانسة من الناحية المظهرية . اما على المستوى الجزيئي و الوظيفي فان الطور يمثل المرحلة التي تنمو فيها الخلية وتضاعف مادتها الوراثية ويتضاعف حجمها ايضا وبشكل مرتب وبأحداث متوالية لغرض تهيئة الخلية للانقسام .

اما عملية تخليق DNA وتوقيته فانه يؤدي الى تقسيم دورة الخلية الى مراحل متميزة كما موضحة في الشكل الاتي (شكل 16) .

. والمراحل .

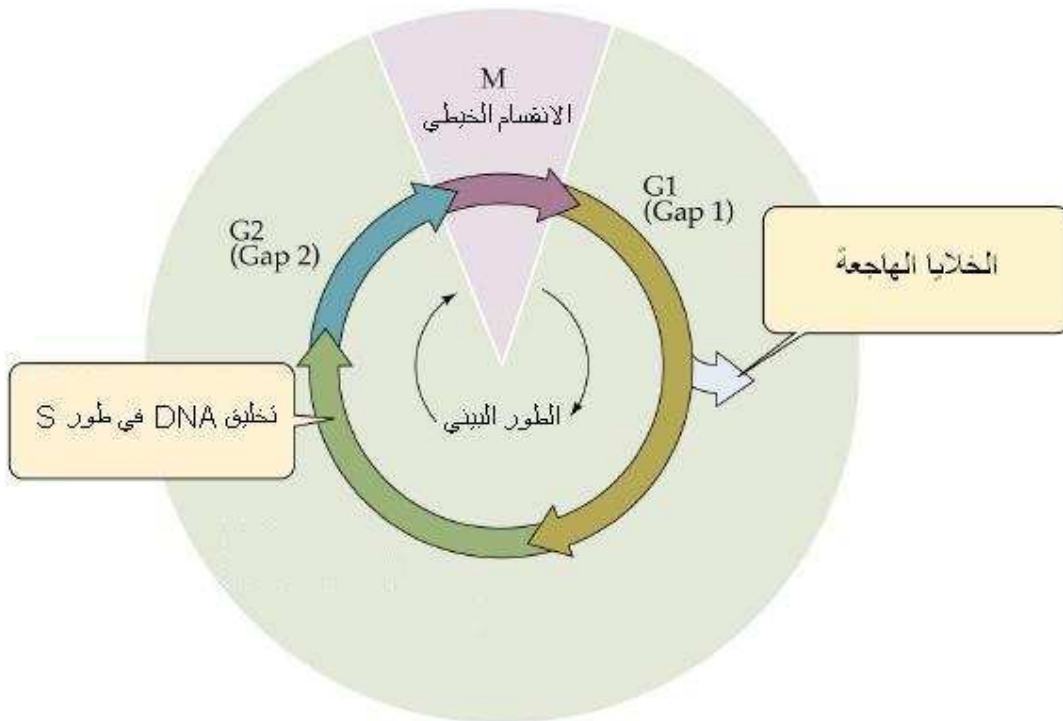
• هي M الذي يمتد على مدى مراحل ثانوية هي :

. الطور التمهيدي Prophase .

. طور التقابل او الاستوائي Metaphase .

. الطور الانفصالي Anaphase .

. الطور النهائي Telophase .



شكل 16 : مراحل دورة الخلايا حقيقية النواة

اما مراحل دورة الخلية فهي :

- G1 (Gap 1) المرحلة التي تلي طور الانقسام وتمثل المرحلة بين عملية الانقسام الخيطي وبداية تخليق DNA في الخلايا الجديدة وأثناء هذه المرحلة تكون الخلايا نشيطة من الناحية الايضية وتنمو باستمرار ولكن لا تتضاعف مادتها النووية .
 - S (Synthesis) وهو طور أو مرحلة تخليق DNA وتضاعفه وهو الطور الذي يلي G1 .
 - G2 (Gap2) المرحلة التي تأتي بعد اكتمال تضاعف DNA وفيه تستمر الخلايا بالنمو ومضاعفة مكوناتها للتهيئة لعملية الانقسام الخيطي .
- وتختلف المراحل أو الأطوار في المدة التي تستمر فيها اعتمادا على نوعية الخلايا والظروف المحيطة . وفي الخلايا المعتدلة النمو وبوجود ظروف مثلى يمكن أن تستغرق G1 اغلب الوقت إذ تشغل حوالي 45-50 % من دورة الخلية ، أما عمليات تخليق DNA فقد تشغل حوالي ثلث مدة الدورة 33 % ، G2 ، والتي تعقب عمليات التخليق فتشغل حوالي 17 % ويشغل طور الانقسام M اقل الأوقات حوالي 4 % .

وتختلف مدة دورة الخلية في الأنواع والأجناس المختلفة فدورة حياة الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* تصل الى حوالي 90 دقيقة في حين ان مزارع خلايا الإنسان قد تطول الى 24 ساعة ، وتحصل الاختلافات ضمن النوع الواحد فالخلايا الجنينية في الإنسان والتي تكون سريعة النمو فتصل مدة دورتها الى حوالي 30 دقيقة ولا يحصل في هذه الدورة نمو وانما تتلاحق المراحل فيها بسرعة .

والخلايا في مرحلة G1 يمكن ان تدخل مرحلة الهجوع Go والتي تبقى فيها نشطة من الناحية الايضية ولكن لا تنقسم الا اذا استلمت إشارات او محفزات في البيئة المحيطة . ويمكن تمييز الخلايا في المراحل المختلفة بطرق مختلفة ومنها قياس DNA ، فالخلايا في المرحلة G1 تكون مزدوجة الكروموسومات لذلك يكون DNA ممثلاً لـ $2n$ (تمثل العدد الفرداني لكروموسومات الخلية) ، اما اثناء التخليق S فان الخلايا يكون محتواها من DNA بين $2n$ - $4n$ ، والخلايا في مرحلة G2 حاوية على $4n$ وكذلك اثناء طور الانقسام ، ثم تقل كمية الى $2n$ بعد انقسام السايكوبلازم .

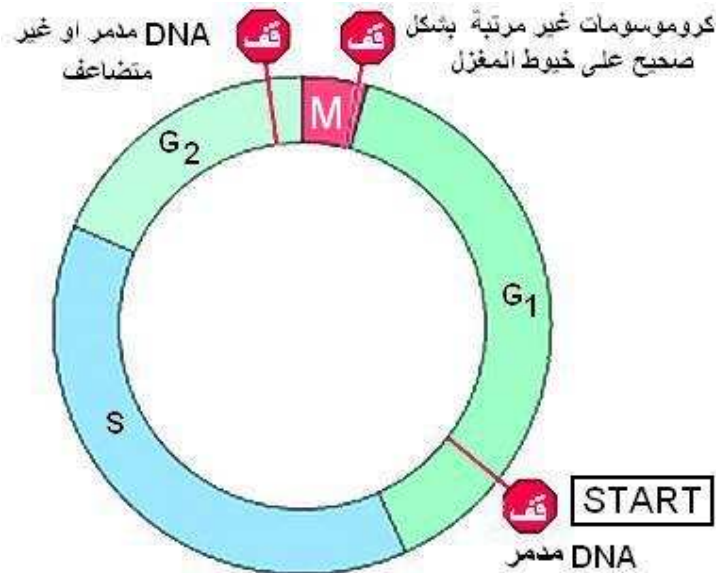
تنظيم دورة الخلية

أن استمرار الخلايا بدورتها ينظم بواسطة إشارات خارجية تأتي من البيئة المحيطة أو بواسطة إشارات داخلية تأتي من داخل الخلية ، والإشارات يمكن تنسيقها في المراحل المختلفة بواسطة نقاط السيطرة Check points التي تسمح للخلايا بالمرور من مرحلة إلى أخرى وأي خلل يحصل في تنظيم الدورة أو نقاط السيطرة يؤثر على باقي أحداث الدورة ويوقفها وبذلك تكون السيطرة على محورين التوقيت وترتيب الأحداث ، واهم نقاط السيطرة هي الموجودة في نهاية G1 والتي اكتشفت

في خميرة/الخبر *S. cerevisiae* وتسمى START والتي يقابلها في الخلايا الحيوانية نقطة التقييد Restriction point . وهي موضحة في الشكل (شكل 17) .

وعند عبور الخلايا النقطة تبدأ في تخليق DNA أي الدخول إلى مرحلة S وعند اكتمالها تكون الخلايا مهيأة للانقسام ، ومن الإشارات الخارجية التي تستجيب لها نقطة السيطرة (START) توفر المواد الغذائية بالنسبة للخمائر وغيرها من الكائنات المجهرية حقيقية النواة ، أما الإشارات الداخلية مثل حجم الخلية ، كما أن الخلايا تتوقف عند هذه النقطة عند وجود إشارات التزاوج وهي ببيتيدات الفرمونات التي تعطي للخلايا فردا نية الكروموسومات الإشارة للدخول إلى مرحلة التزاوج والاندماج مع خلية أخرى . وعليه تكون النقطة بمثابة قرار بالنسبة للخلايا أما التوقف أو الاستمرار فيما اذ شعرت الخلايا بوجود المواد الغذائية الكافية لاستمرار دورة حياتها أو الدخول إلى مرحلة الهجوع أي Go .

وتساعد نقطة START أيضا في تنسيق عمليات تضاعف DNA وانقسام الخلية وهذا التنسيق يكون مهما بالنسبة للخلايا المتبرعمة وهي العملية التي تؤدي إلى إنتاج خلايا مختلفة الحجم وليس كما يحدث في باقي أنواع الخلايا ، ولأجل إن تحافظ الخلايا على حجم معين فان الخلايا الصغيرة أو البرعم يجب أن ينمو إلى الحجم المحدد المشابه للخلية الأم قبل الانقسام ولذلك فان الخلايا الصغيرة تقضي وقت أطول في مرحلة G1 مقارنة بالخلية الأم . وتختلف الخلايا ومنها الخمائر في عمليات السيطرة فمثلا الخميرة



شكل 17 : نقاط السيطرة في خلايا الخمائر المتبرعمة

Schizosaccharomyces pombe تكون السيطرة فيها عند المرحلة G2 ، إذ تقوم الخلايا بتحديد مدى توفر المواد الغذائية وحجم الخلية ثم تدخل إلى مرحلة الانقسام ، وهذه توجد في أحياء أخرى .

وتكون نقاط السيطرة مهمة في الانتقال من مرحلة إلى أخرى وبدونها تكون الخلايا معرضة للهلاك ، فمثلا من الضروري ضمان أن الخلايا قد أكملت تضاعف DNA حتى تستمر في عملية الانقسام وإلا لا تستطيع الخلايا الناتجة استلام نسخ كاملة من المواد الوراثية ، فبواسطتها يمكن السيطرة على أكمال مرحلة بالكامل قبل الدخول في مرحلة جديدة .

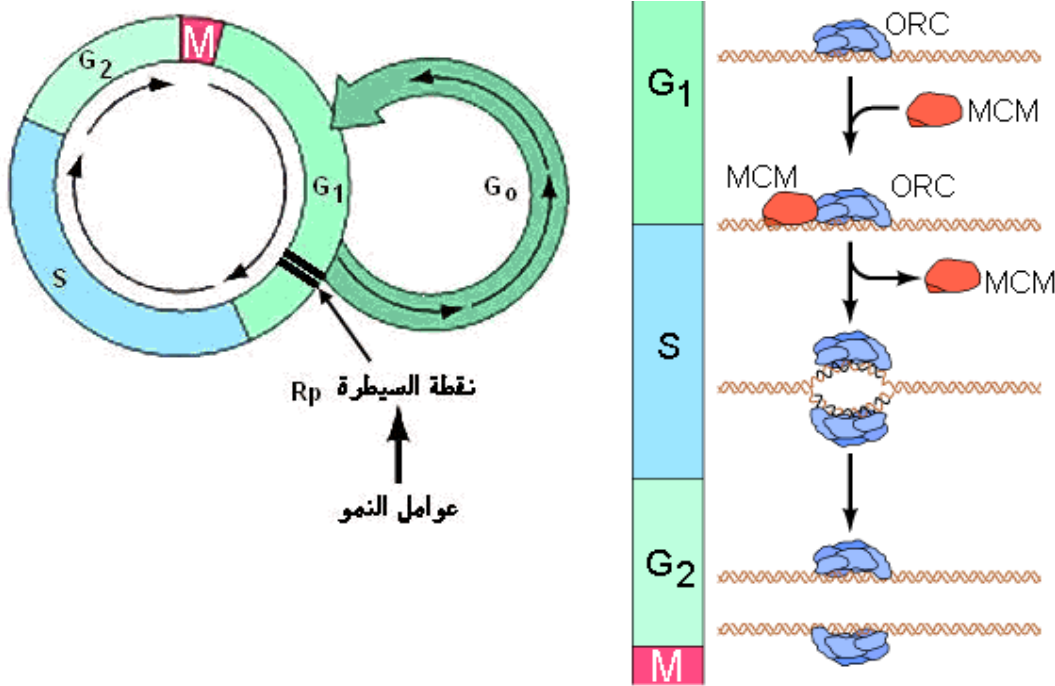
ومن نقاط السيطرة الأخرى هي الموجودة عند G2 وهي التي تمنع بدا الانقسام قبل انتهاء تضاعف DNA وهذه النقطة تتحسس وجود DNA غير المتضاعف الذي يعطي إشارة لوقف دورة الخلية إلى حين أكمال تضاعف DNA ثم بعد ذلك يزال التثبيط لتدخل الخلايا إلى طور M ويتوزع DNA المتضاعف على الخلايا الجديدة . كما أن الدورة يمكن أن تتوقف عند هذه النقطة عند حصول ضرر للـ DNA بواسطة الإشعاع أو أي من العوامل الأخرى . والحقيقة أن DNA المتضرر يمكن أن يوقف دورة الخلية أيضا عند G1 لحين إجراء الإصلاحات ، أما التوقف هنا فهو لإجراء الإصلاحات أيضا بعملية Homologous recombination الذي يحتاج إلى وجود نسختين من الكروموسوم ولا يشبه الإصلاحات التي تجري في G1 .

وفي خلايا اللبائن فان توقف الخلايا عند نقطة السيطرة في G1 يتم بواسطة البروتين P53 الذي يؤدي إلى حث الاستجابات عند وجود DNA متضرر ، وقد وجد أن اغلب أنواع السرطانات تكون الخلايا حاوية على P53 مطفر ، كما أن فقدان البروتين لوظيفته يؤدي إلى استمرار الخلايا من G1 إلى طور التخليق ويتضاعف DNA المدمر ويمرر إلى الخلايا الجديدة بدون إصلاح ، وتوارث مثل هذا DNA المتضرر يؤدي إلى زيادة حدوث الطفرات وعدم ثباتية جينوم الخلايا والتي تساهم في تطور السرطانات .

ونقطة السيطرة الأخرى التي تحافظ على سلامة الجينوم موجودة في مرحلة الانقسام ، وهذه تسجل اصطفاك الكروموسومات على خيوط المغزل لضمان توزيعها بشكل متساوي على الخلايا البنوية . وعند عدم انتظام الكروموسومات بشكل صحيح تتوقف عملية الانقسام عند طور التقابل Metaphase قبل انعزال الكروموسومات المتضاعفة الجديدة ، وتبقى الكروموسومات مصطفة على خيوط المغزل إلى أن يكتمل اصطفاك الجميع لغرض توزيعها .

كل هذه الأحداث تعتمد على مدى الضرر الحاصل للـ DNA او الخلل في دورة الخلية فالاستجابة يمكن أن تحصل على مستويين :

- 1- استجابة سريعة والتي تستغرق حوالي دقائق وتعتمد أساسا على عمليات الفسفرة وتفكيك البروتينات المنظمة .
 - 2- الاستجابة البطيئة والتي تشمل حث تخليق البروتينات المثبطة لدورة الخلية والذي يمكن أن يطول إلى ساعات .
- ولضمان أن تضاعف DNA يحدث مرة واحدة لكل دورة خلية فهناك مجموعة من البروتينات وهي MCM proteins التي ترتبط إلى مناطق أصل تضاعف الكروموسومات وتكون معقدات مع Origin replication complex (ORC) كما موضح في الشكل (18) .
- وتعمل بروتينات MCM بمثابة عوامل تسمح لبدء عملية تضاعف DNA ويحقق ذلك بواسطة ارتباط البروتينات إلى أصول تضاعف DNA في G1 لتسمح للـ DNA بالتضاعف في المرحلة التي تليها وعند بدء عملية التضاعف تنفك بروتينات MCM من نقطة الأصل وبذلك فإن التضاعف لا يمكن أن يبدأ إلى أن تمر الخلايا في طور الانقسام وتدخل مرحلة G1 مرة ثانية في دورة جديدة .
- وعلى المستوى الجزيئي فإن كل الأحداث المذكورة أعلاه تتم بواسطة الكاينيزات والبروتينات المدورة Cyclins التي تنظم بشكل دقيق في معقدات من Cyclin – dependent kinases (Cyclin - Cdk) . والخطوط العريضة لعمليات السيطرة تكون :
- 1- يحصل تنشيط للكاينيزات Cdkس بارتباطها بالمدورات أو وحدات ثانوية منها .
 - 2- كل معقد من المدور والكاينيز ينشط الذي بعده .
 - 3- تدمير المدورات يضمن سير الأحداث باتجاه واحد .
 - 4- تثبيط المعقدات من الكاينيزات والمدورات يكون بالفسفرة أو بالارتباط إلى بروتينات مثبطة ، والذي يؤدي إلى تقليل عملية تنشيط الكاينيزات وبالتالي إبطاء عمليات مرور الخلية بالأحداث الخاصة بالدورة الخلوية .
- وقد سميت البروتينات المنشطة بالمدورات نظرا لارتفاع تراكيزها بالتخليق وانخفاضها بعمليات التحلل البروتيني ولذلك تكون فعاليات الكاينيزات مرتبطة بوجود واختفاء المدورات الدوري
- وعندما تحفز الخلايا الهاجعة لتدخل دورة الخلية فأول المدورات الذي يعبر عن جيناته ويخلق هو D الذي يتجمع و يرتبط بكل من الكاينيز Cdk 4 و Cdk 6 التي تدخل النواة وتقوم بفسفرة بروتين Retinoblastoma (Rb) والبروتينات التابعة له P107 و P130 . وفسفرة Rb بدورها تنشيط مجموعة بروتينات عائلة E2F وهي عوامل انتساخ تساعد في انتساخ البروتينات اللازمة للـ G1 و S .



شكل 18 : دورة حياة خلايا اللبائن

والإشارات التي تؤدي إلى تنشيط الدور D تؤدي أيضا إلى حث التعبير عن مدور آخر هو E إضافة إلى اثنين من المثبطات المعتمدة على المعقدات الناتجة من الكاينيزات والمدورات وهي $P21^{cip1}$ ، $P27^{kip1}$ هذه ترتبط بالمعقد D-Cdk 4 دون أن تؤثر على فعاليته وإنما تساعد في إدخاله إلى النواة في حين أن ارتباط هذه المثبطات إلى معقد E-Cdk 2 يؤدي إلى تثبيطه ، و E-Cdk 2 هو الذي يساعد D-Cdk 6 في فسفرة Rb في النواة المذكور أعلاه ، وهذه الفسفرة تكون ضرورية للعمليات التي تحدث في طور التخليق S سواء في مرحلة البدء أو العمليات المتعلقة بالتضاعف واستمراره .

وفي G₁ يتم التعبير عن مدورات أخرى هي A ، B التي ستساعد في تضاعف DNA وتضمن حدوثه مرة واحدة في الخلية . و A يزيد من كفاءة التضاعف بحثه للتعبير عن الجينات المسؤولة عن تخليق الهستونات وبروتينات أخرى لازمة لعملية التضاعف .

وكما ذكر أعلاه بعد تضاعف DNA تتكون خيوط المغزل لسحب الكروموسومات المتضاعفة والتي تنتهي في الطور النهائي Telophase والتي تمتاز بانخفاض كثافتها وظهورها بشكل مادة كروماتينية والتي يليها الانقسام السايكوبلازمي ، وتكون هذه العمليات تحت سيطرة كاينيزات أخرى وهي Cdk 1 (Cdc 2) والمدورات A و B ويظهر الأخير في طور التخليق ويبقى مستواه مرتفعا في مرحلة G₂ و M .

وبعد انتهاء عملية توزيع المادة النووية يتم توزيع العضيات الخلوية بالتساوي مثل الماييتوكوندريا او غيرها وفي حالة وجود نسخة واحدة من العضيات فأنها تقسم بالتساوي ثم يكمل نموها في الخلايا الجديدة كما في حالة أجسام كولجي ، وتختفي بعد ذلك المدورات A و B . واطافة الى ما ذكر من اشتراك المدورات A و B في ضمان عدم بدء دورات تضاعف جديدة للـ DNA فان هناك بروتينات أخرى تشارك فيها ومنها (APC) Anaphase promoting complexes .

ويلاحظ أن المراحل النهائية تتم السيطرة عليها بعمليات الفسفرة بواسطة الإنزيمات Cdk-activating kinase (Cak) إضافة إلى اشتراك بعض البروتينات المثبطة Cdk inhibitors (CkIs) . اما تدمير المدورات فيتم عن طريق المدمر Ubiquitin pathway وبواسطته يتم التخلص من البروتينات التي أدت دورها ، اذ تضاف ثمالة المدمر اليها وتقاد لتحلل بواسطة 26S proteasome وهو احد التراكيب الخلوية المتخصصة يقوم بتحليل البروتينات غير المطوية والبروتينات المظموغة بالمدمر Ubiquitin-tag .

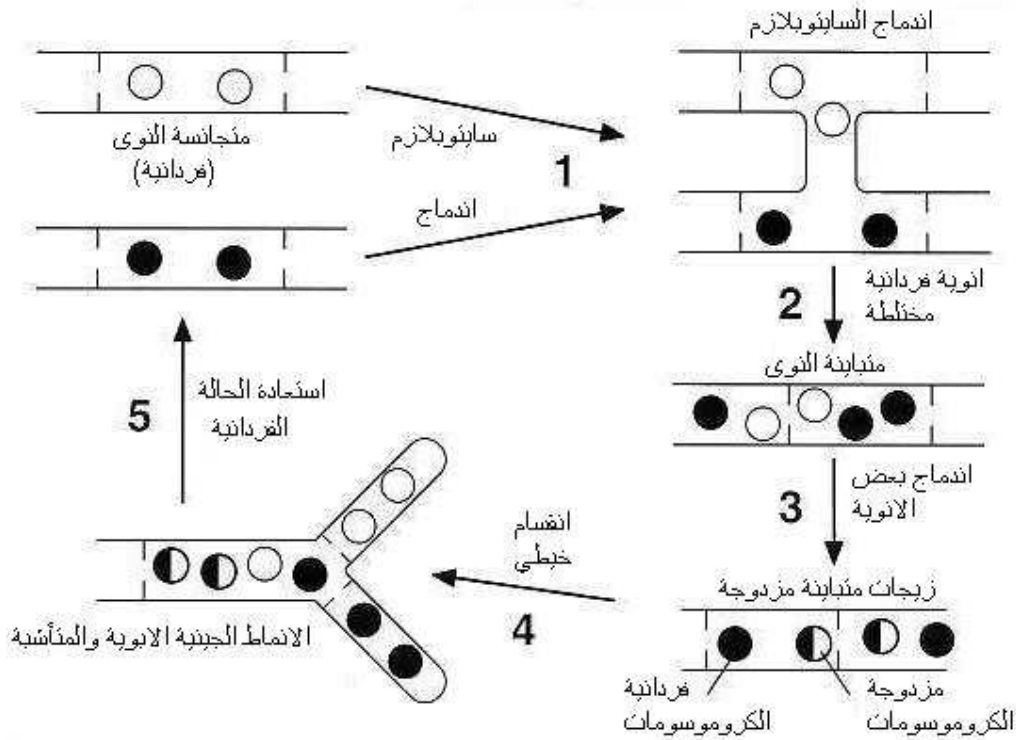
وتتم الدورة بكاملها بتعاون يحصل بين الفعاليات التي تحصل في الساييتوبلازم مع تلك التي تحصل في النواة وذلك بتخصص بعض المكونات في مواقعها مثلاً في النواة او الساييتوبلازم . إضافة إلى وجود بعض البروتينات التي تقوم بحركة مكوكية بين النواة والساييتوبلازم وهي السمة المميزة للـ CdKs اذ تتحرك وفق الحاجة إليها .

النمو في الفطريات

الاعفان والخمائر من الخلايا حقيقية النواة ذات الانتشار الواسع رغم أنها أحياء غير متحركة ، وتتكاثر جنسيا ولا جنسيا بتكوين الكونيديا خفيفة الوزن التي تساعد في الانتشار ، كما انها تنمو على اوساط بسيطة وتحتاج الى الكربون والنتروجين المختزلة لانها لا تستطيع ان تثبت الكربون او النتروجين المؤكسدة .

تتكاثر الخمائر بتكوين البزاعم والتي تمثل Blastospores ، والبعض الآخر تتكاثر بالانشطار ، كما ان البعض منها وعند وجود ظروف غير ملائمة تكون مايسليوم كاذب او حقيقي .

اما الاعفان فتكون دورة حياتها بعض الاحيان معقدة وتظهر فيها بعض الحالات الشاذة مثل حدوث Parasexual cycle خاصة في الاحياء ذات الاهمية الكبيرة في مجالات الانتاج الحيوي وتستغل هذه الدورات في تحسين السلالات . وهذه الدورة تعد طريقة تكاثر غير طبيعية ويحصل فيها Mitotic recombination وكما موضحة في الشكل (19)



شكل 19 : دورة نمو الفطريات الشاذة Parasexual cycle

ويتم الالتحام بين هايفات غير متميزة متجاورة لتكون هايفة بنواتين وفي اغلب الأحيان تبقى النواتان ثابتة في الهايفة مكونة تركيب متباين النوى Heterokaryon ، وفي حالات خاصة تندمج النواتان لتكون نواة ثنائية الكروموسومات ، او يمكن ان تحدث عمليات عبور بين الكروموسومات اثناء الانقسام الخيطي وعندها تعطي خلايا فردانية الكروموسومات الا انها تحوي على كروموسومات متأشبة Recombinant chromosomes .

وراثة الأحياء المجهرية وعلاقتها بالنواحي الفسلجية

الصفحة	الموضوع
61	تركيب الحوامض النووية
63	تنظيم جينوم الأحياء
64	التعبير الجيني العام
64	الانتساخ
64	الترجمة
66	جينوم الأحياء بدائية النواة
68	مشاركة التواليات القصيرة في التطور
70	البلازميدات
73	القافرات
76	جينوم الخلايا حقيقية النواة
78	جينومات الفيروسات
78	تنظيم التعبير الجيني
80	المنظمات ونقل الإشارات
80	تحسس الخلايا للإشارات الخارجية
81	تنظيم الانتساخ
84	تنظيم الترجمة
85	اوبرون اللاكتوز
86	التأشب
90	تحول الجين
90	الطفرات
94	أنظمة إصلاح DNA
99	طرق انتقال الصفات الوراثية
107	الهندسة الوراثية
108	الإنزيمات
116	تفاعل الكوثرية التسلسلي PCR
117	النواقل
137	التطهير الموجه
138	استعمالات الهندسة الوراثية
140	المعوقات

وراثة الأحياء المجهرية

الحقيقة ان عيش ونمو الأحياء في الطبيعة والتي يمكن استغلالها تعيش بنمط بعيد عما يحدث في المختبر ونظرا لأهمية النواحي الوراثية وحضورها في التداخلات التي تحدث في البيئة اضافة الى تأثيرها على العلاقات التطورية بين الأحياء ، لذلك سيتم المرور على النواحي الوراثية بشكل مبسط بقدر تعلقه بموضوع الكتاب .

تعد المواد الوراثية الأساس في إعطاء الكائن الحي هويته ، وتتكون المواد الوراثية في الإحياء من DNA في الخلايا حقيقية النواة وبدائية النواة ومعظم العاثيات وذلك لان بعض العاثيات تتكون موادها الوراثية او جينوماتها من RNA .

تركيب الحوامض النووية : الحوامض النووية جزئيات حيوية كبيرة مكونة من وحدات مكررة للنيوكليوتيدات وكل نيوكليوتيد يحوي على مجموعة فوسفات واحدة . وفي DNA يكون السكر المساهم في تركيب النيوكليوتيد هو السكر الخماسي D-2-deoxy ribose في حين يكون السكر الخماسي الموجود في RNA (D-ribose) وهذا يضيفي الثباتية على جزيئه DNA أكثر من RNA إذ أن نقصان $-OH$ على الذرة الثانية واستبدالها $-H$ في DNA يجعله أكثر ثباتا لان مجموعة الهيدروكسيل أكثر فعالية من الهيدروجين ، وهذا يكون ضروريا في DNA كمادة وراثية التي يجب أن تكون ثابتة لغرض توارثها في الأبناء والأحفاد . وإضافة إلى الفوسفات والسكر التي تكون عامة بالنسبة للحوامض النووية توجد القواعد النتروجينية منها البريميدينيات Pyrimidines المتمثلة بالساييتوزين Cytosine (C) والثايمين Thymine والقواعد البيورينية Purines وهي الكوانين Guanine (G) والأدينين Adenine (A) وفي حالة RNA تستبدل القاعدة النتروجينية T باليوراسيل Uracil (U) . وقد توجد قواعد محورة في بعض الجزيئات RNA في بعض العاثيات و tRNA . النيوكليوتيدات ترتبط فيما بينها بأواصر استرية Phosphodiester bonds إذ ترتبط النهاية $3'-OH$ مع نيوكليوتيد آخر بالنهاية $5'-PO_4^{3-}$ وهذا الارتباط غير متناظر هو الذي يعطي القطبية لتوالي النيوكليوتيدات . وترتبط القواعد النتروجينية عند الذرة الاولى من حلقاتها ($1'-Carbon$) بجزيئه سكر وتبرز من السلسلة النيوكليوتيدية .

يتكون DNA من شريطين ملتفين بشكل حلزون مزدوج Duplex وتكون متضادة القطبية Antiparallel ويتم تثبيت الشريطين بأواصر هيدروجينية بين القواعد النتروجينية التي تكون إلى داخل الأشرطة المتقابلة وترتبط الأدينين مع الثايمين باصرتين $A = T$ وترتبط الكوانين بالساييتوزين بثلاث أواصر $C \equiv G$ ويكون احد الاشرطة مكملا للآخر . وبسبب التكامل فان اشرطة DNA المزدوجة تحتوي على كميات متكافئة من البيورينات (A+G) والبريميدينيات (C+T) أي ان كميات

$T = A$ وكميات $C = G$ ، ولكن النسبة المولية Mole fraction للـ $(C+G)$ في DNA يختلف بالنسبة للأنواع و الأجناس الحية . وتكون الحلزونات ملتفة على بعضها بشكل كبير لحمايتها .

وفي حالات قليلة يوجد DNA بشكل ثلاثي الأشرطة Triplex DNA ويرتبط الشريط الثالث مع الأشرطة الثنائية بواسطة زوج محدد من القواعد النتروجينية ويستعمل لإغراض مختلفة مثل التحري عن متواليات محددة أو إعاقه بعض وظائف الجينات ويتم تصنيع او تحضير بعض الجزيئات ثلاثية الأشرطة لإغراض معينة .

المعلومات الوراثية في الحوامض النووية تحدد بترتيب القواعد النتروجينية او النيوكليوتيدات في السلسلة او التوالي ، وتوالي القواعد النتروجينية في أحد الأشرطة يحدد توالي القواعد النتروجينية في الشريط المقابل على اساس ان الأدينين يتصل بالثايمين والكوانين يتصل بالسايٲوزين . وانتظام القواعد النتروجينية في مجموعة لتكون الجين يعطي النمط الجيني Genotype للكائن الحي وعند تفاعل هذا النمط مع البيئة يعطي النمط المظهري Phenotype .

الشفرات الوراثية

تنتظم القواعد النتروجينية لتكون الشفرات الوراثية التي تحدد بدورها الحوامض الامينية التي تترجم فيما بعد في السلاسل الببتيديية والبروتينات . ونظرا لوجود 4 قواعد ننتروجينية فان الشفرة الوراثية المكونة من قاعدة واحدة لا تكفي للشفير لحوالي 20 حامض أميني ، وكذلك وجود قاعدتين للشفرة الوراثية أيضا لا يكفي وذلك لان $4^2 = 16$ وهي اقل من عدد الحوامض الامينية ، ولكن عندما تكون الشفرة الوراثية مكونة من ثلاث قواعد ننتروجينية (4^3) يعني وجود 64 شفرة وراثية ، وهذا ممكننا وذلك لوجود ثلاث شفرات هي شفرات ختم او إنهاء TAA ، TAG ، TGA والتي يقابلها UAA ، UAG ، UGA على RNA . أما الشفرات الباقية فتكون الشفرات الثلاثية للحوامض الامينية التي يشفر لبعضها بأكثر من شفرة واحدة ولذلك تسمى هذه الشفرات بالمشتتة Degenerate codons . وباستثناء الحامض الاميني الميثايونين والتربتوفان فيشفر لكل منها بشفرة واحدة وهي موضحة بالجدول الآتي (جدول 3) .

وتكون الشفرات غير متداخلة . وبالرغم من أن الشفرات المذكورة في الجدول هي عامة بالنسبة للاحياء الا انه توجد بعض الاختلافات فمثلا الشفرة TGA التي هي شفرة ختم تشفر للتربتوفان في *Mycoplasma* وفي DNA المايٲوكوندريا ، وكذلك توجد بعض الاختلافات بين الشفرات في مايٲوكوندريا الخمائر والدروسوفلا واللبائن . وتترتب الشفرات لإعطاء الجينات التي لها وظائف محددة مثل الجينات التركيبية او المنظمة او تكون جزءا من متواليات قد تعمل في عمليات التنظيم . ويمكن ان يعد تشابه توالي القواعد النتروجينية في DNA احد مؤشرات تقارب الأحياء أو تشابهها .

تقوم المواد الوراثية بوظيفتين مهمة وهي التضاعف لغرض توارثها في الأحياء الجديدة والتعبير عن الجينات تحت ظروف بيئية معينة لإعطاء الكائن النمط المظهري المميز له .

جدول 3: الشفرات الوراثية

القاعدة الثالثة	القاعدة الثانية	القاعدة الأولى	U	C	A	G
U	Phe	Ser	Tyr	Cys		
C	Phe	Ser	Tyr	Cys		
A	Leu	Ser	شفرات ختم	شفرات ختم		
G	Leu	Ser	شفرات ختم	Trp		
U	Leu	Pro	His	Arg		
C	Leu	Pro	His	Arg		
A	Leu	Pro	His	Arg		
G	Leu	Pro	His	Arg		
U	Ile	Thr	Asn	Ser		
C	Ile	Thr	Asn	Ser		
A	Ile	Thr	Lys	Arg		
G	Met	Thr	Lys	Arg		
U	Val	Ala	Asp	Gly		
C	Val	Ala	Asp	Gly		
A	Val	Ala	Glu	Gly		
C	Val	Ala	Glu	Gly		

المختصرات
Ala, alanine; Arg, arginine; Asn, asparagine; Asp, aspartic acid; Cys, cysteine; Gln, glutamine; Glu, glutamic acid; Gly, glycine; His, histidine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; Lys, lysine; Met, methionine; Phe, phenylalanine; Pro, proline; Ser, serine; Thr, threonine; Try, tyrosine; Trp, tryptophan; Val, valine.

تنظيم جينوم الاحياء

قد يكون الجينوم مكونا من جزئية واحدة كما في معظم البكتريا والذي يكون على شكل حلقة مغلقة او يكون بشكل تركيب مفتوح . وكل جزئية من DNA تحوي على نقطة لبداية التضاعف Origin تسمى نقطة الأصل او التضاعف وبذا يكون العديد من البلازميدات والعائيات هي متضاعفات Replicons .

تضاعف DNA : في هذه العملية يعمل كل شريط من الأشرطة المزدوجة كقالب لتخليق الشريط المكمل له وعليه فان الأشرطة الناتجة تكون حاوية على شريط قديم وشريط جديد أي ان العملية تكون شبه محافظة Semiconservative . ويبدأ التضاعف من نقطة الاصل ويستمر باتجاه واحد او اتجاهين الى ان يكتمل . في الخلايا حقيقية النواة يتم فصل الجزيئات الناتجة بواسطة الياف المغزل في طور الانفصال اما في الخلايا بدائية النواة والتي لا تملك خيوط المغزل فيقوم الغشاء الخلوي والذي تتصل به نقطة بدأ التضاعف بفصل الكروموسومات الحلقية . وفي كلا النوعين من الخلايا وكذلك العائيات تحتاج العملية الى متطلبات كثيرة من الانزيمات وعوامل بروتينية لأجل جعل التضاعف

على مستوى عال من الدقة وتضمن ان كل كائن سيستلم نسخة سليمة من المادة الوراثية (كما سبق ذكره) .

التعبير الجيني العام Gene Expression

وهي الوظيفة الثانية التي تؤديها المواد الوراثية بعد تفاعلها مع العوامل البيئية وبذا يكون النمط المظهري معتمدا على النمط الجيني بشكل أساسي ثم ظروف التنمية بالدرجة الثانية . ولكن هناك بعض الجينات تقوم بالوظيفة الاولى فقط لانها لا تشفر للبروتينات كما في الجينات المسؤولة عن تخليق انواع من tRNA و rRNA .

وتكون عملية التعبير في الخلايا بدائية النواة او حقيقية النواة متشابهة في الخطوط العريضة وتختلف كثيرا في التفاصيل وتشمل عملية التعبير على عمليتين أساسية هي :

1- Transcription الانتساخ وهو تخليق mRNA من استعمال احد اشربة DNA الذي يسمى الشريط الحساس قالبا لرصف النيوكليوتيدات أي تكون عملية تخليق mRNA عملية موجهة .

2 - الترجمة Translation للشفرات الوراثية الموجودة على mRNA على الرايبوزومات Ribosomes في السايوبلازم الى سلسلة من الحوامض الامينية بعملية الترجمة .

ولذلك فان هذه الخطوط العريضة في نوعي الخلايا تمثل انسياب المعلومات الوراثية من DNA ثم ترجمتها على الرايبوزومات ، ومن اوجه التشابه هو تشابه معظم الشفرات ، إضافة الى تشابه بعض الانزيمات العاملة في الخطوتين .

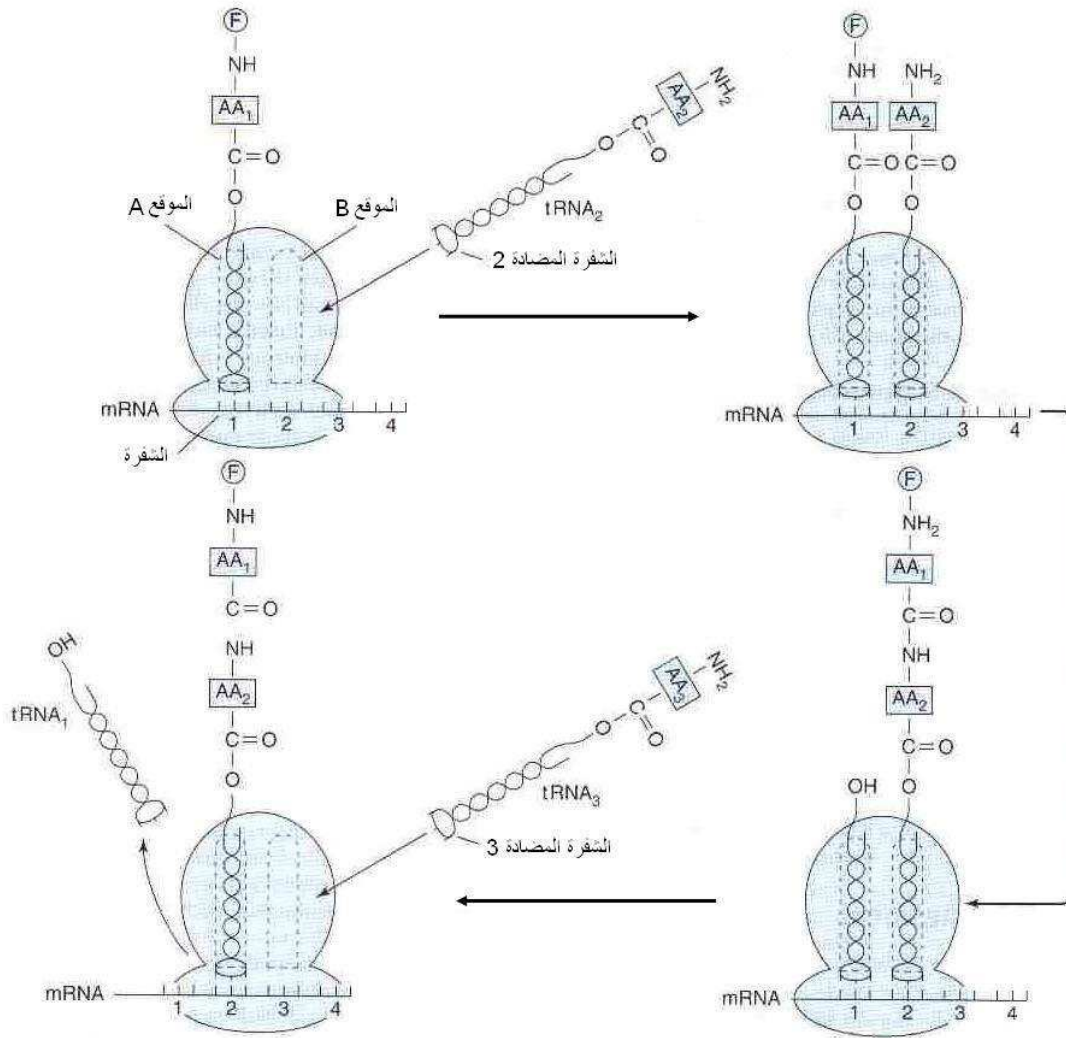
الانتساخ : وتعني تخليق mRNA بتوجيه من DNA ، وتكون أشربة mRNA الناتجة معاكسة في القطبية للـ DNA ومتكاملة من حيث القواعد النتروجينية . وتبدأ عمليات بناء mRNA بمساعدة أنزيم كثررة RNA المعتمد على DNA (DNA dependent RNA polymerase) RNAP الذي يقوم بانتساخ قطع معينة من DNA . ويرتبط الانزيم بموقع خاص يسمى الممهد Promoter ويبدأ الانتساخ عند المنطقة المجاورة . والممهدات القوية هي التي تستطيع التداخل بقوة مع الأنزيم RNAP مؤدية الى عمليات انتساخ بمعدلات عالية ، اما الممهدات الضعيفة فهي يمكن ان تبدأ الانتساخ ولكن بمعدلات واطنة وفي الحالتين يتم تخليق RNA من النهاية 5' باتجاه النهاية 3' وعادة وبعد عملية البدء يكون الانتساخ بمعدل ثابت الى ان يصل الى شفرة ختم او منطقة الانتهاء Terminators ، وعندها ينفك RNAP ليكون تخليق mRNA قد اكتمل . وتكون عملية الانتساخ مجالا مفتوحا للعديد من آليات التنظيم التي سيأتي ذكرها لاحقا .

الترجمة : وفيها يحول توالي الشفرات الوراثية على mRNA الى حوامض امينية في البيبتيدات او البروتينات او التركيبية الأولى لها وتتم على الرايبوزومات .

وتختلف الرايبوزومات في الخلايا حقيقية النواة عن ما يقابلها في بدائية النواة في العديد من الجوانب ففي الخلايا حقيقية النواة تكون اكبر ولها معدل ترسيب 80S اما في بدائية النواة فيكون معدل الترسيب 70S . وتكون الوحدات الثانوية في رايبوزومات حقيقية النواة الكبيرة بمعدل ترسيب 60S والصغيرة 40S وتكون غنية جدا بالبروتينات ، اما في بدائية النواة فيكون معدل ترسيب الوحدة الكبيرة 50S والصغيرة 30S ، وتختلف في حساسيتها للمضادات الحيوية . وتكون رايبوزومات العضيات مثل المايكوندريا في الخلايا حقيقية النواة مشابهة لرايبوزومات الخلايا بدائية النواة . وتتكون الرايبوزومات من rRNA الذي لجزيئاته معدلات ترسيب مختلفة ، اضافة الى العديد من البروتينات .

الجزيئات الناتجة من الانتساخ والمعدة للترجمة تكون مكونة من شفرات فعالة في mRNA الذي يحوي على موقع الارتباط بالرايبوزوم Ribosome binding site (rbs) ومن جهة ثانية يتم تنشيط الحوامض الامينية انزيما وتنقل بواسطة tRNA وفق الشفرة المطلوبة بمساعدة الانزيم Amino - acyl tRNA synthetase . وجزيئات tRNA تحوي على شفرات مكملة Anticodon للشفرات الموجودة على mRNA ، ويجلب الحامض الاميني بعد تكوين معقد البدء والتي تشمل عددا من العوامل البروتينية ، مجموعة للبدء واخرى للاستطالة او غيرها من الاغراض اضافة الى اشتراك العديد من الانزيمات . وتبدأ قراءة الرايبوزومات للشفرات على mRNA بالاتجاه من 5' الى 3' . ويجلب اول حامض اميني الى الموقع A (Accepting site) على الرايبوزوم ، ويكون الحامض الاميني الاول الذي يترجم هو الميثايونين AUG (formyl- methionine) في بداية النواة ، ثم يأتي الحامض الثاني الى الموقع P (Peptidyl site) على الرايبوزوم . ويتم ربط الحامضين الامينيين بأصرة بيبتيديية بتأثير الانزيم Peptidyl transferase والذي هو 23S rRNA ويسمى ايضا Ribozyme ، ويتحرك الرايبوزوم بعد ذلك مسافة شفرة واحدة ليتقل الحامض الاميني الثاني الى الموقع A ويبقى الموقع P شاغرا مستعدا لاستقبال حامض اميني ثالث الى ان تترجم كل الشفرات الى ما يقابلها من الحوامض الامينية . ويكون تجمع السلسلة الببتيدية من النهاية الامينية للحامض الى النهاية الكاربوكسيلية وبذا يكون تسلسل الحوامض الامينية في البروتين مكمل لتوالي القواعد النتروجينية في mRNA وبالتالي مع تواليها في DNA وعملية الترجمة موضحة في الشكل (20) . ويلاحظ في الخلايا بدائية النواة ان الجينات ذات العلاقة الوظيفية تتجمع مع بعضها مكنزة الاوبرون (Operon) والحالة تكون نادرة في الخلايا حقيقية النواة .

وقبل الخوض في عمليات التنظيم لهذه العمليات المهمة لا بد من مرور بسيط على التراكيب الوراثية للحياء .



شكل 20 : عملية الترجمة لتخليق البروتينات

جينوم الخلايا بدائية النواة

يتكون جينوم الخلايا بدائية النواة من كروموسوم حلقي واحد يحوي على حوالي 580 – 4600 كيلو قاعدة واوزانها تتراوح من 10×0.4 - 10×8.6 دالتون . وفي بعض الاحياء يكون فيها الكروموسوم صغير جدا كما في الاحياء المتطفلة مثل *Mycoplasma* او الاحياء البحرية ، ولكنها قد تكون كبيرة في بعض الاحياء التي تظهر نوعا من التمايز والتخصص مثل *Myxococcus* لذا فان كمية DNA قد تحدد الكمية العظمى للمعلومات التي يمكن ان تشفر لها . وتحتوي بعض البكتريا على كروموسوم غير حلقي كما في البكتريا الموجبة لصبغة كرام *Borrelia* وبعض انواع *Streptomyces* ، وبعض الاجناس تحوي على كروموسوم حلقي واخر غير حلقي كما في البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* .

ويشكل كروموسوم *Escherichia coli* (النموذج الدراسي) حوالي 2-3 % من وزن الخلية الجاف ويصل حجمه الى 4500 كيلو قاعة وبوزن 3×10^9 دالتون وهو كافي للتشفير لعدة آلاف من السلاسل الببتيدية بوزن يتراوح 40 كيلو دالتون . ويصل طول جينوم *E. coli* الى 1.35 ملمتر وبهذا فهو اطول من الخلية بعدة مئات من المرات لذلك يلتف بشكل كبير ويعبأ في Nucleoid . ويلاحظ في *E. coli* ان الوقت اللازم لتضاعف كروموسومها يصل الى 40 دقيقة والذي يعادل ضعف الوقت اللازم لتضاعفها ، وذلك لان تضاعف DNA يبدأ دورات تضاعف عدة مرات اثناء انقسام الخلية وبذا تظهر الخلايا سريعة الانقسام وكانها حاوية على 4-8 كروموسومات عند الانقسام ، وقد يبدأ الكروموسوم بالتضاعف في اكثر من نقطة في الخلايا سريعة النمو وبما ان معظم الخلايا بدائية النواة هي احادية الكروموسومات أي فردانية Haploid لذلك توجد عادة نسخة واحدة من كل جين . والبلازميدات لها مناطق بدء تضاعف لذلك تتضاعف بشكل مستقل . والجينات المسؤولة عن الوظائف الاساسية محمولة على الكروموسوم وان كانت هناك بعض الاستثناءات مثل بكتريا حامض اللاكتيك التي تحمل اهم صفاتها الوظيفية مثل جينات تخمير اللاكتوز وتحليل البروتينات على البلازميدات . اما الصفات الثانوية في معظم الانواع فتكون بلازميدية .

وبعض الاحياء المرضية التي تغزو الاحياء الراقية تحوي على جينات تحدد الامراضية التي تتجمع في مجاميع او عناقيد يطلق عليها جزر الامراضية Pathogenicity islands ومن الجينات التي تحويها هذه الجزر جينات خاصة بالغزو وإنتاج السموم الخارجية وكذلك اللاصقات .

وتحوي جينومات بدائية النواة على عدد كبير من التواليات القصيرة SSR (Short sequence repeats) التي توجد خارج المناطق المشفرة للجينات عادة وتتكون هذه التواليات القصيرة من مكررات الادنين او الكوانين او السايتوزين او الثايمين ، وقد تكون المكررات متجانسة أي تتكون من القاعدة النتروجينية نفسها او تكون متباينة ، كما انها قد تكون قصيرة او طويلة . ويعتقد ان التغيرات الحاصل VNTR (Variable number of tandem repeats) ناتجا من أخطاء في مسارات تصحيح DNA اي حصول SSM (Slipped – strand mispairing) والذي يحدث بشكل مرافق لمسارات التصحيح غير الكفاءة .

والمكررات في بدائية النواة تكون قصيرة في الاغلب 1 – 6 نيوكلووتيدات ولكن في بعض الاحيان تكون طويلة لتصل الى 15 نيوكلووتيد او 200 زوج من القواعد . والانواع المنتشرة في الجينوم اكثر من المتجاورة ، وتشترك في تنظيم فعالية البروتينات ويمكن ان تشارك في تحديد توالي الحوامض الامينية خاصة في البروتينات التي تستعرض الاغشية . وتوجد التواليات في الاحياء سواء ذات الاهمية الطبية او البيئية .

ومن المكررات التي درست (ERIC) Enterobacterial repetitive intergenic (consensus) REP (Repetitive extragenic palindrome) وكذلك التواليات التي تكثر في المنطقة الحاوية على جينات tRNA . وبالرغم من ان وظائف هذه التواليات غير معروفة تماما للعديد منها الا ان شيوعها يشير الى اهميتها في حياة الميكروبات ، فهي تساعد على التطبع البيئي للاحياء نظرا لحصول التغيرات فيها . وقد وجد ان التواليات القصيرة تنظم التعبير الجيني في حين ان الطويلة قد تمتلك وظائف اخرى مثل تأثيرها على البروتينات المرتبطة بالغشاء الخلوي . كما ان تحليل مكوناتها في العزلات السريرية يمكن ان يساعد في التكهّن بمدى خطورة الإصابة على المريض .

مشاركة التواليات القصيرة في التطور : اضافة الى ما ذكر اعلاه حول قابلية التواليات القصيرة في إعطاء بعض المرونة للحياء للتطبع والتكيف مع البيئة التي تعيش فيها ، فهي يمكن ان تساهم في عمليات تطور الاحياء .

والحقيقة ان عمليات تطور الاحياء والانواع البكتيرية منها لا تمثل عملية مستمرة (كما سيأتي ذكره) وانما تتخللها احداث تؤدي الى عدم الاستمرارية وهذه الاحداث تقود الى تسلسل غير متدرج من حيث التطبع لبيئة ما . فمثلا وجود الجزر الامراضية دلالة على عدم الثباتية الوراثية وعدم الاستمرارية ، فهذه الجزر تكون موجودة في بعض الأنواع وقد تكون مفقودة في انواع اخرى ، اضافة الى الانتقال الافقي للجينات والتحول الطبيعي ووجود القافزات Transposons . كما ان عدم الاستمرارية يمكن ان تأتي من التغيرات الحاصل في التعبير عن الجينات والتي تحور ، إضافة الى إمكانية التعبير عن الجينات الصامتة نتيجة لعمليات إعادة الترتيب الوراثي .

كل هذه الاحداث تصب بمجملها في تطور الميكروبات السريع والتي تعتمد بشكل جزئي على التأثيرات البيئية وذلك لان مناطق التواليات القصيرة تكون ذات تغاير عالي وهذا التغاير يؤدي الى تغيير في جزيئات DNA نفسها وبالتالي الى تغيير Genetic repertoire (الذخيرة الجينية) للكائن ألمجهري ومن ثم تطور النوع . والانواع البكتيرية تستفاد من هذه التغيرات للحصول على فوائد انتقائية في حياتها مثل المقاومة للمضادات الحيوية في الانواع الممرضة .

علاقة التواليات القصيرة بالامراضية :

تعد عملية استعمار البكتريا لأنسجة المضيف الخطوة الاولى التي تقود الى حدوث الإصابة والمرض ، وتبدأ العملية بتداخلات فيزيوكيميائية ، اما في المراحل المتأخرة فان ثباتية التداخل بين البكتريا وخلايا المضيف تحدد بمدى التداخل بين اللاصقات الخاصة والمستلمات . وقد طورت البكتريا العديد من الوسائل لضمان الالتصاق بقوة الى الخلايا الطلائية

فتعد الشعيرات الجنسية Pili من التراكيب المهمة لاداء هذه الوظيفة . وبعد الاستعمار الاول للبكتريا على خلايا المضيف تبدأ الغزو والذي يتم بسلسلة من الأحداث تنتهي بحدوث المرض ومنها

حدوث الالتهابات وتدمير الأنسجة وحدوث الاستجابة المناعية وكل هذه تؤثر في النهاية على المضيف والبكتريا ، ووجود التواليات القصيرة وتغايراتها تؤثر على الضراوة ، واحتواء الجينات المسؤولة عن الضراوة على التواليات القصيرة يؤدي الى ظهور معدل عالي من الطفرات مما يساعد البكتريا على التفاعل بسرعة مع الظروف البيئية المؤدية لها . والتغاير يبدو انه غير معتمد على *recA* ولكن بآلية اخرى قد تكون مشابهة للتبادل الكروماتيدي الشقيقي في الخلايا حقيقية النواة والأكثر احتمالا هي من SSM .

دراسة التواليات القصيرة في بعض البكتريا المهمة

درست هذه التواليات في بعض البكتريا المرضية وذلك لعلاقتها بالمقاومة للأدوية كما يمكن استعمالها في الدراسات الوبائية ومن هذه البكتريا :

Mycobacterium tuberculosis : وهذه البكتريا معروفة بان جينومها يحوي على عدد من التواليات المكررة المنتشرة واكثر هذه المكررات هي تواليات الإقحام (IS) Insertion sequence وتكو غنية ب CG وكل مكرر يحوي على 36 زوج قاعدة ، اضافة الى وجود تواليات متغايرة وهي PGRS (Polymorphic GC - rich repetitive sequence) اضافة الى وجود التواليات القصيرة SSR البسيطة مثل احتواء *Mb. leprae* على 21 من متواليات CTA .

Mycoplasmas : توجد منطقتين رئيسية للتواليات القصيرة قرب الجينات المسؤولة عن اللاصقات وهذا يشير الى ان التواليات القصيرة توجد قرب او في الجينات المسؤولة عن الضراوة في هذه الأحياء .

وتوجد فيها بعض التواليات التي تؤدي الى تغير المستضدات ، كما ان جينات هذه المستضدات يمكن ان تفتح او تغلق بواسطة تغير هذه التواليات في ألجين الممهد للمستضدات . اضافة الى وجود تواليات في جينات اخرى . فالأنواع *My. genitalium* تحوي على 11 من التواليات المكونة من CTA .

Staphylococcus aureus : تحوي على تواليات في الجينات المسؤولة عن تخليق البروتينات المرتبطة بالأغشية ، وتكون متجاورة يطلق عليها MSCRAMMs (Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules)

هذه لها القابلية للارتباط بعدد من الجزيئات الكبيرة على سطوح خلايا المضيف مثل الكولاجين ،

الايلاستين و Thrombospondin و Vitronectin و Laminin و Fibronectin وغيرها . فمثلا بروتين انزيم التخثر الذي هو من الصفات المظهرية الواضحة للبكتريا *Staph. aureus* المرضية يحوي العديد من التواليات القصيرة .

Streptococci : تحوي على البروتين M وهو احد عوامل الضراوة ويساعد الخلايا في مقاومة الابتلاع من قبل خلايا الجهاز المناعي ، ويشفر له بالجين *emm* الذي وجد انه يحوي عددا من التواليات القصيرة . ولذلك فالبكتريا قادرة على تغيير البروتينات خاصة بروتينات الضراوة بواسطة تغيير مكونات التواليات القصيرة وبذا تكون هذه وسيلة لتجنب الجهاز المناعي .

وفي *St. pneumoniae* توجد منطقة التواليات المعروفة بـ BOX التي توجد قرب بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة ولها تأثير فاعل في السيطرة عليها . اضافة الى اشتراك BOX في ظاهرة التأهل Competence التي تظهر على البكتريا لقيط DNA الخارجي ضمن طريقة التبادل للمعلومات الوراثية المعروفة بالتحول Transformation . وتستعمل تواليات BOX في عمليات التنميط الجزئي لسلاسل هذه البكتريا .

Haemophilus influenzae : ويوجد فيها تواليات قصيرة مكونة من 4 نيوكليوتيدات تشترك في أظهار ضراوة البكتريا ولذلك فان جينات الضراوة يمكن ان تشخص مباشرة من وجود هذه التواليات . وتشمل الجينات المسؤولة عن تكوين LPS واللاصقات وانزيم Glycosyltransferase والجين المسئول عن البروتين الرابط للحديد .

Neisseriae : تحوي على حوالي 26 نوع من التواليات وبنسخ متعددة سميت Ngrep في N. gonorrhoeae و N. meningitidis . وهذه التواليات تؤدي الى تغير الطور اذ تؤثر على LPS في N. gonorrhoeae ليساعدها في الهروب من الجهاز المناعي ويمكنها من الانتقال عبر العديد من الحواجز . كما ان بعض هذه التواليات ترتبط بجينات لبروتينات السطح مثل الشعيرات Pili وبروتينات العتمة Opacity proteins ، ومن هذه التواليات التي حددت هي وجود 9 من مكررات CTA . وتكون السيطرة على التراكيب الخلوية المذكورة بحصول حرف في هذه التواليات أي انها تعمل في مجال التنظيم ويقع بعضها في المنطقة بين 10- و 35 - من مكونات المهد .

Enterococcus faecalis تعاني البكتريا من تغير الطور Phase variation أي تغير مظهر المستعمرات ويحدث ذلك نتيجة للتغيرات الحاصلة في التواليات القصيرة ، وقد تنقل هذه التواليات من البلازميدات .

البلازميدات

تمثل الجزء الاخر من جينوم الخلايا خاصة بدائية النواة وهي عناصر وراثية لا كروموسومية ، وتعد من المتضاعفات لامتلاكها نقطة اصل التضاعف ، وتتضاعف بشكل مستقل عن كروموسوم الخلية . وتكون البلازميدات عادة اصغر من كروموسوم الخلية وتصل حجمها من 5 الى عدة مئات (كيلو قاعدة) ولكن توجد بعض البلازميدات الكبيرة التي يصل حجمها الى 2 ميكا قاعدة . اكثر

البلازميدات تكون حلقية تلتف أشرطتها المزدوجة بشكل كبير ، ولكن توجد بعض البلازميدات غير حلقية .

البلازميدات تحوي على الجينات المسؤولة عن تضاعفها وانتقالها وكذلك اكتسابها للـ DNA الغريب وإعادة ترتيبه ، ويلاحظ ان البلازميدات يمكن ان تحوي جينات متباعدة الأصل (Chimeric) التي يمكن ان تتجمع وتنتشر في المجموع البكتيري كما في انتقال المقاومة للأدوية والمضادات الحيوية .

تصنف البلازميدات اعتمادا على ظاهرة التوافقية Compatibility الى مجاميع ، البلازميدات المتشابهة او ذات العلاقة الكبيرة تظهر بينها ظاهرة عدم التوافق وتسمى مجاميع غير متوافقة Incompatible groups وهي لا تستطيع البقاء في الخلية المضيفة نفسها لمدة طويلة ، اما المجاميع المتوافقة فهي البلازميدات بعيدة العلاقة ويمكن ان تستمر بالبقاء في الخلية المضيفة بشكل ثابت . وتصنف البلازميدات ايضا على أساس تحديد توالي القواعد النتروجينية في مادتها الوراثية .

ونظرا لامتلاكها نقطة أصل تضاعف خاصة بها فإن ذلك يؤثر على عدد نسخها Copy number أي عدد جزيئات البلازميد بالنسبة لكروموسوم الخلية . ويلاحظ ان البلازميدات الكبيرة التي تصل حجمها الى اكثر من 40 كيلو قاعدة والتي تكون عادة اقترانية Conjugative plasmids تكون أعداد قليلة يتراوح بين 1 الى عدة بلازميدات / كروموسوم الخلية وتكون تحت سيطرة صارمة ، كما ان بعض الظروف يمكن ان تزيد من الاعداد فعند احتواء الخلايا على البلازميدات col EI و pMBI يمكن ان تزداد أعدادها عند وجود الكلورومفينكول الذي يوقف عمليات تخليق البروتينات ويمنع تضاعف الكروموسوم البكتيري . اما البلازميدات الأصغر منها مثل بحجم 7.5 كيلو قاعدة وتكون عادة غير اقترانية فتصل اعداد نسخها قيما عالية مثل وجود 10-20 او اكثر بلازميد/ كروموسوم خلوي أي تحت سيطرة غير صارمة او متراخية . هذه الأعداد تعتمد على الخلايا المضيفة لانجاز بعض الوظائف التي تحتاجها البلازميدات مثل تضاعفها وتوزيعها على الخلايا الجديدة بعد الانقسام .

بعض البلازميدات تكون متعددة المضاييف Broad host range وبذا تكون لها القابلية على نقل المعلومات الوراثية الى عدد مختلف من الانواع .

تؤدي البلازميدات عددا من الوظائف التي تساعد الخلايا ، منها المساعدة في تبادل المعلومات الوراثية بواسطة عملية الاقتران وان كانت غير شائعة ، فعلى ضوء هذه الوظيفة تقسم البلازميدات الى :

1- بلازميدات اقترانية وهي التي تملك المعلومات الوراثية المسؤولة عن عمليات انتقالها وتنقل من الخلايا المعطية او الواهبة الى الخلايا المستلمة ومثل هذه تسمى بلازميدات الخصوبة Fertility plasmids (F factor) .

2- بلازميدات غير اقترانية وهي التي لا تستطيع الانتقال من خلية الى اخرى وانما تكون عملية نقلها مرافقة لانتقال البلازميدات الاقترانية . وتستطيع البلازميدات الاقترانية ان تنقل قطع او كل الكروموسوم الخلوي .

وتكون للبلازميدات أهمية من الناحية الطبية على وجه الخصوص اضافة الى أهميتها في الجوانب البيئية او غيرها ، ففي المجال الطبي تكون مسؤولة عن انتشار المقاومة للمضادات الحيوية والتي تكون محمولة بشكل أساسي على R plasmid (R factor) كما ان البعض منها يكون مسؤولا عن انتاج السموم في العديد من البكتيريا ومنها مثلاً انتاج السم المعوي الثابت بالحرارة من قبل *E. coli* او السم التشقيري Exfoliative toxin في بكتريا *Staph. aureus* وسموم الكزاز Tetanus toxin من البكتريا *Cl. tetani* وكذلك تحمل البلازميدات جينات مسؤولة عن تفكيك بعض المواد المعقدة وتحمل المعادن الثقيلة . وتكون البلازميدات الطبيعية غير ثابتة تماماً وانما تتعرض للتطور والتغاير اعتماداً على الظروف البيئية . فهي تحوي العديد من التواليات القصيرة SSR تدعى Iterons ، والتي توجد بعدة نسخ في منطقة اصل تضاعف البلازميد وترتبط خاصة الى بروتين البدء RepA ، لتبدأ تكوين معقد البدء وعندما يحصل تشعب بين هذه التواليات والبروتين تبدأ عملية التضاعف .

كما ان التواليات البلازميدية يمكن ان تزيد من ضراوة الخلايا فمثلاً التواليات الموجودة على البلازميد pAM α 1 المسؤول عن مقاومة المضاد الحيوي التتراسايكلين وعند حضن الخلايا الحاوية عليه مثل *Ent. faecalis* لمدة طويلة بوجود تراكيز اقل من المميتة من التتراسايكلين يؤدي الى زيادة نسخ هذه التواليات ولذلك فالخلايا الحاوية على محددات المقاومة المضخمة تزداد مقاومتها للتتراسايكلين . وتستعمل البكتريا المذكورة التواليات القصيرة الموجودة في البلازميد في عمليات تغيير الطور ، فتوجد على البلازميد المذكور منطقة توالي مكونة من 12 و 13 قاعدة تفصل بينهم 87 قاعدة تساعد في تغيير طور الخلية ، والذي يحصل نتيجة لتغير التواليات استجابة لعوامل خارجية مثل الفرمونات التي تنتج قبل عملية الاقتران .

وعليه فان وجود التواليات القصيرة يؤثر على عمليات انتقال البلازميدات وكذلك تضاعفها في الخلايا وذلك لان هناك بروتينات خاصة ترتبط بال- Iterons او الجينات العاملة ضمن الاستجابة للفرمونات والتي تلعب دوراً مهماً في عمليات التنظيم . فوجود هذه التواليات قرب مناطق تضاعف البلازميدات ربما يكون هو المسؤول عن زيادة المضاييف التي يدخلها البلازميد وكذلك السيطرة على عدد النسخ في الخلايا .

اضافة الى ما ذكر اعلاه فان بعض البلازميدات يمكن ان تكون مسئولة عن وظائف أساسية في الخلايا كما يحصل في بكتريا حامض اللاكتيك فمعظم وظائفها المهمة هي بلازميدية ، والافتراض ان البلازميدات تشفر لوظائف ثانوية او مساعدة لا يكون مطلقا .

وتحوي الخلايا على العديد من البلازميدات الخفية او الصامتة Cryptic plasmids وهي التي ليس لها تأثيرات على النمط المظهري للخلايا وتكون هذه مهمة جدا في مجال الهندسة الوراثية ويمكن تحضير بعض البلازميدات الهجينة منها تحوي على منطقتين لبدء التضاعف . كما ان تحديد النسق البلازميدي Plasmid profile هو الذي يكشف عن وجود مثل هذه البلازميدات لذلك فان تحديده ضروريا لاغراض كثيرة منها تحديد علاقة العزلات السريرية في الدراسات الوبائية .

القافزات Transposons

قطع من DNA يمكن ان تتحرك من موقع من الحامض النووي الى موقع اخر في الجريئة نفسها او الى جزيئة اخرى بعملية تسمى القفز Transposition ، وتحدث بطريقة غير معتمدة على التأشب العام Generalized recombination . وتوجد في مختلف الأحياء سواء بدائية النواة او حقيقية النواة المجهرية او الاحياء الراقية . تتكون القافزات او الجينات القافزة من عدد من القواعد النتروجينية (عدة كيلوات) الى حجم اكبر ، وتحوي المعلومات اللازمة لتحركها من موقع إلى آخر . وبذلك تعد من المسببات لطفرات الإقحام Insertion mutations .

والعناصر القصيرة منها 1500-4000 زوج من القواعد تعرف بعناصر الإقحام او تواليات الإقحام Insertion sequences (IS) وهي التي تولد أغلبية طفرات الإقحام ، واغلب البكتريا تحوي على IS ، وكذلك توجد على البلازميدات وتكون مهمة في تكوين سلالات Hfr . والقافزات لا تحوي على نقاط اصل لتضاعفها وانما تعتمد في تضاعفها على المتضاعف الذي توجد فيه .

تعد القافزات عناصر وراثية مهمة لأنها تسبب الطفرات وتشارك في إعادة ترتيب جينوم الكائن الحي ولذلك فهي تؤدي الى اكتساب جينات جديدة وتساعد في انتشارها في المجموع البكتيري مثلا . اذ ان اقحام القافزات في داخل تسلسل الجين المستهدف يؤدي الى تعطيله ، اضافة الى انها تساهم في عمليات الحذف ، او تضاعف الجينات وكذلك انقلاب قطع DNA ، وتساهم في دمج المتضاعفات .

وتتشترك القافزات في بعض الصفات المشتركة فكل قافز يشفر لوظائف ضرورية لعملية قفزه بإنتاج انزيم القفز Transposase يتداخل مع توالي خاص في نهاية العنصر القافز . والملاحظ ان بعض القافزات يمكن ان تقحم نفسها في أي توالي من DNA ، في حين ان البعض الاخر يقحم نفسه في مواقع محددة وتظهر تخصص صارم باتجاه الهدف . وتتم عملية القفز بطريقتين منها :

1 - قفز دون تضاعف اذ يستأصل القافز من موقع معين من الخلية الواهة يليه عملية اقحام في الموقع المستهدف .

2 - القفز المتضاعف وفيه تتم عملية مضاعفة القافز في الخلايا الواهبة ثم تنقل نسخة منه الى الموقع المستهدف ويساعد في هذا انزيم *Resolvase* الذي يساعد في ارتباط القافز في موقع معين . ويعتقد ان القطعة المستهدفة تنفلق بشكل غير متناظر تليها عملية تخليق لاكمال الاشرطة المفردة ثم حدوث الاقحام .

وتصنف القافزات في البكتريا الى ثلاث مجاميع رئيسية :

اولا : تواليات الاقحام والقافزات المركبة المتعلقة بها :

تواليات الإقحام IS وهي الأبسط في التركيب وتشفر فقط للوظائف التي تحتاجها لعملية القفز ، وتختلف في أحجامها من 1500 - 4000 زوج قاعدة وتحتوي على تواليات مقلوبة على جانبيها *Inverted repeats (IR)* تصل الى حوالي 15-25 نيوكلو تيد ، ومن أمثلتها IS1 الذي حجمه 786 نيوكلو تيد . والتواليات بين IRs تحوي جين واحد لإنزيم القفز وفي حالات نادرة تحوي على جينين ولا تشفر لإنزيم *Resolvase* .

اما القافزات المعقدة ضمن هذه المجموعة فتختلف في الحجم من 2000 الى اكثر من 40000 نيوكلو تيد ، وتحتوي على IS او تواليات متعلقة بها عند النهايات وتكون بشكل تواليات مقلوبة . والقافز يمكن ان يقفز كوحدة كاملة . و DNA بين تواليات الاقحام يشفر لعدد من الوظائف التي قد لا تكون اساسية لعملية القفز . والموجودة في البكتريا المهمة من الناحية الطبية قد تحوي على جينات تنتج مستضدات الالتصاق ، او السموم او عوامل الضراوة الأخرى وكذلك المقاومة لواحد او اكثر من المضادات الحيوية ، ومن اهم أمثلتها Tn5 (5816 زوج قواعد) وتحيطه على الجانبين IS50 ويشفر لمقاومة الكاناميسين ، والقافز الاخر Tn10 الذي يشفر لمقاومة التراسايكلين .

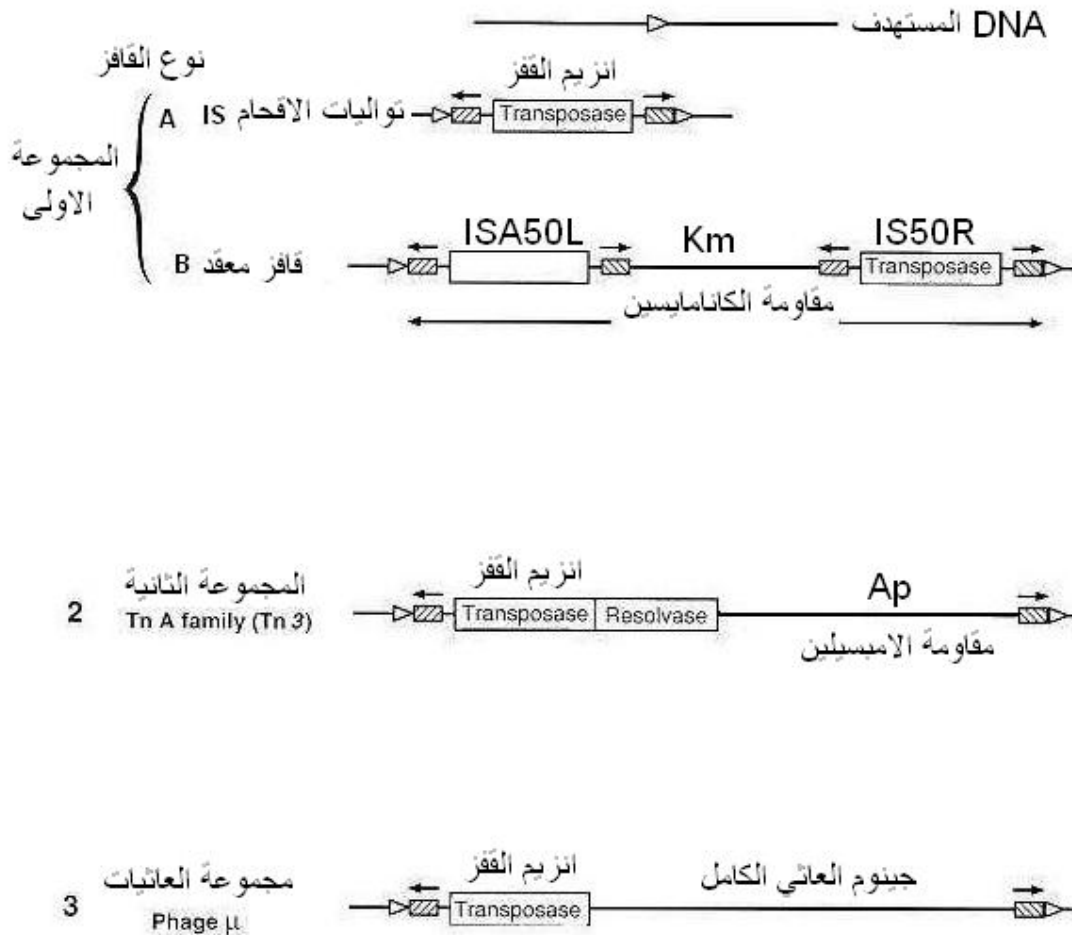
ثانيا : وتضم المجموعة عددا من القافزات المتباينة بشكل كبير وهي متمثلة بـ *TnA family* وهذه تحوي على تواليات مقلوبة (IR) طويلة نوعا ما تصل إلى 35 - 40 نيوكلو تيد ولكنها لا تحوي على تواليات الاقحام . التواليات الوسطية تشفر لإنزيمات القفز و *Resolvase* . ومنها Tn3 (4957 زوج قواعد) ويشفر لمقاومة الامبسيلين و Tn1000 ويوجد على بلازميد الخصوبة (F factor) .

وتسبب بعضها مشاكل صحية مثلا بعضها يشفر لمقاومة الامبسيلين الذي كان يستعمل في معالجة بكتريا السيلان *N. gonorrhoeae* و *H. influenzae* وذلك لان البلازميد الحاوي على القافز قد انتشر من بلازميدات العائلة المعوية الى بلازميدات هذه البكتريا مما ادى الى عدم جدوى استعمال الامبسيلين .

ثالثا : وهذا الصنف يشمل القافزات المتمثلة بالعائى Mu (37 كيلو قاعدة) والعائيات المعتدلة القريبة منه . فجينوم العائى الكامل يعمل كقافز ، ويتحرك DNA العائى اثناء نمو الخلايا بواسطة

القفز المتضاعف Replicative transposition ويمكن ان يندمج العائى على شكل عائى اولي (Prophage) في مواقع متعددة من كروموسوم البكتريا ويؤدي الى نشوء الطفرات ولذلك فان هذا العائى والعائيات الاخرى القريبة منه تسمى العائيات المطفرة Mutator phages .

رابعاً : المجموعة اكتشفت في البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل Tn917 ويكون قافز اقتراني ويختلف عن القافزات الاخرى في المجاميع الاخرى . ويحصل تضاعف لقطة DNA المستهدفة ثم يقم فيها القافز ولذلك فان البكتريا الموجبة الحاوية عليه تعمل كمعط لعملية الاقتران Conjugal donor والخلايا المستلمة يجب ان تكون قريبة الصلة بالخلايا الواهبة . ويتم استئصال القافز من جينوم الخلايا الواهبة وينقل بواسطة الاقتران الى الخلايا المستلمة ويندمج بشكل عشوائي في جينومها . والقافز Tn917 يشفر للمقاومة للنتراسايكلين . وتوجد قافزات اخرى تشفر لمقاومة اكثر من مضاد . ويبدو ان القافز الاقتراني هو السبب في انتشار المقاومة للمضادات في البكتريا الموجبة لصبغة كرام . وعمليات اقحام مجاميع مختلفة من القافزات في الكروموسوم البكتيري موضحة في الشكل (شكل 21)



شكل 21 : اقحام القافزات المختلفة في الكروموسوم البكتيري

ويعتقد ان القافزات هي التي سببت المقاومة للمضادات نظرا لان البلازميدات المعزولة من الإصابات في الوقت الحاضر تحمل عددا من القافزات التي تشفر للمقاومة لعدة مضادات موجودة محدداتها على مواقع مختلفة من القافزات مقارنة بمجموعة البلازميدات المعزولة من عزلات بكتيرية قبل عهد المضادات والتي تخلو من المقاومة للمضادات .

والسلالات او العزلات الحديثة تحوي على القافزات البعض منها مهجنة نتيجة لاندماج اكثر من قافز . فاكترساب القافز لمحددات المقاومة يمكن ان يؤدي في بعض الحالات الى تكوين قافزات معقدة تشفر لمقاومة عدد من المضادات الحيوية ومما يزيد في بروز وزيادة تأثير مثل هذه القافزات وجود الضغط الانتخابي المتمثل باستعمال المضادات في العلاج والأعلاف الحيوانية . كما ان وجود عمليات النقل الوراثي الافقي بين الخلايا مثل التحول والاقتران والتبغيع ساعد في انتشار البلازميدات الحاملة للقافزات مثل R factor . وبعد دخول هذه البلازميدات الى الخلايا يمكن للقافز ان يقفز الى بلازميدات الخلية الداخلية وكذلك يمكن ان يقفز الى كروموسوم الخلية وعليه فان ثبات البلازميدات المتحركة في الخلايا لا يقف حاجز امام انتشار المقاومة المحمولة على القافزات .

وتستعمل القافزات بكثرة في الهندسة الوراثية ولإغراض مختلفة ولكن عماد استعمالها هو حملها لصفة المقاومة للمضادات الحيوية التي تكون بمثابة واسمة وراثية Genetic marker واضحة ويسهل الكشف عنها .

جينوم الخلايا حقيقية النواة

تتميز الخلايا بان موادها الوراثية تكون معزولة عن باقي الساييتوبلازم بغشاء نووي يحيط بالنواة وتكون المواد الوراثية موزعة على مجموعة من الكروموسومات والتي تكون أعدادها مميزة لنوع الكائن الحي ، وتوجد مجموعتين من الكروموسومات غير حلقة أي يكون Diploid ما عدا بعض الاستثناءات الموجودة في بعض الخمائر التي تقضي معظم حياتها وهي فردانية الكروموسومات Haploid ولكنها يمكن ان تحوي على مادة وراثية اضافية وهو البلازميد $2\mu m$ الذي يكون بشكل دائري ويصل حجمه الى 6.3 كيلو قاعدة . اضافة الى ذلك فان معظم الأحياء تحوي على مواد وراثية موجودة في بعض العضيات مثل الماييتوكوندريا والبلاستيدات والتي تكون عادة بشكل حلقي ويشابه كروموسوم الخلايا بدائية النواة ولكنها لا تقوم وحدها بالوظائف المنوطة بها وانما هناك بعض الجينات النووية التي تشفر لوظائف هذه العضيات . لذلك يعتقد ان هذه العضيات ما هي الا خلايا بدائية النواة تطفلت داخل الخلايا حقيقية النواة وبمرور الزمن فقدت الكثير من خواصها وأصبحت معتمدة على الخلية المضيفة لها ، ومن الميزات الأخرى فان كروموسومات او جينات الخلايا حقيقية النواة تحوي على الانترونات Introns والتي تمثل مناطق غير مشفرة ولكنها يمكن ان تساهم في عمليات تنظيم التعبير الجيني لذلك فعلمية الانتساخ لا تنتج mRNA حاويا على رسائل محددة وانما ينتج ما

يسمى heterogeneous nuclear RNA (hn RNA) الذي يوجد في النواة فقط ثم تجري عليه عملية تعديل Splicing ليكون mRNA الذي يصدر الى السايكوبلازم لغرض ترجمته بعد ازالة الانترونات وربط ما تبقى من التواليات Exons ، وتكون نسخ mRNA ثابتة اكثر من mRNA في بدائية النواة التي تكون قصيرة العمر .

وتحتوي كروموسومات حقيقيات النواة على تواليات طرفية Telomeres تنقلص تدريجيا مع تقدم الخلية بالعمر بعد الانقسامات المتكررة ، واختفاء هذه التواليات الطرفية لا يلاحظ في الخلايا السرطانية الحاوية على الإنزيم Telomerase الذي يحفز بناء التواليات الطرفية وربما يمكن ان تتخذ هدفا لعلاج السرطانات اذ ان تثبيطه يجعل الخلايا السرطانية عرضة للموت بعد انقسامات قليلة وهي تعد من التواليات القصيرة .

ونظرا لكون الكروموسومات مضاعفة في هذه الخلايا وهذا يعني وجود نسختين لكل جين لذا يلاحظ انه من الصعوبة التقصي عن الطفرات ، وذلك لان الضرر في احد الجينات يعوض بفعالية الجين المقابل له ، كما ان الجينات في الحالات الطبيعية قد لا يمكن التعبير عنها وتسمى بالجينات المتنحية في حين ان الجين الذي يعبر عنه يسمى بالمتغلب ، وتستعمل الخمائر في الدراسات وذلك لامكانية الابقاء عليها بالحالة الفردانية .

وتتشارك جينومات حقيقيات النواة مع بدائيات النواة بوجود التواليات القصيرة (المذكورة انفا) والتي سميت بداية بـ Microsatellite او Minisatellite وسميت كذلك STRs (Short tandem repeats) وكذلك VNTR للمتغيرة منها وهي توجد بكميات كبيرة ولها علاقة بعمليات التشفير وتوجد في المناطق المجاورة للمناطق المشفرة التي تساهم في تنظيم التعبير الجيني وفعاليات البروتينات او توجد في مراكز الكروموسومات وتساعد في تثبيت تركيبه ، وتختلف أعدادها في جينوم الخلية الواحدة وكذلك تختلف من حيث نمط انتشارها . وتكون المناطق المحيطة بالتواليات القصيرة عالية التطهير اذ وجد ان SSM تكون مرتبطة بتطور بعض انواع السرطانات ، ووجد ان الخلايا السرطانية تحوي على ما يسمى بـ (CA) n SSR في DNA الذي يكون 30 % منها متغيرا في حالة السرطان عن الحالة الطبيعية .

وتنتشر التواليات القصيرة في الاحياء المجهرية حقيقية النواة وتكون ضرورية لفعاليتها وتكون في اغلب الاحيان مرتبطة بصفات الضراوة ، وقد سجلت في الطفيليات مثل *Trichomonas vaginalis* و *Giardia lamblia* وغيرها . وفي الابتدائيات تساهم التواليات في حماية الخلايا امام دفاعات المضيف ، اما في الاعفان والخمائر فان هذه التواليات تقوم بعمليات التنظيم كما هو الحال في البكتريا وبالتالي تؤثر على النمط المظهري لها . وتوجد في جينوم الخميرة *S. cerevisiae* وتكون مهمة بالنسبة لهذه الخميرة في عمليات التصنيع التي تتعرض فيها الخلايا لتغير مستمر في الظروف

اثناء التخمر ، ولذلك يعتقد ان التواليات القصيرة ساهمت في التطبع المستمر للخميرة وفقا لمتطلبات البيئة .

والخميرة *C. albicans* تحوي التواليات القصيرة التي تكون متغايرة بين السلالات واكثر مكرراتها هي مكررات الكوانين ومشابهة لما موجود في الإنسان وتشارك في عمليات تنظيم الانتساخ ، وكذلك توجد في الخميرة المرضية *Cryptococcus neoformans* . وتستعمل هذه التواليات في التنميط الجزئي للفطريات ، وتكون التواليات المتجاورة والمشتتة غير متشابهة بين السلالات

جينومات الفيروسات

تعد هذه المجموعة مهمة في التقنية الحيوية ، وكما ذكر سابقا ان جينوماتها تتكون من DNA او RNA . وتستطيع الفيروسات البقاء وليس النمو بغياب الخلية المضيفة ، ولذلك فان الفيروسات الناتجة تحتاج ان يكون الفيروس ثابتا ليبقى ليبقى محافظا على بعض صفات الحياة عند غياب الخلية المضيفة ، كما انه يجب ان يكون قادرا على غزو الخلايا اضافة الى وجوب احتواءه على المعلومات اللازمة لتضاعفه وتعبئة الجينوم في القفيصات وتحريرها من الخلايا المضيفة .

والجينومات تتكون من اشرطة مفردة او مزدوجة من الحوامض النووية وتحوي بعض الحوامض على قواعد نتروجينية غير طبيعية مثل Hydroxymethyl cytosine . والعائيات المعتدلة تدخل دورة غير تحليلية ويدخل العاثي ضمن DNA الخلايا المضيفة وتكون الخلايا الحاملة خلايا مستنابة Lysogenic ، والعاثي λ في *E. coli* هو عاثي مستناب (كما سيأتي ذكره لاحقا) .

ومن العائيات الخيطية المستعملة M13 في الهندسة الوراثية الذي له صفات خاصة به ، يحوي على اشرطة مفردة من DNA يكون معقدا مع البروتينات الخلوية ، وهو يضعف الخلايا ولا يقتلها . والعائيات البكتيرية تكون مكونة اما من DNA او RNA ، والاخير يمكن ان يعمل كقالب لتضاعف RNA او تخليق mRNA اما في الفيروسات القهقرية Retroviruses وهي مجموعة من الفيروسات الحيوانية ، فان DNA يخلق من RNA الفيروس الذي يعمل كقالب ويتم بواسطة انزيم النسخ العكسي Reverse transcriptase او يسمى RNA-dependent DNA polymerase وهذا يخالف الطريق العام لانسياب المعلومات من DNA الى RNA ، ويساعد الفيروسات في التحول الى DNA وبالتالي امكانية اندماجها مع جينومات الخلايا الحيوانية .

تنظيم التعبير الجيني

بعد المرور على تراكيب جينومات الاحياء المجهرية وعمليات التعبير الجيني التي تشمل عمليات الانتساخ والترجمة ، فهناك عدة اليات مهمة لتنظيم هذه العمليات لتقوم بفعاليتها . فعند وضع الخلايا في بيئة جديدة يكون النمط الجيني هو الموجه لظهور النمط المظهري وفي هذه الحالة تتغير البيئة على

الخلايا او البكتيريا لذلك وجب ايجاد نمط فسلجي جديد ملائم ليتطبع على البيئة الجديدة . فالجينات المهمة يعبر عنها بسرعة وبكميات كبيرة كي تسمح بالنمو السريع ، اما الجينات التي تحتاجها الخلايا تحت ظروف خاصة فلا يعبر عنها .

والتطبع الفسلجي يكون مرتبطا بالفعاليات الايضية وانسياب مواد الايض في مسارات معينة وتتم السيطرة عليها :

1-تنظيم تخليق بعض الانزيمات الخاصة .

2-تغير فعالية الانزيمات الموجودة .

وبصورة عامة فإن انزيمات الهدم يتم حثها عند توفر مواد الاساس التي تعمل عليها في وسط النمو اما انزيمات التخليق فيتم كبحها بنواتج الايض من المسار الذي تعمل فيه .

ومن الوجهة الاقتصادية للخلايا البكتيرية ان يكون توزيع الجينات في اوبرونات خاصة لغرض السيطرة على تنظيمها بأقل ما يمكن من صرف الطاقة . وتكون عمليات التنظيم نتيجة لاستجابة الخلايا لمحفزات من داخل الخلايا او من البيئة المحيطة ، ويمكن ان تؤثر عملية التنظيم على أي مرحلة من مراحل التعبير عن الجينات مثل بدء الانتساخ او إنهائه ، وأثناء عملية الترجمة او تنظيم فعالية منتجات الجين ، فكمية البروتينات في الخلية يمكن ان تكون قليلة ثم ترتفع لتصل الى الاف الجزيئات تحت تأثير محفز ما ، وهذا يحدد بواسطة تأثير العديد من اليات التنظيم التي تؤثر على عملية التعبير عن الجينات التركيبية لهذه البروتينات اذ يتم :

- تحديد كفاءة ترجمة mRNA الناتجة الى بروتينات .
- تحديد سرعة تفكك جزيئات mRNA .
- تحديد سرعة الانقلاب Turnover للبروتينات .
- امكانية تحديد فعالية البروتينات الناتجة وذلك باستعمال التأثير الالوسيتري او التحويرات التساهمية .

ويبدو مما ذكر اعلاه انه لا بد من وجود آليات مختلفة للتجاوب مع هذه الإمكانيات . وتتأثر عمليات التنظيم ودرجة تعقيدها بتراكيب الخلية فمن المتوقع ان تكون عمليات التنظيم اعقد في الخلايا حقيقية النواة ، والتي تخالف الخلايا بدائية النواة التي تنتظم اكثر جيناتها في اوبرونات Operons واغلب الأحيان تكون هذه الجينات تعمل في مجال واحد ويتم التعبير عنها كوحدة واحدة وبشكل متناسق وبذلك يكون ناتج الانتساخ في مثل هذه الحالة Polycistronic mRNA أي متعدد الرسائل وكل رسالة تحوي على موقع للارتباط بالرايبوزوم قبل بداية كل تسلسل مشفر على جزيئه mRNA .

المنظمات ونقل الاشارات Regulons and signal transduction

المنظم Regulon مجموعة من الجينات او الاوبرونات التي يسيطر عليها بمنظم عام يسمى Global regulator ويقوم بتنظيم فعالية الاوبرونات الواقعة تحت تأثيره بشكل متناسق . ويفضل استعمال نظام Regulon في الأحياء المجهرية وذلك :

1-يساعد الخلايا عند التحسس بمحفز واحد الذي يكون مرتبطا بالتعبير عن عدد كبير من الجينات التي قد تحتاجها للاستجابة الملائمة للمحفز .

2-الغاء الحاجة لتنظيم جينات موزعة تحتاج الاستجابة فيها الى تناسق متقن .

3-تتداخل المنظمات في فعاليتها ويحصل ان تنتج بعض البروتينات في استجابات أخرى غير المحفزة مثل انتاج بعض بروتينات الصدمة الحرارية تحت ظروف ارتفاع الضغط التنافذي .

وتتأثر المنظمات بالعديد من الظروف مثل تفاعل الخلايا تجاه المواد الغذائية مثل الكربون والنروجين والفسفور سواء زيادتها او نقصانها ، كذلك استجابة الخلايا للظروف التي تؤدي الى اضرار في موادها الوراثية او الصدمة الحرارية ، او الصدمة التنافذية وغيرها من العوامل البيئية اضافة الى تحسس الزحام في الاحياء المرضية اثناء نموها في المضاييف التي تغزوها من الكائنات الحية الاخرى مما يؤدي الى زيادة ضراوتها بعد زيادة التعبير عن جينات الضراوة . كما ان المنظمات تستجيب الى اشارات من داخل الخلية فمثلا في *E. coli* يوجد اكثر من 40 منظم مختلف ومن أمثلتها cAMP - regulon وكذلك المنظم المشترك في الاستجابة للمجاعة واستجابة الاستغاثة SOS . وقد اقترح مصطلح المستحث Stimulon لوصف مجموعة من الجينات او الاوبرونات (وبالتالي بروتيناتها) التي يتم حثها .

تحسس الخلايا للاشارات الخارجية

تتحسس الخلايا ومنها البكتريا للظروف البيئية المحيطة بانظمة تحسس مكونة من اثنين من المكونات (Two component systems)

من اهمها بروتين يستعرض الغشاء الخلوي الذي يكون جزءا منه بارزا الى الخارج والآخر بارز الى الداخل ، والجزء الخارجي يتحسس بالمؤثر والداخلي ينقل اشارته . ويكون الجزء الداخلي ثنائي الوظيفة الاولى استلام الاشارة من الجزء الخارجي والثانية نقلها الى ما بعده . وتشكل المستلمات اجزاء من منظمات مختلفة تكون بينها علاقة وراثية وتظهر تجانسا في تسلسل حوامضها الامينية . ان الجزء المتحسس بالاشارة والجزء المنفذ من البروتينات تكون مختلفة ولكنها تتفق في الوظيفة أي يكمل احدها الاخر اذ تقوم بتحديد الاشارة وتحفز الاوبرونات او تكبحها حسب الاشارة الواردة .

ويكون للتنظيم العام Global regulation دور فسلجي هام في البكتريا المرضية فمثلا في *Vibrio cholerae* و *Bordetella pertussis* تعبر عن عدد من عوامل او محددات الضراوة تحت تاثير انظمة نقل الاشارات التي تكون مشابهة للأنظمة Two component systems المذكور اعلاه . ومن مظاهر التداخل في عمليات التنظيم ما يحصل من التعبير عن البروتينات اللازمة لعملية الغزو في النمط الغازي لبكتريا *Shigella* الذي يسيطر عليه بالحرارة ، وكذلك تحسس البكتريا *Yersinia enterocolitica* التي تتحسس الحرارة من البيئة الخارجية وكذلك تحسس لتراكيز ايون الكالسيوم . وتستعمل العاملين المحفزة للتعبير عن الجينات الملائمة وتوجه منتجات هذه الجينات الى الاماكن المطلوبة في الخلية و خارجها . ومن الامثلة الاخرى على استجابة البكتريا او احياء المجهرية الاخرى هو تحسسها لنقص الحديد في أنسجة المضيف الذي يكون واطنا جدا ، لذلك فان اغلب البكتريا المرضية لها ألفة عالية لنقل الحديد اذ تحت هذه الانظمة عندما تكون تراكيز الحديد واطنة ، وكذلك حث سموم الخناق وسموم الشيكيا في البكتريا *Shigella dysenteriae* والسم A من البكتريا *Ps aeruginosa* .

وبعد ورود الاشارات الى داخل الخلايا خلال الانظمة المذكورة اعلاه تقوم الخلية بتنظيم عمليات تخليق البروتينات بشقيها الانتساخ او الترجمة وهي تقع ضمن مجالين أما الحث أو الكبح للجينات المعنية ، وهناك العديد من البروتينات التي تخلق بعد عملية الاستجابة وهي بروتينات تنظيمية تسيطر على عملية التعبير عن الجينات التركيبية للبروتينات التي تحتاجها الاستجابة .

تنظيم الانتساخ

1- عند الانتساخ وارتباط RNAP للممهدات التي تختلف فيما بينها في قابلية الارتباط هناك عددا من البروتينات التي تشارك في مجرى عملية الارتباط وهي ترتبط الى مناطق DNA قرب الممهدات مثل الجينات المشغلة Operators وقد تم تصنيف مثل هذه البروتينات الى عدة مجاميع او عوائل مثل LysR family وهي التي تنظم ايض اللايسين او السستئين والميثايونين في بكتريا *E. coli* و *V. cholerae* واكثر البروتينات المنظمة تعمل ضمن عملية المزوجة بين التحسس بالمحفز والاستجابة له لذا تكون اغلبها بروتينات ذات فعالية مزدوجة فهي ترتبط الى المشغلات الملائمة اضافة الى ارتباطها الى المنفذات الخاصة وهذ المنفذات هي جزيئات صغيرة مثل السكريات او الحوامض الامينية او غيرها ، والبروتينات المنظمة في الحقيقة هي الوستيرية أي انها يمكن ان توجد بتوزيعات فراغية Conformations مختلفة وهذا يؤدي الى امكانية ان تكون لها ألفة مختلفة للارتباط الى المشغلات الخاصة بها اضافة الى ارتباطها للمنفذات Effectors ، والتراكيز العالية من المنفذات تشجع تكوين معقدات بينها وبين البروتينات المنظمة . والمعقدات الناتجة قد تكون ذات ألفة عالية او واطنة للارتباط بالمشغلات اعتمادا على الحالة . ففي حالة التنظيم السلبي تعمل المنفذات

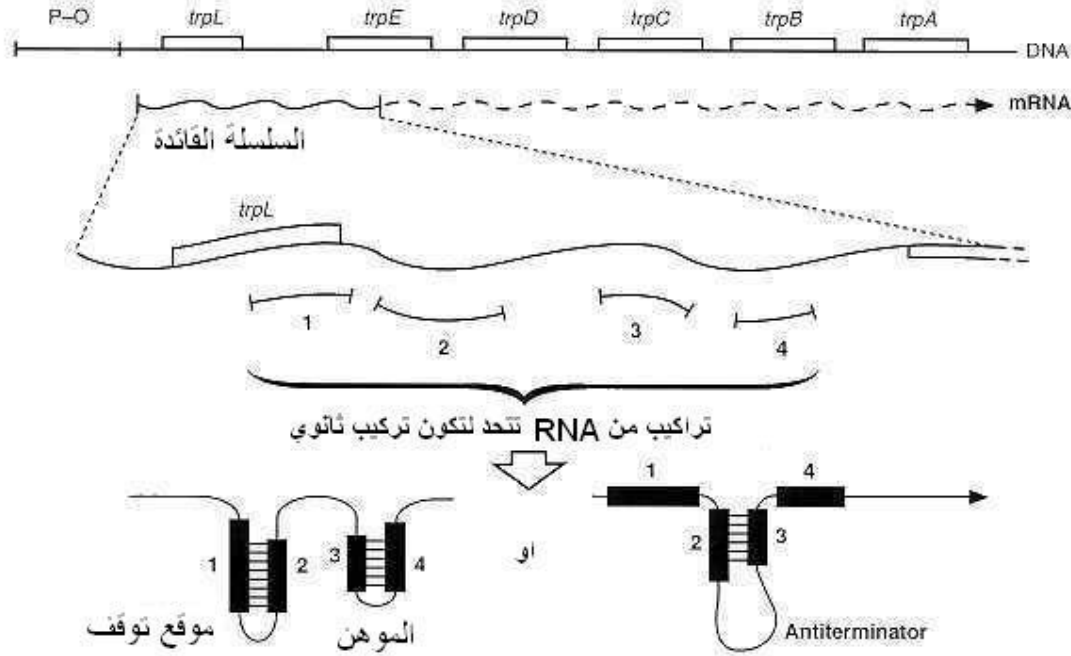
بمثابة مواد مساعدة للكابح Corepressor ، كما ان المنفذات يمكن ان تعمل كمواد حائثة وتؤدي الى ازالة الكبح Derepression فيما اذا كان بروتين التنظيم الحر يعمل بمثابة كابح . وفي انظمة التنظيم الموجبة يقوم المنفذ بتحفيز التعبير عن الاوبرون اذا كان معقد المنفذ مع البروتين المنظم هو منظم موجب .

وتستعمل عمليات تنظيم الانتساخ في الفيروسات التي تصيب الخلايا ومنها العاثي λ فان الية Anti termination تستعمل كآلية تنظيم موجبة للسيطرة على التعبير الجيني . فبعد اصابة *E. coli* بالعاثي مباشرة فان RNAP يرتبط الى احد الممهدين في DNA العاثي ويتم انتاج نسخ (Transcripts) اولية تنتهي عند مواقع معينة في جينوم العاثي وذلك لان النسخ تكون بروتينات والاخيرة تداخل مع RNAP وتساعد في استكمال عملية الانتساخ وبذا يستأنف التعبير عن جينات العاثي .

ومن جهة ثانية فان هناك بعض الجزيئات mRNA تخلق باستمرار وبمعدلات ثابتة تقريبا والتي تكون مختلفة بين الخلايا ما يشير الى تفاوت قوة ممهداتها . وكل من الجين الممهد والجين المشغل تقع ضمن الاوبرون ويمكن ان يحصل تداخل في توالياتهم . وارتباط البروتينات المنظمة للمشغل يمكن ان يؤدي الى زيادة عمليات الانتساخ وهو ما يطلق عليه التنظيم الموجب . ولكن في احيان اخرى تؤدي الى خفض معدلات الانتساخ وتدعى السيطرة السالبة ، وعندها تدعى البروتينات المنظمة بالكابحات Repressors ، ونظرا لكون البروتينات الاخيرة قادرة للانتشار في السايكوبلازم لذلك لا يكون من الضروري ان تكون الجينات التركيبية لها مرتبطة بالاوبرونات المستهدفة لعملها .

2- اما المرحلة التي تلي عملية بدء الانتساخ فلا تتعرض عادة للتنظيم وتكاد تكون ثابتة .

3- التوهين Attenuation احدى الليات التي تنظم بها الاوبرونات وذلك بانهاء عملية الانتساخ وتنتج جزيئات mRNA غير كاملة او ناضجة وتستعمل بكثرة في الاوبرونات العاملة في مسارات التخليق خاصة عندما تصبح الخلايا غير محتاجة لنواتجه ، فعند وجود المادة بكثرة تكبح عملية بدء تكوين النسخ التي بدأت من الممهات عادة وتنتهي قبل ان يحصل انتساخ كامل للجينات التركيبية ، وتزداد هذه فعالية الآلية بزيادة تركيز النواتج عن الحد اللازم الذي تحتاجه الخلايا . وفي هذه الآلية يلعب التركيب الثانوي لجريئة mRNA الدور الاساسي ، فجزيئات mRNA تحوي على سلسلة او توالي قائد Leader sequence تقع بين بداية نقطة الانتساخ وبداية الجينات التركيبية . وتكون جزيئات mRNA العاملة في الاوبرونات التي تنظم التوهين ذات صفات معينة فمنطقة السلسلة القائدة يمكن ان تكون تركيب ثانوي ، وتكون مميزة الى اربعة مناطق يمكن ان تزود مع بعضها كما موضح في الشكل (22) للاوبرون الترتوفان .



شكل 22 : آلية التوهين لتنظيم عملية الانتساخ

والسلسلة القائدة يمكن ان تكون احدى التراكيب الثانوية المحتملة الاتية :

يكون موقع للتوقف عند ازواج المنطقة 1 مع 2 وتكوين التركيب الموهن من ازدواج المنطقة 3 و 4 ، والقطعة 1 من منطقة التوقف تتداخل مع بعض المناطق المشفرة لاوبرون التربتوفان المنطقة trpL كما موضحة في الشكل وبذلك فان كفاءة تكوين التركيب الثانوي يعتمد على كفاءة ترجمة الببتيد من trpL ، لذلك فانه عند انتساخ القطعة 1 و 2 فانها تلتحم مباشرة مؤدية الى توقف الانزيم RNAP بشكل مؤقت . اما عند ترجمة الببتيد من trpL فان هذا يؤدي الى اضطراب موقع التوقف المؤقت وتسمح لانزيم RNAP ليكمل عملية الانتساخ .

وعند وجود التربتوفان فان انتساخ القطع 3 و 4 يؤدي الى تكوين التركيب الموهن والذي يكون عندها الرايبوزوم غالقا للقطعة 2 مؤديا الى انتهاء عملية الانتساخ بواسطة RNAP . اما عند قلة التربتوفان وهذا يعني قلة في او غياب tryptophanyl -tRNA ويتوقف الرايبوزوم عند شفرة التربتوفان عند القطعة 1 وهذا يسمح للقطعة 2 مع 3 لتكون anti - terminator ، وبذلك تكون القطعة 3 غير جاهزة للازدواج مع القطعة 4 لتكون التركيب الموهن ويستمر الانزيم RNAP في انتساخ الاوبرون . وبهذه الطريقة فان نقصان التربتوفان او بالآخرى نقصان tryptophanyl -tRNA يرافقه تنظيم انتساخ الاوبرون التخليقي للتربتوفان او أي حامض اميني ينظم بالالية نفسها .

4 - تفكيك جزيئات mRNA تكون في بدائية النواة سريعة والعمر النصف لها عدة دقائق بعكس الانواع الاخرى مثل tRNA و rRNA التي تكون اكثر ثباتا ولذلك وبالرغم من ان mRNA يخلق بكميات كبيرة الا ان نسبته في الخلية ضئيلة بالنسبة للمجموع الكلي للـ RNA وذلك لتفككه وعند توقف تخليق جزيئات خاصة من mRNA فان السلسلة الببتيدية التي يصنعها تتناقص بسرعة .

5 - استعمال RNA غير الحساس او اللامدرك Antisense RNA ، يمكن ان يستعمل في عمليات التنظيم وهو يمثل RNA الناتج من انتساخ الشريط المقابل من DNA الذي انتج منه mRNA . وعند وجوده فانه يقوم بالازدواج مع mRNA المناظر له ويمنع ترجمته لذلك يدخل في عمليات التنظيم ويعد وسيلة فعالة في تحويل نشاط الجينات ويستعمل بشكل فعال في الهندسة الوراثية

وتستطيع الخلايا التخلص من جزيئات RNA المزوجة بواسطة الانزيم RNAase H الذي يتعرف عليها ، ولذلك يعتقد انه وسيلة دفاعية للخلايا ضد الإصابات بالفيروسات المكونة من أشرطة ثنائية من RNA .

وفي البكتريا يمكن ان تستعمل الالية لتنظيم فعاليتها فمثلا في *E. coli* فان الغشاء الخارجي لها (شكل 3) يشفر لبعض البروتينات وهي OmpC و OmpF والنسبة بين البروتينين تتاثر بالضغط التنافذي في الوسط المحيط بالخلايا ، وعند الحاجة فان mRNA الخاص بـ OmpC تزداد وتقل كمية الخاص بـ OmpF بواسطة Antisense RNA الذي يطلق عليه *micF* ، وتترجم الجزيئات الخاصة بـ OmpC في حين ان *micF* يرتبط الى موقع بدء انتساخ OmpF بالاعتماد على قاعدة ازدواج القواعد النروجينية ويغلق عملية انتساخه وبالتالي ترجمته .

واستعمال Antisense RNA في معالجة السرطان تم اقتراحه لقدرته على تعطيل جين معين دون اخر ، لذلك يمكن استعماله لتعطيل جينات السرطانات Oncogenes كما سيأتي ذكره . وفي الخلايا حقيقية النواة المعقدة التركيب فان عملية الانتساخ وتكوين mRNA تمر بخطوات اكثر اذ تنتج نسخة اولية غير فعالة اولاً hnRNA في النواة وتزال منها الانترونات وتكوين mRNA في النواة ليصدر الى الساييتوبلازم - كما مر ذكره - وكل خطوة من هذه الخطوات تكون عرضة للتنظيم .

تنظيم الترجمة

في جميع الاحياء الحية ، تلي عملية الانتساخ عملية الترجمة بعد عبور العملية الأولى كل مراحل التنظيم ، وتتم عملية الترجمة على الرايبوزومات التي تحوي على مواقع محددة للارتباط بالـ mRNA المراد ترجمته وتكون قواعد rRNA وعلى وجه الخصوص 16S rRNA مكملية للقواعد

في mRNA وتتداخل القواعد النتروجينية مؤديا الى تكوين معقد البدء لتخليق البروتين والتي تم التعرض لها مسبقا (شكل 20) .

وتعد الشفرة الاولى في mRNA من الامور المؤثرة على كفاءة الترجمة ولذلك فان mRNA لبروتينات تحتاجها الخلايا بكميات كبيرة تميل الخلايا جعلها من الشفرات التي يمكن ان تساعد في ترجمتها اغلب جزيئات tRNA والحالة المعاكسة تكون صحيحة .

وتكون عمليات السيطرة على تخليق البروتينات مهمة وصارمة عند ترجمة البروتينات التركيبية للرايبوزومات ، وذلك لان تخليق الرايبوزومات يكلف الخلايا كثيرا من الناحية الايضية والطاقة وفي حالة ارتفاع معدلات النمو فان الرايبوزومات تشكل حوالي نصف وزن الخلية . ويتم تجميع البروتينات الرايبوزومية و rRNA لتكون الرايبوزومات الكاملة ، اما الوحدات الثانوية للرايبوزومات الحرة تكون قليلة . ومن المعروف ان عملية الترجمة تكون مرافقة او تعقب عملية الانتساخ وعند حصول الطفرات Non - sense (أي وجود شفرة ختم) تؤدي الى انهاء الترجمة غير الناضجة ووجود مثل هذه الطفرات يؤدي الى قلة انتساخ الجينات التي بعدها وهو ما يطلق عليه القطبية Polarity ، اذ يقوم RNAP بالتداخل مع مواقع الانتهاء . وعند الترجمة تقف العملية عند هذه الشفرات المتغيرة وتؤدي الى فك mRNA من الرايبوزومات .

ويلاحظ ان الجينات المسؤولة عن تخليق البروتينات الرايبوزومية تترتب في عدة اوبرونات ، وهناك بعض بروتينات الرايبوزوم الحرة تشارك في عمليات التنظيم وتنشط بشكل مباشر عملية ترجمة بعض جزيئات mRNA ذات الرسائل المتعددة وبذا تساعد في الموازنة بين استخدام البروتينات وتخليقها .

اوبرون اللاكتوز

يعد اوبرون اللاكتوز lac operon من اكثر الانظمة التي درست في *E. coli* والتي تمثل نموذجا دراسيا ويتم التعرض له لتغطية بعض آليات التنظيم المذكورة اعلاه .

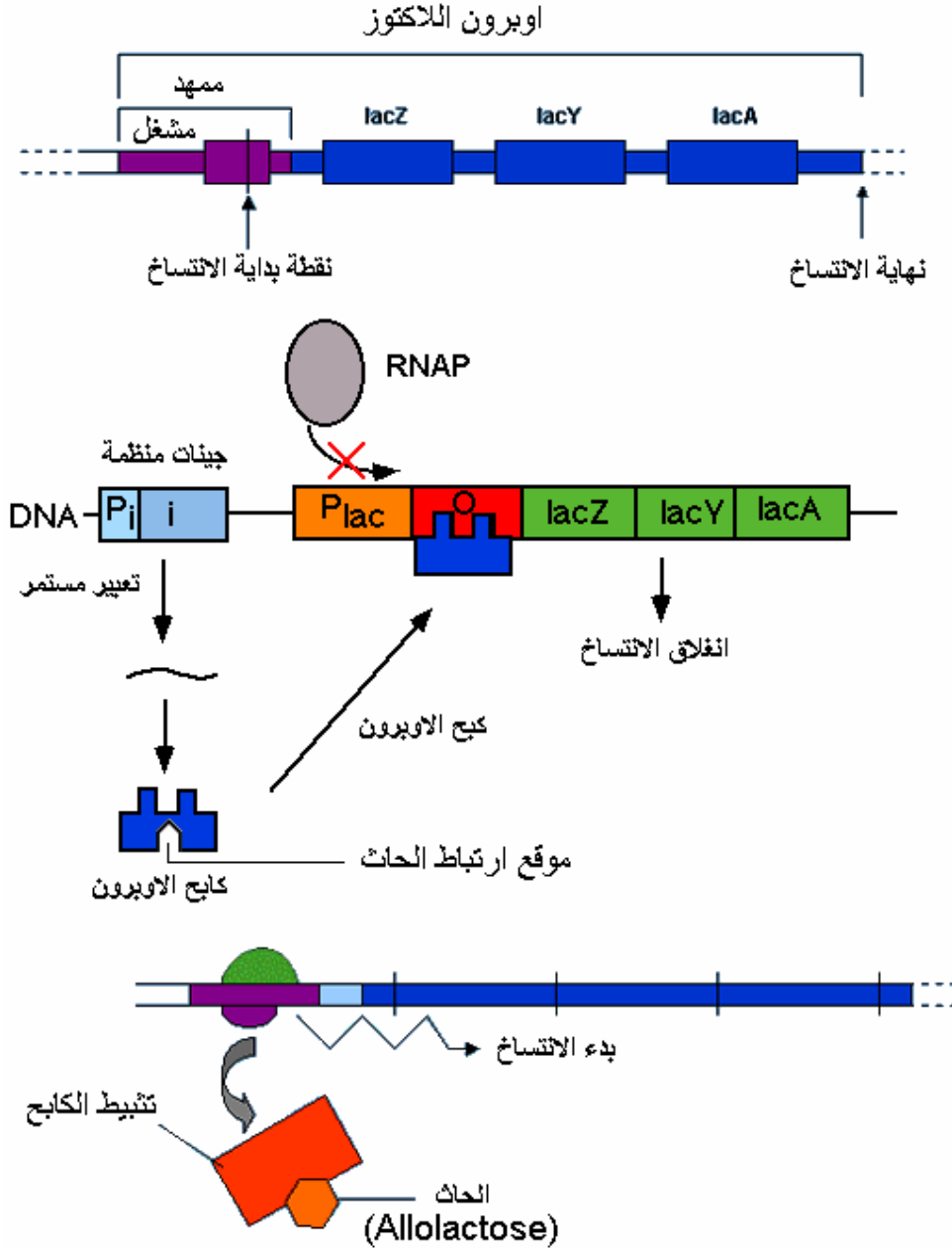
في الخلايا بدائية النواة تكون عمليات الترجمة مرافقة لعمليات الانتساخ وهي إحدى الآليات التي تتبعها الخلايا وبذلك تكون سريعة النمو وهي السمة المميزة لهذه المجموعة ، إضافة الى ان تحويل البروتينات وطويها تكون مرافقة لانتاج البيبتيدات الاولى او التسلسل الأولي للبيبتيدات الناتجة اذ تقوم البروتينات الوصيفة او الوصيفات Chaperones بعملها مباشرة . إضافة الى ان الجينات سواء التركيبية وبعض الأحيان المنظمة تنتظم في اوبرون واحد لانتاج mRNA متعدد الرسائل يسيطر عليها جين منظم واحد مثل اوبرون اللاكتوز قيد المناقشة وكذلك اوبرون التريبتوفان المكون من 5 جينات تتجمع في trp operon وكذلك اوبرون الهستدين وغيرها .

واوبرون اللاكتوز من اوبرونات الهدم Catabolite operon ويستحث بوجود مادة الأساس له وهي اللاكتوز ويتكون الاوبرون من عدة جينات موضحة في الشكل (23) .

فالجين *Lac I* يشفر لبروتين كابح Repressor الذي يرتبط بالمشغل Operator (وهو تسلسل قصير يقع جنب الجين الممهد ويساعد في السيطرة على عمليات التعبير الجيني) ويقوم بمنع الانتساخ عند منطقة الممهد وتسمى هذه بالسيطرة السالبة . والجينات التركيبية للكابح *LacI* تكون منفصلة عن باقي مكونات اوبرون اللاكتوز ويتكون الكابح بشكل غير مستحث ولكن بمعدلات واطئة وعند ارتباط المادة الحاتة الى الكابح يتغير شكله ، ويصبح غير قادر على البقاء مرتبطا بمنطقة المشغل كما انه يصبح غير قادر على منع ارتباط الإنزيم RNAP الى الجين الممهد ، واذا كانت الظروف الاخرى ملائمة فان عملية الانتساخ تستمر وتترجم معلوماتها لتعطي β - galactosidase و Permease و Transacetylase lacZ . يشفر للإنزيم β - galactoside الذي يفلق اللاكتوز الى D-glucose و D-galactose ، اما lac Y فيشفر للـ Premease الذي ينقل السكر الى داخل الخلايا والحقيقة ان الانزيم الاول المحلل للاكتوز β - galactosidase يوجد بكميات قليلة ويحول اللاكتوز الى كلوكوز وكلاكتوز وكجزء من فعاليته ينتج Allolactose وهو النظير التركيبي لسكر اللاكتوز ، ويكون الالولاكتوز هو المادة الحاتة ، ويمكن ان يستحث الاوبرون بمواد تشابه اللاكتوز من حيث الهيئة التركيبية مثل IPTG (Isopropyl β -D- thiogalactoside) والذي يطلق عليه احيانا بالحات المجاني لانه يمكن ان يحث اوبرون اللاكتوز ولكنه لا يخضع لتأثير الإنزيمات الناتجة من الحث .

ويحتاج اوبرون اللاكتوز الى السيطرة الموجبة للعمل بشكل متكامل والتي تساعد في انتساخ مكونات الاوبرون ، فعند نمو *E. coli* في وسط يحوي الكلوكوز واللاكتوز فان اوبرون الاخير يكون معطلا الى ان يتم استهلاك الكلوكوز اولا ثم يبدأ استهلاك اللاكتوز بعد مدة تلكؤ قصيرة ضمن ظاهرة النمو الثنائي Diauxic growth او Diauxy . وفشل حث اوبرون اللاكتوز عند وجود الكلوكوز والتي تكون فاعلة في مجالات اخرى وليس استهلاك الكاربوهيدرات . وعملية الكبح بالكلوكوز تمثل سيطرة او تنظيم موجبة وتتم بواسطة المركب الحلقي cAMP الذي يرتبط بالبروتين CAP (Catabolite gene activator protein) وهو ناتج من الجين *crp* ليكون معقد cAMP-CAP يرتبط في موقع معين في المنطقة المنظمة من اوبرون اللاكتوز موضحة في الشكل اعلاه (منطقة الجينات المنظمة) ، وهذا الارتباط يساعد في بدء انتساخ الاوبرون من الممهد الخاص به ، ولذلك فعند نمو الخلايا *E. coli* في وسط يحوي على الكلوكوز يكون تركيز cAMP واطنا ويزداد تركيزه عند غياب الكلوكوز وعليه فان تأثير الكبح بمواد الهدم يكون ناتجا عن قلة cAMP ولذلك يزداد تركيز

cAMP من حدوث انقلابات او تفاعلات من ATP عندما تشعر للخلايا بنفاد الطاقة ليزيد من هدم المواد والحصول على الطاقة الايضية .



شكل 23 : تركيب وتنظيم اوبرون اللاكتوز

ويعمل cAMP في مجالات اخرى للسيطرة على الجينات مثل عند نقص الحوامض الامينية وزيادة ppGpp التي تكون اشارة لحدوث المجاعة Starvation (التي سيتم ذكرها لاحقا) وكذلك يشارك في استجابة الاستغاثة SOS عند حصول تدمير او ضرر لل DNA .

وقد استعمل اوبرون اللاكتوز لدراسة العديد من الظواهر الوراثية مثل ظاهرة الاستنابة للـ *E. coli* عند إصابتها بالعائى λ ، ويستعمل في الهندسة الوراثية وتستعمل ممهداته في تحضير نواقل الكلونة Cloning vectors المهجنة نظرا لسهولة تمييز الخلايا الحاوية عليه من التغيرات اللونية للدلائل المضافة للأوساط الغذائية .

وتستعمل السيطرة السالبة الموضحة اعلاه ليست فقط في المسارات الهدمية وانما يمكن ان تستعمل في المسارات التخليقية اذ تعمل نواتج المسارات كمنفذات لأنظمة التنظيم السالب سواء في الخلايا بدائية النواة او حقيقية النواة والتي يمكن ان تستعمل بعض التواليات الخاصة Enhancers لتشجيع عمليات الانتساخ .

التأشب Recombination

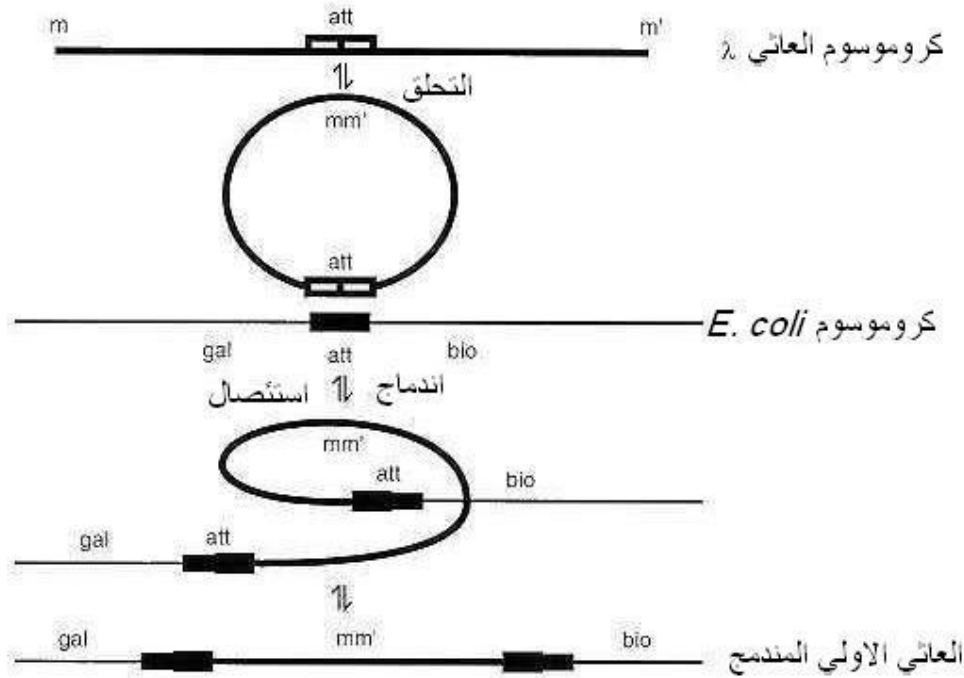
تمثل عمليات اعادة ترتيب المواد الوراثية في الخلايا المستلمة للمواد الآتية من الخلايا الواهبة لانتاج جينومات جديدة وتحدث ايضا اثناء عملية إصلاح الأضرار في DNA وتشمل ايضا كسر وربط جزيئات DNA الأبوية لتكوين جزيئات هجينة .

وتوجد انواع من التأشب شخصت اعتمادا على مظاهر متعددة منها الاعتماد على مصادر DNA او الجينومات المشاركة . وتحتاج العملية الى نواتج عدد من الجينات منها الإنزيمات القاطعة للحوامض النووية سواء الداخلية Endonucleases او الخارجية Exonucleases وكذلك تحتاج الى انزيمات الكوثرية Polymerases والإنزيمات اللاحمة Ligases . وتحتاج العمليات الى البروتينات العامة منها بروتين recA الناتج من جين *recA* .

● **التأشب العام :** وتشمل استعمال او ربط DNA من الخلايا الواهبة والخلايا المستلمة الحاوية على توالي قواعد متجانسة ويمكن ان يحدث العكس بين الخلايا المستلمة والخلايا الواهبة في المناطق التي فيها تجانس ففي *E. coli* يكون ناتج الجين *recA* هو الأساس في عملية التأشب او التلاحم اضافة الى استعمال منتجات جينات اخرى .

● **التأشب المتخصص Site-specific recombination :** ويشمل تبادل DNA بين المصادر الواهبة والخلايا المستلمة ولكن من مواقع محددة من جينوماتها . وفي هذه الحالة لا داعي لوجود نواتج الجين *recA* . ومن امثلتها الواضحة اندماج العائى λ في جينوم *E. coli* وكما موضح في

الشكل (24)



شكل 24: التآشب المتخصص يوضح اندماج جينوم العائلي λ في جينوم العائلي *E. coli*

ويوضح الشكل احتواء جينوم العائلي على موقع الارتباط *att* على كروموسوم العائلي وجينوم *E. coli* التي تحوي على توالي متشابه يصل الى 15 نيوكلوไทيد وهي التي يحدث فيها التآشب المعكوس . وتحاط منطقة التآشب بتواليات غير متشابهة . في العائلي يكون ناتج الجين *int* هو انزيم الاندماج Integrase الذي يكون لازما لعملية الدمج وإدخال قطع من DNA الجديدة في الجينوم المستلم اثناء احداث الاستدابة ، وناتج الجين *ixs* الذي يشفر لانزيم الاستئصال Exocisionase الذي يكون ضروريا لاستئصال القطعة من الجينوم البكتيري التي ستزال لتوضع مكانها القطعة الجديدة . ويدخل العائلي λ في المنطقة الواقعة بين *bio* المسئول عن تخليق البايوتين و *gal* المسئول عن استهلاك الكلاكتوز .

ويمكن ان يقسم التآشب بشكل اخر مثل .

• **التآشب المتجانس :** يحصل في بعض جينومات البكتيريا عندما يراد إعادة ترتيب موادها

الوراثية وتشمل :

عمليات القلب المتخصصة Site – specific inversion : وقد درست هذه الظاهرة في بكتريا

Salmonella وما تعانيه من تغير المستضدات السوطية ، اذ تعاني البكتيريا من تغير الطور وفيه يمكن للخلايا التعبير عن H1 او H2 والتي تكون مهمة من النواحي الصحية وكذلك التتميط والتصنيف .

• **التأشب غير المتجانس** Illegimate recombination : تأشب غير صحيح او غير الشرعي : ويصف عمليات التأشب التي تحصل اثناء تكوين تشكيلات وراثية من مواد وراثية بعيدة الأصول .

وهناك عملية تأشب مهمة وهي الخاصة بارتباط القافزات فكما ذكر سابقا ان هذه العناصر غير قادرة على التضاعف ما لم ترتبط بتركيب متضاعف مثل كروموسوم الخلية او البلازميدات ، اضافة الى انها عناصر متحركة من مكان لآخر . ويتم ارتباط القافزات بشكل خاص وهي ليست من نوع التأشب العام لذلك لا تحتاج الى بروتين recA . وقد يتم انتقال القافز دون تضاعف او يتضاعف القافز وتنتقل نسخة منه الى الموقع الجديد كما ذكر سابقا (شكل 21) .

تحول الجين Gene conversion : وفيها يمكن الوصول الى نشوء جين جديد من مجموعة جينات متشابهة ولكن غير فعالة او ناقصة او متضررة لتكون جين فعال وقد تشمل عمليات متعددة ومنها ادلاف الاكسونات Exon shuffling .

الطفرات

وتعرف على انها التغيرات في النمط الجيني القابلة للتوارث . لذلك لكل كائن حي يوجد نمط طبيعي او بري wild type الذي يعد سلالة مرجعية وتتمثل بالاحياء عند عزلها للمرة الأولى ، واي تغيرات تحصل على هذه السلالات تعد طفرات او طافرات Mutants . وتكون الطفرات اكثر وضوحا في الخلايا الفردانية مثل البكتريا وذلك لعدم تغطية الطفرة بتأثير النسخة الثانية من الجين كما في حالة الخلايا مزدوجة الكروموسومات . وقد بدا بدراسة وتحليل الطفرات وخاصة البكتريا في اربعينيات القرن الماضي . وتصنف الطفرات باستعمال مؤشرات عديدة منها طبيعة حدوث الطفرات : 1- **الطفرات المستحثة Induced mutation** : وتنتج من تأثير بعض العوامل على المادة الوراثية للخلايا ، والتي تكون فيزيائية او كيميائية تؤدي الى زيادة حدوث الطفرات الى اضعاف حدوثها او تكرارها الطبيعي .

ومن المطفرات

العوامل الفيزيائية :

أ- الأشعة فوق البنفسجية وتؤثر بشكل مباشر او غير مباشر ولذلك فالجرع الواطئة ممكن ان تقتل الخلايا الميكروبية واغلب هذه الطفرات قابلة للإصلاح . ولكي تكون الأشعة مؤثرة فيجب استعمال الموجات القصيرة منها 254 نانومتر وهو الطول الموجي الذي يمتصه DNA ويكون مدى حصول الطفرات معتمدا على الجرعة . ويقل حصول الطفرات فيما اذا عرضت الخلايا بعد التعريض للأشعة فوق البنفسجية للضوء المرئي خاصة في الخلايا الحاوية على انزيمات Photolysases التي تقوم بعمليات الإصلاح الضوئي والتخلص من مزدوجات الثايمين Thymine

dimmers (Cyclobutane pyrimidin dimmers) كما ان التشيع يؤدي الى تحفيز عمليات التأشب . ان السبب في حدوث الطفرات في اغلب الأحيان يعود الى التأثير المباشر الذي يؤدي الى تكوين تركيب حلقي بين قاعدتين ثايمين متجاورة ووجود هذا التركيب يعيق عمليات التضاعف . اما التأثير غير المباشر فينتج عن تحليل جزيئات الماء المحيطة وإنتاجها للجذور والتي تؤثر على المادة الوراثية .

ب- ومن العوامل الفيزيائية الاخرى هي الاشعاعات المؤينة والتي تؤدي الى حدوث الطفرات او كسور كروموسومية (التي سيتم التطرق لها في فصول قادمة) .

العوامل الكيماوية

وتشمل العديد من المواد التي تؤثر على المواد النووية بطرق مختلفة . والبعض منها تكون مسرطنة للأحياء لذلك تستعمل الأحياء المجهرية مثل البكتريا في التحري عنها مثل المواد المؤلفة والمواد التي تؤدي الى حذف القواعد مثل اوكسيد النتروز و مواد كيماوية بسيطة مثل كلوريد المنغنيز Manganous chloride (MnCl) التي تؤثر على المواد النووية بطرق مختلفة وتستعمل الأحياء المجهرية مثل البكتريا *Sal. typhimurium* في التحري عن المواد المسرطنة كما في استعمال نظام ايمس Ames system الذي يعتمد على الكشف عن رجوع الطفرات التي ينقصها نظام تخليق الهستدين الى الحالة الطبيعية أي التغذية الأولية Prototroph وكذلك *E. coli* التي تحتاج الترتوفان وتستعمل الخميرة *S. cerevisiae* باس متشابهة .

الطفرات التلقائية Spontaneous mutations : مثل هذه الطفرات تكون في العموم نادرة الحدوث ويصل تكرارها الى 10^{-7} - 10^{-10} . ويحدد معدل حدوث الطفرات بمدى صلاحية وانضباط عمليات تضاعف DNA وصلاحية أنظمة التصليح في الخلايا . وللعديد من الأحياء المجهرية معدل ثابت لحدوث الطفرات يعبر عنه باحتمالية حدوث الطفرات لكل انقسام خلوي . وتحدث الطفرات التلقائية بشكل غير معتمد على الظروف التجريبية . وتعد حدوث الطفرات التلقائية احد الوسائل المهمة في تطور الأحياء ، وتحدث نتيجة اخطاء في فعالية مكائن التضاعف Error prone mechanism ، كما ان بعض مكونات DNA مثل السايروسين والتغيرات الفراغية التي تحصل لها تعد مصدرا لحدوث الطفرات ولذلك تعد مناطق ساخنة لحدوث التغيرات .

وقد تحوي بعض البكتريا على جينات عالية التغير تسمى Mutator genes تؤدي الى حدوث الطفرات التلقائية بشكل كبير في عدد من الجينات ، والأحياء الحاوية عليها هي احياء فائقة التطفر Hypermutable microorganisms او تسمى Mutator microorganism وذلك لعدم وجود انضباط في أنظمة تصليح DNA . وعند تعرض مثل هذه الأحياء لظروف غير ملائمة او لاجهادات Stresses بيئية يحصل لها انتخاب أي تكثر الطفرات المتطبعة . وقد وجد ان هذه المجموعة

من الخلايا تشارك في تطبيع البكتريا وتطورها ولها دور مهم في الأمراض الناتجة عن الإصابة . ويكون هذا النمط من الاحياء موجودا في البكتريا الممرضة بشكل كبير جدا كما في حالة إصابة الرئة الناتجة من *Ps. aeruginosa* و *Staph. aureus* و *H. influenzae* المرافقة لمرض التحوصل اليفي Cystic fibrosis . لذلك فان المقاومة لعدة مضادات حيوية وقابلية الأحياء للبقاء في الإصابات المزمنة تعد من المشاكل العويصة المتعلقة بالنمط عالي التطهير ، كما ان صفة حدوث الطفرات التلقائية بمعدلات عالية تكون لها علاقة بعملية تباير الطور التي تساعد الخلايا الممرضة في زيادة ضراوتها ومقاومتها لدفاعات الجسم مثل المجموعة A من البكتريا *N.meningitidis*

تحديد النمط المظهري للطفرات : تؤدي الطفرات احيانا الى تغير النمط المظهري للاحياء أويحصل تغير في أداؤها الايضي . وفي البكتريا يمكن ان تستعمل اوساط غذائية مختلفة للكشف عن الطفرات ، لان بعض الاوساط لا تسمح للأنواع الطبيعية بالنمو مثل نمو البكتريا المقاومة لمضاد حيوي وعدم قابلية الخلايا الطبيعية الحساسة على النمو في الوسط الحاوي على المضاد وتتم باستعمال طرق مختلفة لعل أسرعها استعمال Replica plating في حين ان طفرات اخرى اذا حصلت في بعض الانزيمات الحساسة او المسارات المهمة يمكن ان تؤدي الى موت الخلايا ، وفي بعض الاحيان يمكن التلاعب بالظروف المحيطة مثل درجة الحرارة او غيرها لدراسة هذه الطفرات والتي تسمى بالطفرات الشرطية Conditional mutants .

الاسس الجزيئية للطفرات : تختلف الأسس الجزيئية للطفرات الحاصلة ، كما ان بعض الطفرات تكون مفيدة من وجهة نظر الخلية كما ذكر اعلاه ، اضافة الى ان بعضها يكون مفيدا للإنسان كما يحصل في تطوير السلالات المنتجة لبعض المواد ، وبعض الطفرات تكون مميتة للخلايا فيما اذا حصلت في مواقع حساسة او ضرورية لفعالية الخلية . ويرمز لجين طبيعي معين مثل استهلاك اللاكتوز lac^+ والخلايا التي فقد وظيفة هذا الجين lac^- . وعلى ضوء التغيرات الجزيئية التي يمكن ان تحصل يمكن تقسيم الطفرات الى عدة أصناف :

1- حالة اضافة او حذف جزء من المادة النووية وقد تكون منطقة الحذف صغيرة Microdeletion او تكون منطقة الإقحام صغيرة Microinsertion ، كما ان عمليات الإقحام او الحذف يمكن ان تكون كبيرة ويمكن ان تشمل اعادة ترتيب المادة الوراثية . وبما ان الشفرة الوراثية مكونة من 3 نيوكلوتيديات فان اضافة او حذف 3 نيوكلوتيديات قد لا تؤثر على قراءة الشفرات Reading frame من قبل انزيم RNAP ولكنها تؤثر على اضافة او حذف عدد من الحوامض الامينية تؤثر على تركيب البروتين الناتج ، كما ان اقحام 3 نيوكلوتيديات لشفرة ختم تؤدي الى انتاج بروتين مبتور . وتكون الاضافات او الحذف مؤثرة جدا اذا وقعت في المناطق الأولى من الجين اذ انها ستؤثر على ما بعدها من الشفرات .

وما ذكر يتعلق بالاضافات او الحذف في التواليات المشفرة Coding sequence ، اما اذا حصلت في جينات التنظيم فانها ستؤثر على معدلات الانتساخ وبالتالي الترجمة اما بشكل ايجابي او سلبي ، وقد تظهر الطفرة بصفات متعددة Pleiotropic اذا كان الجين المتغير ينظم اكثر من مسار .

2- يمكن ان تحصل اضافة او حذف قاعدة واحدة وهذا ما يطلق عليه الطفرة النقطية Point mutation .

ويمكن ان تستبدل فيها قاعدة بيورينية بقاعدة بيورينية اخرى او قاعدة بريميدينية مع اخرى من المجموعة نفسها وعندها تعرف بطفرات التحول Transition mutants ، اما اذا حلت قاعدة بيورينية مكان قاعدة بريميدينية او بالعكس فتعرف ب Transversion mutants .

3- هناك نمط من الطفرات يدعى الطفرات الصامتة وتحصل عند تغير الشفرة الوراثية او جزء منها الى شفرة وراثية تشفر للحامض الاميني نفسه فعندها لا يظهر تغير على ناتج الجين وبذلك تكون هذه الطفرات متشابهة من الناحية المظهرية للخلايا الاصلية ولكن عند تحديد توالي القواعد النروجينية يظهر الاختلاف .

4- يحدث بعض الاحيان ان تتغير الشفرة الوراثية من شفرة فعالة تعطي حامض أميني معين الى شفرة ختم وعندها ينتج عن ترجمة mRNA بروتين غير فعال وفي معظم الأحيان تؤدي هذه الطفرات Nonsense mutants الى فقدان فعالية البروتين الحيوية بالكامل .

5- يمكن ان تؤدي الطفرات الحاصلة الى تغير احدى الشفرات التي تشفر لحامض أميني معين لتصبح تشفر لحامض أميني اخر وتسمى Missense mutants وعند ترجمة جزيئات mRNA تنتج سلسلة ببتيدية لا تكون مشابهة للبروتين الأصلي وقد يؤدي ذلك الى التأثير على عمليات طوي البروتينات وتكوين التركيب الثانوي والثالثي الفعال ولكن قد يحتفظ البروتين ببعض فعاليته الحيوية

6- يمكن ان تحصل الطفرات لتغير النمط الطبيعي الى طفرة ذات نمط متغير فمثل هذه الطفرات تسمى بالطفرات المباشرة او الأمامية Forward mutants . ويحصل بعض الاحيان ان تتغير الطفرة الناتجة وتعود الى النمط الطبيعي وعندها تدعى الظاهرة بالرجوع والخلايا بالطفرات الراجعة Reverted mutants او الراجعات Revertants وتكون اما :

1- رجوع حقيقي وفيه تستعيد الخلايا المطفرة توالي النيوكليوتيدات الاصلية أي المشابه للنوع الطبيعي أي ان الطفرة الراجعة تكون مشابهة للخلية او السلالة الام من حيث النمط الجيني والنمط المظهري .

2- قد يكون الرجوع كاذب Pseudoreversion وهذه الخلايا يمكن تمييزها عن الرجوع الحقيقي من ناحية النمط المظهري ، اذ يوجد تغير في الفعالية والتخصص لمواد الأساس ومدى الحساسية للحرارة والمثبطات الكيماوية وتكون لها علاقة بالطفرات المخمدة .

7- الطفرات المخفضة Suppressor mutants : الطفرات التي تغير توالي قواعدها وتعود الى حالة النمط الطبيعي ولكنها تكون مشابهة له على المستوى المظهري ولكن ليس المستوى الجيني أي ان الخلايا تحوي طفرتين ويكون الاخمد على نوعين :

أ- داخل الجين Intragenic suppression أي ان التخميد يكون ضمن الجين نفسه مثل حصول طفرة أمامية تؤدي الى الغاء تأثير الطفرة الاولى ، ولذلك فان طبيعة الطفرة المخفضة وما تنتجه من نواتج الجين وفعاليتها تعتمد على الطفرة الأمامية وكذلك يعتمد على العلاقة بين مكونات السلسلة البيبتيدية الناتجة وقابليتها للانطواء لإنتاج بروتين فعال حيويًا .

ب- قد يكون الاخمد خارج الجين المظهر Extragenic suppression اذ تحدث الطفرة المخفضة في جين آخر وتؤثر على الطفرة الاولى و يمكن ان تؤثر في اخمد طفرات أخرى .
وبعض الطفرات المخفضة الخارجية تكون تكون متخصصة بجينات معينة ، كما ان البعض يتخصص بشفرات معينة وأخرى لها نمط خاص من التخصص .

أنظمة إصلاح DNA

التغيرات التي تحصل في المواد الوراثية قد تؤثر في أكثر من جانب ، فهي قد تكون مميتة للخلايا أو تؤدي الى تغيرات ليست في صالح الخلية ، ولكن قد تكون في صالح الاستعمال لإنتاج المواد ، ومن جهة أخرى فهي تمثل رافدا مهما في عمليات تطوير الأنواع ، وفي الإحياء المجهرية وخاصة الصغيرة مثل البكتيريا التي تمثل أبسط وأصغر الإحياء يجب ان تكون لها أنظمة اصلاح لمادتها الوراثية كفوء جدا وذلك لان الخلايا بدائية النواة تمتلك جينوم فرادني وبالتالي نسخة واحدة من كل جين . واغلب مواده او شفراته فعالة ، ولذلك فأى ضرر يصيب الجينوم يكون ذات نتائج كارثية على الخلايا ان لم تكن مميتة ، ولذا يظهر على الاحياء التطبع لتستمر بالحياة .

وهناك العديد من العوامل البيئية يمكن ان تؤثر على الخلايا ، لعل اهمها هو دخول الخلايا الى طور الاستقرار حيث تزداد الأعداد والفضلات وهذا يؤدي الى ظهور الطفرات ، اضافة الى عوامل بيئية أخرى يمكن ذكر بعضها بشكل مبسط (نظرا لان الموضوع سيناقش في فصول قادمة) .

- الاشعة .
 - الجفاف .
 - التعرض للمواد الكيماوية المؤذية .
 - الحرارة .
 - المضادات الحيوية المستعملة في العلاج او المنتجة في البيئة .
- كلها يؤدي حدوث الاضرار في DNA وبحالات مختلفة وبعض الاحيان تنتج :

1- كسور في احد اشربة DNA وهذه يمكن تلافيها بتأثير الانزيمات اللاحمة وعادة لا تؤدي الى موت الخلايا .

2- إحداث كسور في اشربة DNA المزدوجة وتكون مميتة في اغلب الاحيان ولا يمكن ربطها بالانزيمات اللاحمة لذلك تفكك بالانزيمات المحللة للمواد الوراثية Nucleases .

3- إحداث تغير في القواعد ينتج عن ضرر تأكسدي والذي ينتج ايضا من فعالية الخلايا نفسها مثل عمليات التنفس في الاحياء الهوائية وعادة تكون مميتة لانها تكون بمثابة حواجز امام عملية تضاعف الأشربة عند نقطة الضرر .

اضافة الى تغيرات اخرى ذكر بعضها سابقا (موضوع الطفرات)

لذا فالضرر يتخذ اشكالا مختلفة ، لذلك وجدت انظمة اصلاح مختلفة اضافة الى ان تعدد الانظمة يكون افضل من وجود نظام اصلاح واحد ، وتتسم معظم انظمة الاصلاح بصفات مشتركة وهي التعرف على الضرر او الكشف عنه ، ثم اجراء الاصلاحات اللازمة ويمكن ان يعمل اكثر من نظام اصلاح في التخلص من الضرر الحاصل فمثلا الضرر الحاصل من الأشعة فوق البنفسجية تؤدي الى ارتباطات في الشريط الواحد بتكوين تراكيب حلقية بين البريميدينات وخاصة الثايمين تؤدي الى اضطراب في حلزون DNA وتمنع انزيم كثررة DNAP III (DNA polymerase) من اجراء عملية التضاعف عندما يصل الى منطقة الضرر ويتوقف ، ولكن التوقف يكون آني نظرا لوجود عمليات الاصلاح ومنها :

1- الإصلاح الضوئي Photoreactivation : نظام اصلاح مباشر وفيه يقوم الجين *phr* بالتشفير للانزيم الخاص Deoxyribodipyrimidine photolyase وبمساعدة حامض الفوليك كتمم انزيمي يقوم بالارتباط الى مزدوج الثايمين في الظلام وعند وجود الضوء يمتص حامض الفوليك الضوء المرئي ويستعمل الطاقة لكسر الأواصر بين قواعد الثايمين المرتبطة ثم يترك الانزيم DNA .

2- الإصلاح الاستئصالي Excision repair : نظام اصلاح مباشر ويشارك النظام في اصلاح الضرر الناتج من عدة عوامل ويسمى النظام باصلاح ضرر الأشعة فوق البنفسجية بـ Nucleotide excision repair (NER) وفيه يقوم احد الانزيمات القاطعة الداخلية والذي يسمى Correndonuclease (انزيم القطع الداخلي المصحح) والذي يمكن ان يميز مزدوجات الثايمين ويثلم الشريط عند النهاية 5' . ويتكون الانزيم من عدة وحدات ثانوية هي منتجات الجينات *uvrA* ، *uvrB* ، *uvrC* ، *uvrD* ، والبروتينات الناتجة يتداخل بعضها ليكون جسيم الإصلاح Repairosome .

يرتبط البروتين *uvrA* مع ATP الى DNA عند المنطقة الملوية او المشوهة ، ثم يقوم البروتين *uvrB* بالارتباط للمعقد المتكون والذي يزيد من تخصص المعقد *uvrA-ATP* للـ DNA المشع . اما البروتين *uvrC* فيقوم بقطع شريط DNA في منطقة تبعد حوالي 8 قواعد على يسار (Upstream) منطقة المزدوج البريميديني وكذلك يقطع الشريط على بعد 4 - 5 قواعد من جهة اليمين (Downstream) . اما بروتين *uvrD* والذي هو DNA helicase II (والذي يشابه Dna B المستعمل عند بدء التضاعف) فيقوم بفصل الاشرطة وفك تركيبها الحلزوني لإطلاق القطعة التي تتكون من حوالي 12-13 زوج قاعدة . ثم يقوم بعد ذلك DNAPI وغيره من الانزيمات بمليء الفجوة بالاتجاه 5' الى 3' ثم لحمها . وفي حالة عدم الاصلاح فان DNAPIII يبدأ بمضاعفة اشرطة DNA بعد منطقة الضرر تاركا منطقة مصابة التي قد تصل الى حوالي 800 زوج من القواعد ويطلق عليها عبور الاصابة Translesion وعندها تغطي منطقة الإصابة او الفجوة ببروتينات RecA التي تغطي اشرطة DNA المفردة الى حين قيام انظمة اخرى مثل اصلاح التآشب Recombination repair والتي تتم بعد التضاعف لذلك تكون الطفرات الخالية من الجين *recA* حساسة جدا للأشعة فوق البنفسجية وهذا التصحيح او الاصلاح هو جزء من نظام SOS .

ومن انظمة الاصلاح الاخرى ومنها :

• **Ap repair system** : ويقوم باجراء الاصلاح على DNA الذي ازيلت منه قاعدة بيورينية بواسطة الانزيمات ، والانزيمات العاملة في هذا النظام تسمى Ap endonucleases ، والصنف الاول منها يثلم DNA عند النهاية 3' للموقع الذي فيه ضرر ، والصنف الثاني يفلق الطرف 5' . وتزيل قطعة صغيرة من DNA ثم يقوم الانزيم DNAPI بمليء الفجوة والانزيم اللاحم Ligase يلحم القطعة الجديدة مع باقي الشريط . وهناك انزيمات متخصصة فمثلا Uracil-DNA glycosylase يقوم بإزالة قاعدة اليوراسيل من DNA وذلك بفلق الاصرة بين السكر والنتروجين لازالة القاعدة .

• **نظام اصلاح عدم التلاؤم (MMR) Mismatch repair system** : ويكون النظام مسئولاً عن عدد كبير من عمليات الاصلاح التي تعقب التضاعف ، ويساهم بشكل كبير في عمليات التطور (كما سيأتي ذكره لاحقاً) ويتكون النظام من عدة جينات *mut S* و *mut L* و *mut H* و *mut U* التي تشارك نواتجها في عمليات الاصلاح . *mut* اشتقت من *mutator* لانه عند حصول طفرات في جينات النظام فان الخلايا تعاني من زيادة في مستوى الطفرات التلقائية . ويلعب النظام دوراً هاماً في حياة الخلايا والاحياء التي يوجد فيها والتي تمتد من البكتريا الى الاحياء الراقية مثل اللبائن . فهو يساعد في العديد من العمليات منها :

1- تجنب حصول الطفرات في الخلايا .

2- يساعد في اعادة ترتيب الجينوم .

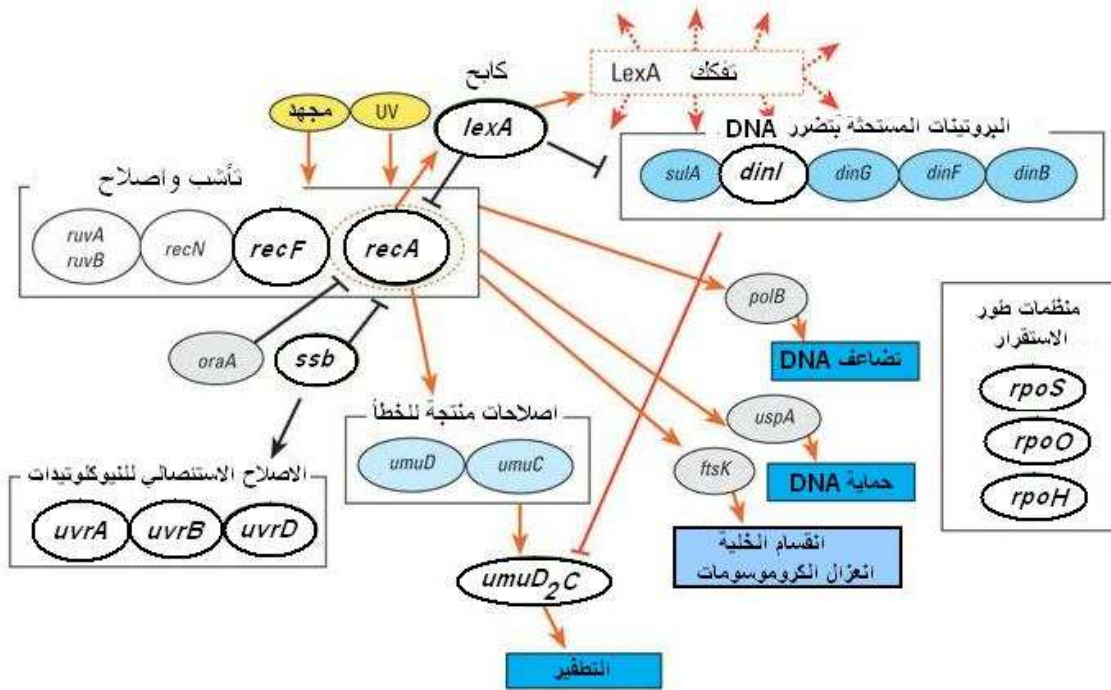
3- ينظم انتقال الجينات الافقي بين الانواع .

4- يساعد في منع تطور السرطانات في الاحياء الراقية .

وتتم فعالياته بعدة خطوات ، تبدأ بتمييز والتعرف على المناطق التي أدخلت فيها القاعدة غير الصحيحة ثم استئصالها واستبدالها بواحدة صحيحة . وعملية التمييز تعتمد على مثيلة أشرطة DNA الجديدة التي يقوم بها الإنزيم DNA methylase الذي يشفر له بالجين *dam* ، والإنزيم يقوم بمثيلة التوالي 5'-GATC-3' عند القاعدة الأدينين ، ولذلك تقوم منتجات الجينات *mut S* ، *mut L* بالتعرف على حدوث الخطأ . أما ناتج الجين *mut H* فيتم شريط DNA الجديد على جانبي منطقة عدم التوافق أو التطابق في حين يقوم ناتج الجين *mut U* وهو DNA helicase II (الذي يسمى أيضا جين *uvr D*) بفك التواء أشرطة DNA المزدوجة مطلقا المنطقة المتلومة ثم تملأ الفجوة بفعالية DNAPI والإنزيمات اللاحقة .

نظام SOS :

أو ما يسمى بنظام الاستغاثة (Save Our Souls) ويكون بمثابة منظم كبير SOS regulon يستجيب للضرر الذي يحصل في DNA وتعد الاستجابة من النوع العام Global transcriptional response وتؤدي الى حث ما يقرب من 20 جين تعمل في مسارات مختلفة من مسارات اصلاح DNA والموضحة في الشكل (25) .



شكل 25 : نظام الاستغاثة SOS

وتحصل استجابة الاستغاثة عندما يحصل ضرر DNA يفوق قابلية الخلايا للإصلاح بواسطة الانظمة الاخرى وعند تجمع DNA غير المصحح في الخلايا . وتكون الاستجابة مرافقة الى حث مجموعة من الاستجابات الفسلجية . ويساعد النظام الذي درس في *E. coli* بشكل مفصل في حصول عمليات اصلاح التأشب وكذلك الإصلاح الاستئصالي وفي الوقت نفسه يشجع ظهور الطفرات نظرا لكون عمليات الاصلاح من نوع المرافقة للأخطاء ، فمثلا عند التعرض للأشعة فوق البنفسجية وحدثت عمليات الاصلاح الضوئي او الاستئصالي او بعد التضاعف فمعظمها لا تؤدي الى حدوث الطفرات ولكن اشتراك نظام الاستغاثة يساعد على حدوث الطفرات ويكون مرافقا لتوقف الانقسام مؤديا الى انتاج خلايا بشكل خيوط .

ويوجد منتجان من جينات النظام وهما بروتين التأشب RecA الذي يعمل حاثا للنظام وبروتين التأشب له وظائف متعددة اضافة الى عمله في تصحيح DNA فهو يقوم بقدر او بدأ الفعاليات المحللة للبروتينات الداخلية في الخلية . والبروتين الاخر هو LexA الذي يعمل كابحا للنظام ، والجينات في النظام تحوي على SOS box يرتبط به البروتين الكابح والبروتين الاخير يكون من البروتينات ذات التنظيم الذاتي . والاحداث المحفزة للنظام هي وجود اشرطة مفردة من DNA ، ويكون التحسس ببروتين التأشب مؤثرا على الكابح الذي يعاني من التحلل الذاتي ويصبح غير قادرا على الارتباط بالجينات العاملة في النظام ويصبح بالامكان قرائتها وانتاج البروتينات . ويقوم النظام بتصحيح DNA المتضرر بعدة طرق :

1-يقوم النظام بتغطية المنطقة المتضررة اثناء عمليات التضاعف ، ثم بعد ذلك يتم التعامل مع هذه المنطقة في الأشرطة الأبوية بواسطة الإصلاح التأشبي والاصلاح بعد التضاعف Postreplicative repair .

2- عملية اصلاح تتجاهل قاعدة ازدواج القواعد المعروفة في اشرطة DNA وهذه تسمى التصحيح المولد للأخطاء Error –prone repair (Translesion DNA synthesis) وقد تؤدي الى حصول على شفرات غير حساسة Non sense codon وانتاج بروتين غير فعال نتيجة لوجود حامض او حوامض امينية بشكل خاطئ . ويحوي النظام على جينات اخرى كما موضح في الشكل ، هي *SulB* و *SulA* التي تنشط وتعمل على منع انقسام الخلايا لإعطاء وقت كافي لإصلاح الضرر في DNA قبل بدء التضاعف . وحدثت الطفرات بعد عمل نظام الاستغاثة يعود الى سرعة عمليات التضاعف وقلة قابلية وفعالية Proof reading ، ولكن مع هذا يلاحظ ان الخلايا التي لا تحوي على نظام الاستغاثة او كونه معطلا بالطفرات فان الخلايا تموت عند تعرضها للعوامل المدمرة لموادها الوراثية .

واثناء عمل نظام الاستغاثة يلاحظ ان بروتين التأسب يمكن ان يؤثر على كايح العائيات الاولى المرتبطة بكروموسومات الخلايا مؤديا ذلك الى إلغاء حالة الاستذابة ودخول العائي دورة التحلل ، وبعد إجراء عمليات التصليح فان بروتين التأسب لا يقوم بحث البروتين الكايح الذي لا يتحلل ويتجمع في الخلية ليعود لغلق الجينات العاملة في نظام الاستغاثة . وهناك عدة عوامل تؤثر في حث النظام منها قلة المواد الغذائية او ارتفاع الضغط التناظفي حول الخلايا وبعضها يمكن ان يجعل الاستجابة سريعة وتصل أقصا حالاتها بعد حوالي 30 دقيقة . اضافة الى وجود ظروف اخرى منها معاملة الخلايا ببعض المضادات الحيوية والإجهاد الحراري ويتم ذلك في الخلايا التي تقوم بالتنفس الهوائي اذ يتوقف حثه تحت ظروف تنفس النترات ويعود حثه عند عودة الظروف الهوائية . ومن الملاحظ ان المواد السامة للمواد الوراثية في الاحياء حقيقية النواة الراقية تحت الاستجابة في البكتريا وهذه العلاقة هي الأساس في العديد من الفحوص لاختبار قابلية المواد للتطير والتسرطن على غرار اختبار ايمس Ames test . وفي هذه الحالة يستخدم الاختبار اللوني SOS - chromo test .

واستجابة الاستغاثة في البكتريا الاخرى تكون متشابهة في الاساسيات لما ذكر اعلاه مع بعض الاختلافات فمثلا في *B. subtilis* فان النظام يؤدي الى حث ظاهرة التأهل Competence في الخلايا عند عدم وجود ضرر في DNA ويكون البروتين الكايح هو البروتين DinR ناتج الجين *din* ويرتبط بمنطقة المشغل للنظام SOS operator .

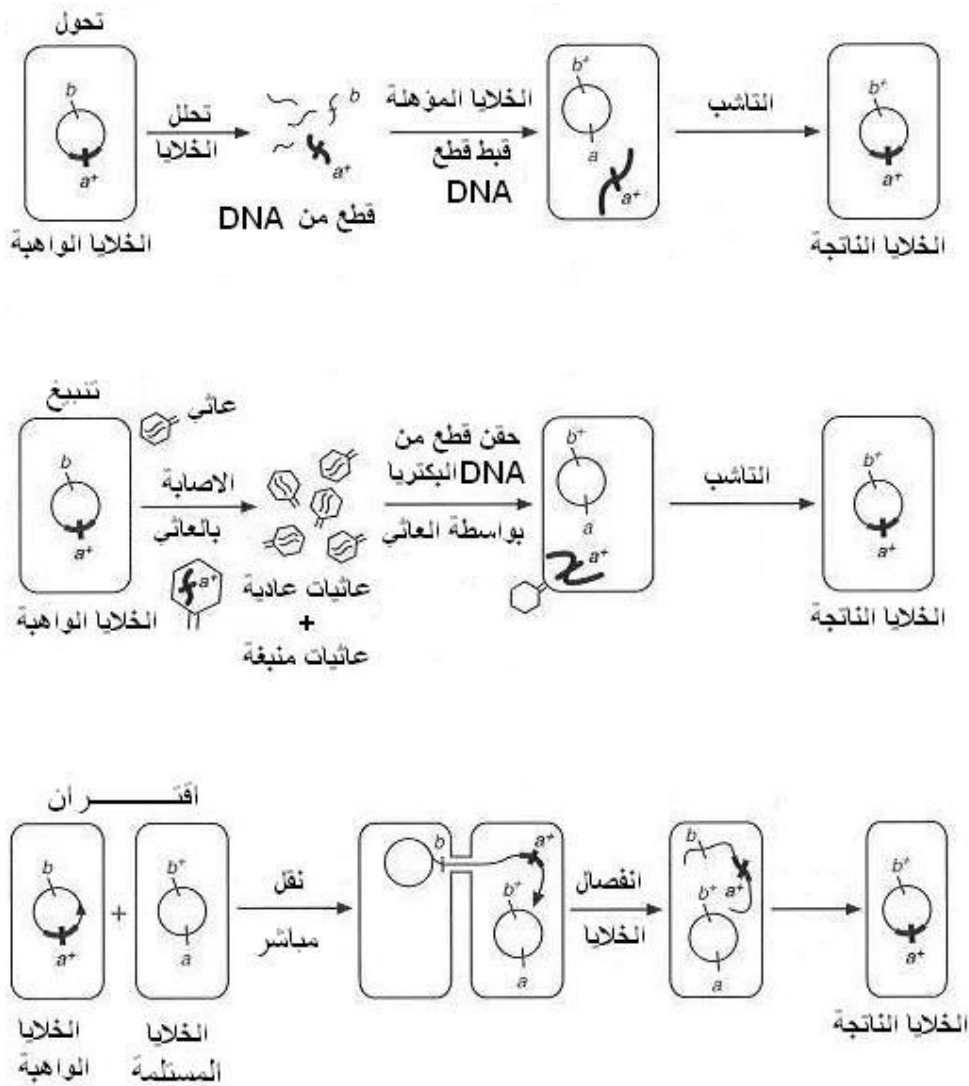
طرق انتقال الصفات الوراثية

تنتقل الصفات الوراثية في الاحياء بنوعين من الانتقال العمودي وهو توارث المواد الوراثية من الآباء الى الأبناء بواسطة تضاعف المادة الوراثية للخلايا الأبوية ثم توزيعها على الخلايا الناتجة الذي يكون متساويا لذلك تظهر الخلايا البنيوية بنمط مذهري مشابه لآبائها . والطريق الثاني هو الانتقال الأفقي او الانتقال الجانبي Lateral gene transfer (LGT) وهو المستعمل في الهندسة الوراثية وتحسين السلالات . والانتقال الجانبي او الأفقي يمكن ان يحصل طبيعيا بين الاحياء . وسواء كان الانتقال عموديا او بشكل افقي في الحالات الطبيعية فانه بالاضافة الى ضرورته في انتاج احياء جديدة فانه يزيد من احتمالية الطفرات النادرة وتجمعها في كائن واحد ليزيد تحت الضغط الانتخابي او الانتخاب الطبيعي تحت ظروف لا تلاؤم الآباء .

ان الانتقال الأفقي والتداخل بين الاحياء المجهرية يساعد في تطور الاحياء بسرعة اكبر من اعتماد الاحياء على حدوث الطفرات لوحدها . وهذه تكون ذات اوجه فبالنسبة للخلايا تعد مهمة كي تتلاءم مع بيئتها وبالنسبة للانسان تكون هذه ذات اوجه ايضا فبواسطتها يمكن الحصول على احياء كفوءة في مجالات الانتاج الحيوي ولكن في المجال الطبي تكون كارثية ، فان تبادل المعلومات

الوراثية او حصول اعادة ترتيب جينومات الاحياء ادى الى ظهور وانتشار البلازميدات والقافزات المسؤولة عن مقاومة الأدوية والمضادات الحيوية على وجه الخصوص المستعملة في علاج الأمراض الناتجة عن الإصابات كما ادت الى زيادة ضراوة بعض الممرضات مثل تغاير طور المستضدات السوطية في *Salmonella* او تغير المستضدات السطحية للبكتريا *Neisseria* و *Borrelia* .

وعمليات تبادل المعلومات الوراثية في الخلايا بدائية النواة التي قد يستعار بعضها للاستعمال في الخلايا حقيقية النواة قد يؤدي الى إحلال أليل Allele او نسخة الخلايا الواهبة مكان جين الخلايا المستلمة ، وتتم العمليات بإحدى الطرق : وهي التحول Transformation والتنبيع Transduction والاقتران Conjugation والموضحة في الشكل (26)



شكل 26 : طرق انتقال المعلومات الوراثية في البكتريا

ونظرا لكون DNA الخلايا الواهبة لا يمكنه الاستمرار على البقاء في الخلايا المستلمة (في بعض الاحياء) الا ان يكون جزءا من متضاعف لذلك فحصول التأشب لقطع DNA الداخلة مع جينوم الخلايا المستلمة يكون ضروريا لانتاج جين ثابت ، والحقيقة ان عملية التأشب تحصل بكفاءة عند تكون الخلايا الواهبة والمستلمة من النوع نفسه او من انواع متقاربة نظرا لتأثير نظام الاصلاح MMR (المار الذكر) ولا تحصل عملية انتاج جينوم ثابتة الا بعد مدة ، اذ ان الكشف عن الخلايا المتأشبة و التي حصل تغير في مادتها الوراثية تكون بنمط مذهري يختلف عن الخلايا الواهبة والمستلمة وهذا يعني ان الخلايا يجب ان تنمو وتنقسم وهذه المدة توصف بتلكؤ الانعزال Segregation lag التي يتبعها تلكؤ النمط المظهري Phenotypic lag وبعد المرور بهذه الأطوار يمكن الكشف عن الخلايا المستلمة التي نجحت في استلام قطع من DNA الخارجي . ولذلك تربط المواد الوراثية او الجينات من الخلايا الواهبة الى جينات اعلان Reporter gene للاستدلال على عمليات نجاح نقلها . ومن الجدير بالذكر ان العديد من البكتريا تملك أنظمة للتقطيع والتحوير Restriction modification systems التي تتكون من انزيمات تحوير تقوم بمثيلة الادنين والسيتوزين في تواليات محددة من DNA اما انزيمات القطع مثل انزيمات القطع الداخلي التي تقوم بفلق DNA الغريب الذي لا يحوي على مثل هذه التحويرات في التواليات المحددة والخاصة ، اضافة الى ان بعض انزيمات القطع يمكن ان تقطع حتى DNA الحاوي على مجاميع المثل .

ان هذه الأنظمة قد تكون نشأت في البكتريا لحمايتها من غزو العاثيات والبلازميدات هي تشكل حاجزا وراثيا مهما امام عمليات التبادل الوراثي بين السلالات والانواع . ويمكن ان توجد الانظمة على البلازميدات Plasmid borne RM systems والتي تبقى في الخلايا لحمايتها وذلك لان فقد البلازميدات وسائلها الدفاعية يمكن ان يؤدي الى قتل الخلايا بالمواد المنقولة اليها .

التحول Transformation

العملية تكون خارج الكائن الحي *In vitro* وتحدث في الطبيعة او في المختبر حيث تتحلل الخلايا الواهبة لتحرر قطع من جينومها يمكن ان تقبض من قبل الخلايا المستلمة من البيئة الخارجية ، والخلايا التي تقوم بهذه المهمة هي الخلايا المؤهلة Competent cells ويمكن ان تكون العملية ناجحة عند نقل حوالي 500 نيوكلوتيد على الاقل وتصبح القطع جزءا صغيرا من جينوم الخلايا المستلمة ، ومثل هذه القطع تكون ايضا جزءا من جينوم الخلايا الواهبة لذلك فان النقل المترافق للجينات البعيدة عن بعضها فير الموقع يكون قليل الاحتمال لصغر القطع المنقولة الا اذا كانت الجينات متجاورة ويمكن احتواءها في القطع المنقولة .

وقد اكتشفت عملية التحول في بكتريا *Streptococcus pneumoniae* وعدت اول دليل على تبادل المعلومات الأفقي او الجانبي ثم وجدت في عدد من بكتريا مثل *Haemophilus* و *Neisseria*

و *Staphylococcus* و *Bacillus* والخلايا التي تستطيع قبط قطع DNA يكون ضمن ظاهرة التأهل Competence والتي تعتمد على الحالة الفسلجية للخلايا . ويمكن تحويل الخلايا غير المؤهلة الى مؤهلة في المختبر بمعاملتها بما يسمى بصدمة الكالسيوم وهي حضان الخلايا لمدة طويلة في محلول كلوريد الكالسيوم ، او معاملة الخلايا بمركب Dimethyl sulfoxide (DMSO) او اضافة مركب متعدد الاثيلين Polyethylene glycol للتخفيف من الشحنات السالبة على سطوح الخلايا . او حثها بالتعريض لنبضات عالية الفولتية أي التنقيب الكهربائي Electroporation ولكن مع هذا يمكن ان توجد بعض السلالات المهمة من النواحي الصناعية والبيئية والسريرية لا يمكن ان تحول الى خلايا مؤهلة لقبط المواد الوراثية الخارجية . اما الخلايا المؤهلة طبيعية مثل *Neisseria* و *Haemophilus* وغيرها فيعتمد قبط DNA على وجود توالي قليل العدد من النيوكليوتيدات في DNA ، وفي احياء اخرى لا يكون القبط معتمدا على وجود هذه التواليات .

وتستطيع الخلايا المؤهلة قبط جينوم كامل لبعض العاثيات وتعرف هذه الحالة Transfection أي التحول بالفيروسات . كما يمكن للخلايا قبط البلازميدات التي يمكن ان تتضاعف في الخلايا بشكل مستقل عن كروموسوم الخلايا .

التنبيغ Transduction

طريقة تتم داخل الأنظمة الحية *In vivo* أي أن قطع DNA لا تتعرض للبيئة الخارجية . وتنقل قطع DNA بواسطة العاثيات التي تعمل كنواقل من الخلايا الواهبة الى الخلايا المستلمة عند إصابتها . وتقسم عملية التنبيغ الى نوعين اعتمادا على الجينات التي تنقلها :

1- التنبيغ العام : وفيه تقوم العاثيات التي تستطيع القيام بعملية التنبيغ Transducing phages بنقل جينات غير محددة . فبعد اصابة العاثي للخلايا وتضاعفه وتجميع مواد الوراثية في الأغلفة البروتينية الخاصة به يمكن ان تنتج بعض الجزيئات (وهي نسبة قليلة) تحوي على قطع من الجينوم البكتيري من مناطق مختلفة بدلا من المواد الوراثية العائدة للعاثي لذلك فان العاثيات الناتجة يمكن ان تحمل جين او مجموعة من الجينات القريبة من بعضها من جينوم الخلايا المضيفة المتحللة وذلك يعني ان أي قطعة من جينوم الخلايا المضيفة معرض للانتقال بدرجة متقاربة الاحتمالية .

2- التنبيغ المتخصص : وتنقل جينات محددة ويختلف عن التنبيغ العام من عدة نواحي :

- انه يتم بواسطة عاثيات خاصة وأكثرها من العاثيات المعتدلة .
- عدد قليل من جينات الخلايا الواهبة يمكن ان تنتقل الى الخلايا المستلمة .
- عاثيات التنبيغ الخاص توجد فقط في الخلايا الواهبة التي تعاني من ظاهرة الاستذابة أي الخلايا المستذابة والتي عند دخولها دورة التحلل تطلق العاثيات الجديدة .

وعائيات التنبيغ الخاص نادرا ما تعاني عمليات التأشب وذلك لانها تعاني من نقص في جينومها العادي واحتواءها على جزء من جينوم البكتيريا الذي يمثل الجزء المجاور للموقع التي ارتبط اليه العائى . ومعظم هذه العائيات تكون ناقصة لا يمكن ان تكمل دورة التحلل لنمو العائى في الخلايا المصابة الا اذا كان هناك عائى مساعد Helper phages لتزويدها بالوظائف التي تنقصها . وتتشابه عمليات التحول بالعائى Phage conversation والتنبيغ المتخصص ولكن الجينات في الظاهرة الاولى تكون غير معروفة الاصل . وبالرغم من ان حدوث عمليات التنبيغ تتم دون تعرض الجزيئات المنقولة للبيئات الخارجية .

الا انه ليس كل العمليات ناجحة اذ ان عمليات التنبيغ المجهض Abortive transduction والذي يحدث في الخلايا غير المتاحة يمكن ان يزداد بنسبة 1 - 2 ضعف عمليات التنبيغ الكامل . وتطيع الخلايا المستلمة القيام بعملية التعبير العابر عن ما استلمته من المواد الوراثية دون حصول تأشب وربط للعائيات بالمتضاعفات في الخلايا وهو ما يحصل في حالة التنبيغ الكامل ، الذي يؤدي الى تكوين تأشب ثابت يسمح للتعبير عن الجينات القادمة بالثبات والتوارث . اما في حالة التنبيغ المجهض فان القطع لا تتضاعف وتبقى في خلية واحدة وعند انقسامها فانها تتخفف الى حد لا يمكن ملاحظة النمط المظهري للخلايا الواهة ضمن مجموع الخلايا المستلمة .

الاقتران Conjunction

طريقة من طرق نقل المعلومات الوراثية داخل الانظمة الحية وتحصل عند تلامس الخلايا الواهة والخلايا المستلمة وتكوين جسور سايتوبلازمية بينهم ويتم نقل جزء من جينوم الخلايا الواهة او كله وتتميز الخلايا الواهة باحتوائها على البلازميدات الاقترانية وتسمى البلازميدات الجنسية ومنها بلازميد الخصوبة F factor او يسمى F plasmid (المار الذكر) الذي يوجد بكثرة في الخلايا السالبة لصبغة كرام مثل *E. coli* وتكون الخلايا الواهة F^+ اما الخلايا المستلمة F^- . وتحتوي البلازميدات الاقترانية اضافة الى نقطة تضاعف على عدد من الجينات الاخرى مثل *tra* وغيرها مثل :

1- جينات لتخليق الشعيرات الجنسية التي تعمل ايضا كمستلمات لعائيات خاصة .

2- جينات تعمل في نقل DNA اثناء التزاوج او الاقتران .

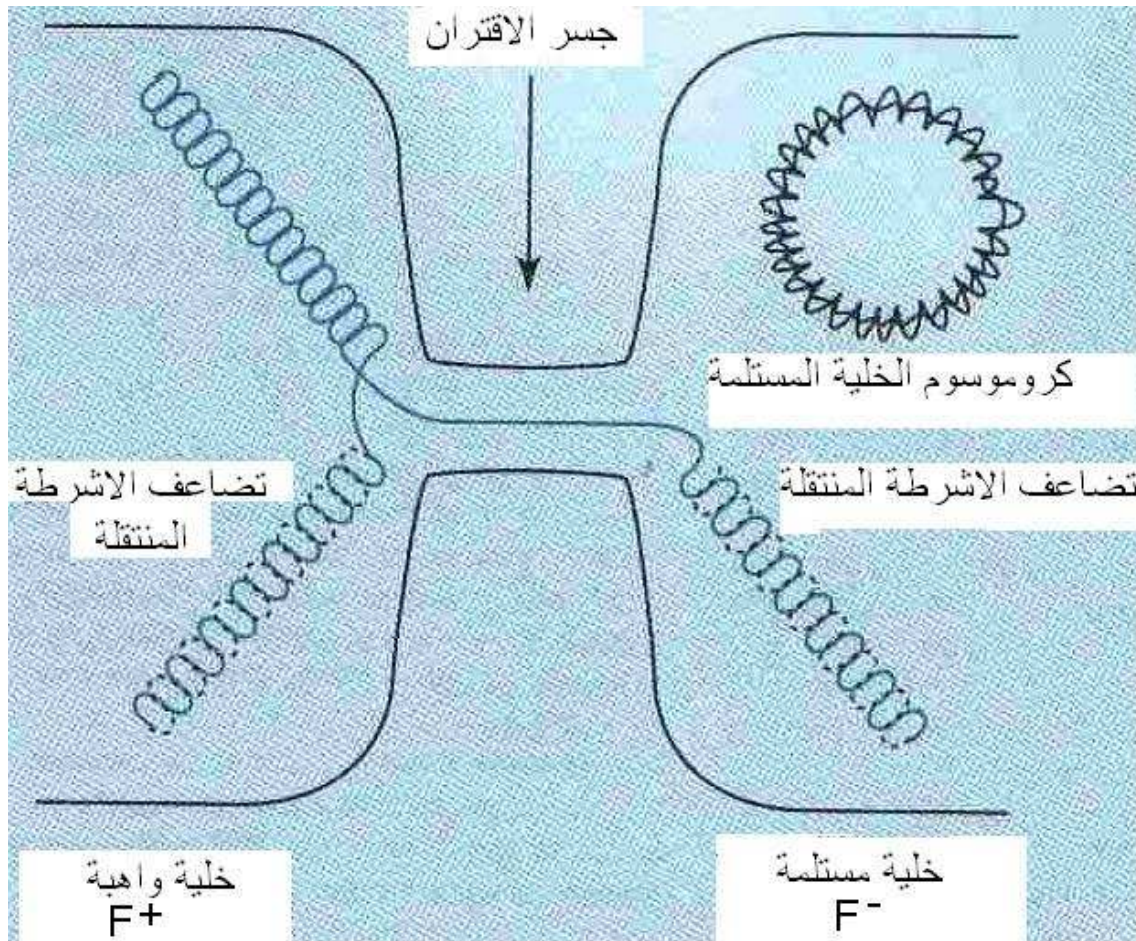
3- جينات لعملية التداخل مع الخلايا المستلمة .

وجينات تشفر لوظائف اخرى .

وكل خلية واهبة تحوي على 1- 3 من الشعيرات الجنسية ترتبط الى بروتين خاص في الأغشية الخارجية للخلايا المستلمة وهو بروتين ناتج من الجين *Omp A* لبدء عملية التزاوج حيث تتكون الجسور بينها وتنقل شريط مفرد من DNA البلازميد كما موضح في الشكل (27) .

وينتقل الشريط من اصل محدد ويستمر بالاتجاه من 5' الى 3' . والشريط المفرد في الخلايا المستلمة يتم تضاعفه لتكوين اشربة DNA مزدوجة اما الاشربة المفردة التي بقيت في الخلايا الواهبة فيتم مضاعفها لتكوين اشربة DNA مزدوجة ايضا . والبلازميد المنقول يمكن ان يعمل كعنصر وراثي مستقل ويتضاعف بشكل غير معتمد على كروموسوم الخلية او يندمج مع الكروموسوم ، والذي يكون معه جزيئة حلقيه كبيرة . ويتم تسهيل عمليات ارتباط البلازميد مع الكروموسوم بوجود تواليات الاقحام IS التي تكون موجودة على الكروموسوم وكذلك على البلازميد ويحصل تأشب متجانس بينهما عبر هذه التواليات وتختلف مواقع هذه التواليات في السلالات المختلفة في النوع الواحد كما في حالة *E. coli* .

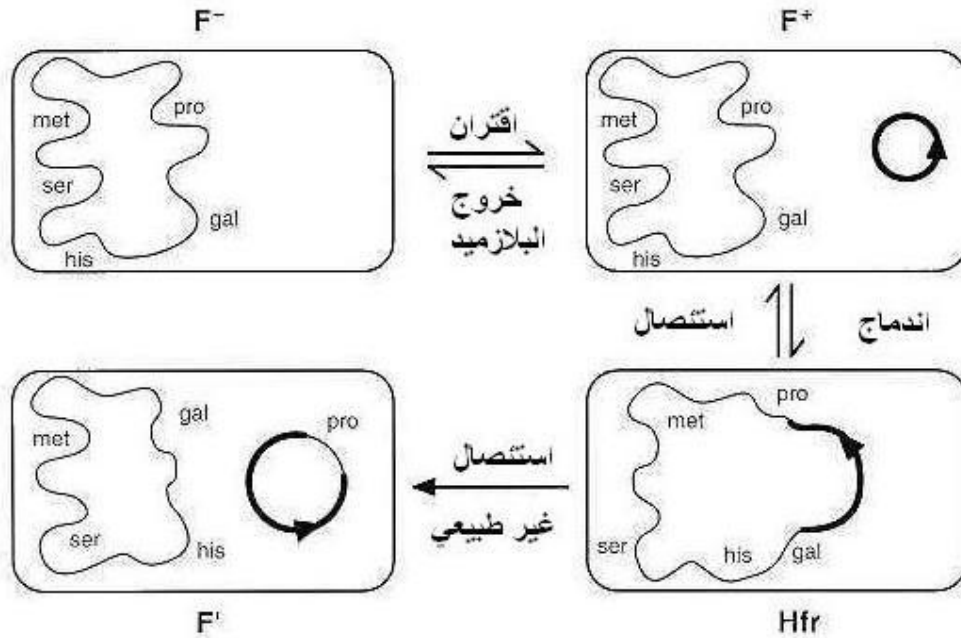
والخلايا المستلمة بعد دخول البلازميد اليها تصبح خلايا واهبة ولها القابلية على بدء التزاوج الاقتراني .



شكل 27 : طريقة الاقتران بين الخلايا البكتيرية

ان عملية الاندماج بين الكروموسوم والبلازميد يؤدي الى تكوين سلالات Hfr (High frequency recombination) والشكل التالي (شكل 28) يوضح هذه السلالات في *E. coli* .

وعند حصول استئصال غير طبيعي للبلازميد F فانه يكون F' plasmid الذي يحوي جزءا من كروموسوم الخلية كما موضح في الشكل ويمكن ان تحدث الحالة العكس اذ يمكن ان تبقى بعض الجينات البلازميدية في كروموسوم الخلية كما يحصل مع بلازميد المقاومة R plasmid وينتج R' ان سلالات Hfr تستطيع ان تنقل كروموسوم الخلية الى الخلايا المستلمة بكفاءة عالية ونقل شريط مفرد من الخلايا Hfr الى خلايا مستلمة يبدأ من منطقة اصل تضاعف البلازميد ويستمر الى النهاية أي يتم نقل جريئة كبيرة من الحلقة الهجينة المكونة من كروموسوم الخلية والبلازميد وعملية النقل الكاملة تحتاج الى حوالي 100 دقيقة . ومن التحري عن اول الجينات الكروموسومية التي تنقل وقطبية انتقال الكروموسوم يمكن تحديد موقع اندماج البلازميد وترتيبه بالنسبة للكروموسوم .



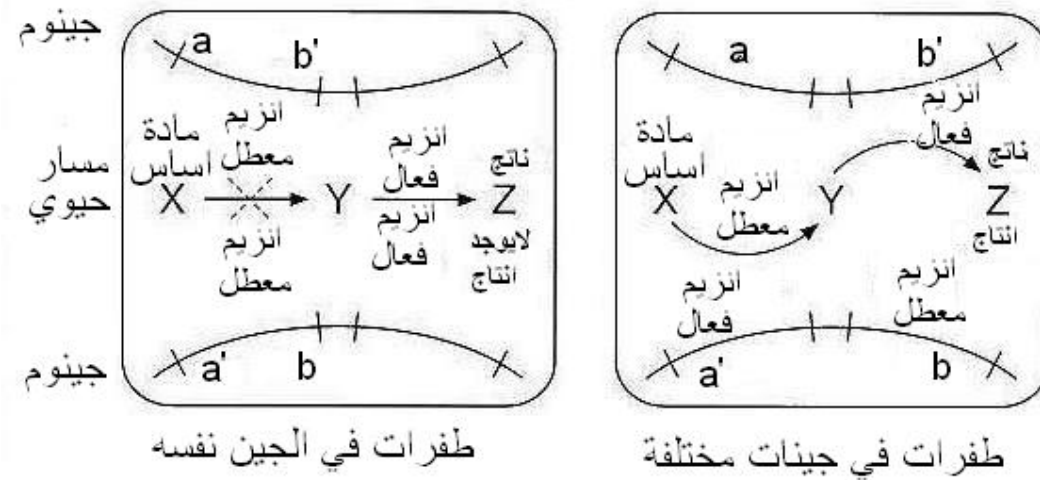
شكل 28 : تكون سلالات Hfr و F' في *E. coli*

ومن تحليل الارتباط الكمي أمكن وضع الخرائط الكروموسومية الجينية والخرائط الطبيعية التي تستعمل في تحليل العناصر غير الكروموسومية مثل البلازميدات والعائيات . اهم الطرق المستعملة في ذلك هي عملية الاقتران وذلك لان الخلايا المقترنة يمكن ان تنفصل تلقائيا بعد مدة لذا ينقل جزء من كروموسوم الخلية الواهبة ، وفي المدة الاولى يكون من غير المحتمل نقل الجينات بعيدة عن نقطة الاصل ، كما ان ايقاف الاقتران يمكن ان يحدث عمليا وذلك برج الخلايا بشدة وبأوقات يتم اختيارها . ومن تحليل صفات الافراد الناتجة وتحديد تعبيرها عن جينات الخلايا الواهبة بالتتابع الزمني يمكن

رسم الخرائط الكروموسومية . ويكون من المفيد ان تجري عملية الاقتران بين سلالات Hfr مع خلايا F^- ، لان اقتران F^+ مع F^- ينتقل البلازميد فقط والذي ينتشر في المجموع البكتيري .
ان كل من R' و F' والعائيات في حالة التنبيغ المتخصص وغيرها من المتضاعفات المهجنة تحمل جزء من كروموسوم الخلية وعند ادخالها تؤدي الى وجود منطقة متضاعفة جزئياً مع كروموسوم الخلية التي يحتاجها فحص التكامل Complement test الذي يستعمل في الكشف عن الطفرات هل هي في جين واحد ام جينات مختلفة .

فحص التكامل Complementation test

فحص يستعمل في تحديد موقع الطفرات في الجين الواحد او في جينات مختلفة ويتم ذلك باستعمال سلالات يكون فيها الكروموسوم مزدوج جزئياً كما هو مذكور اعلاه . وهذا يعني وجود نسختين من الجين في البكتريا الواحدة . وفي الفحص تؤخذ نوعين من الطفرات كما موضح في الشكل 29 الاولى a^+b^- والثانية a^-b^+ وهذه الجينات تعمل في تحويل مادة X الى Z مروراً بالمركب Y وعليه فان الطفرتين غير قادرة على تحويل المادة X الى الناتج النهائي Z ، وعند جمعهم فاذا كانت الطفرات كل واحدة في جين فان الخلايا ستؤدي الفعالية الحيوية وهذا يشير الى ان الطفرات على جينات مختلفة وهي موضحة في الشكل (29) .



شكل 29: فحص التكامل

الاقتران في البكتريا الموجبة لصبغة كرام

يحدث الاقتران في هذه المجموعة بشكل يختلف عن ذاك الذي يحصل في البكتريا السالبة لصبغة كرام . وفي هذه الحالة تنتج الخلايا الواهبة اللاصقات التي تساعد على تجمعها مع الخلايا المستلمة ، لان هذه الخلايا لا تحوي على الشعيرات الجنسية وفي بعض الانواع الجنس Streptococcus تفرز

الخلايا مواد فرمونية Extracellular sex pheromones تؤدي الى تحفيز الخلايا الحاوية على البلازميدات الاقترانية ان تصبح خلايا واهبة . والبلازميد الاقتراني يمنع الخلايا التي يوجد فيها (اي الخلايا التي ستتحول الى خلايا واهبة) من تكوين فرمونات مشابهة او نظيره .

الهندسة الوراثية

اول عمليات الهندسة الوراثية الطبيعية التي لوحظت هو انتقال T-DNA من البكتريا *Ag. tumefaciens* الى النباتات متخطية ليس الانواع وانما ممالك الحياة . وتعد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية ضمن النشاطات البشرية بمثابة توائم سيامية لا يمكن ان يفترقا فالهندسة الوراثية هي التي كانت المحرك الأساسي في وجود التقنيات الحيوية الجديدة ، كما ان الاخيرة هي المجال التي تجد الهندسة الوراثية المجال الاوسع للتطبيق . فعمليات التصنيع الحيوي هي المحك لاستعمال الاحياء المحورة ، لذلك يلاحظ ان المجالات المهمة هي التي نشطت فيها دراسات الهندسة الوراثية وتأتي الجوانب الطبية والبيئية في المقدمة ثم تليها الجوانب الاخرى .

وتعتمد الهندسة الوراثية الى تحويل وتعديل المواد الوراثية التي يترتب عليها تغير أداء الاحياء عند انتقالها لمرحلة التعبير المظهري ، واغلب العمليات تهدف الى ادخال جينات ذات صفات مرغوبة في احياء مضيضة يفضل ان تكون معروفة الخلفية الوراثية لتشكل مجالا لحدس التغيرات المتوقعة وكذلك تسهل متابعة التعبير الجيني في تحديد النمط المظهري للخلايا الناتجة . وتشمل عملية كلونة الجينات Gene cloning (الهندسة الوراثية) خطوات رئيسة هي :

1- الحصول على الجينات المرغوبة التي يمكن ان تحضر باكثر من طريقة ولكن الانزيمية هي المفضلة .

2- ربط القطع المطلوبة الى متضاعفات او نواقل ملائمة لانتاج الناقل المجهن

Hybrid replicon او Hybrid vector ويسمى اسضا Chimeric vector .

3- استعمال خلايا مضيضة لتكثير النواقل الهجينة قبل الاستعمال واغلب الاحيان تكون بكتريا *E. coli* نظرا لمعرفة الخلفية الوراثية لهذه البكتريا ولكونها كائن سريع النمو ولسهولة التعامل معها .

4- إدخال النواقل المحملة بالجينات المطلوبة الى الخلايا المستهدفة لإجراء التحويل عليها او يكتفي بالخطوة الثالثة اذا كانت العملية تهدف انتاج مادة معينة يمكن إنتاجها في *E. coli* او أي خلية مضيضة اخرى .

5- الكشف عن الخلايا التي التقطت الجين المطلوب .

الخطوة الاولى : وتتضمن تحضير قطع من DNA ومثلما ذكر اعلاه ان الطرق الإنزيمية هي الأفضل وتتم بواسطة الانزيمات ومنها :

أنزيمات القطع Restriction enzymes وهي الاساس في الحصول على قطع DNA المطلوبة وهناك انزيمات اخرى تشارك في عمليات الكلونة في خطوات اخرى ومنها الانزيمات المحورة لكل من DNA و RNA وكذلك الانزيمات اللاحمة .

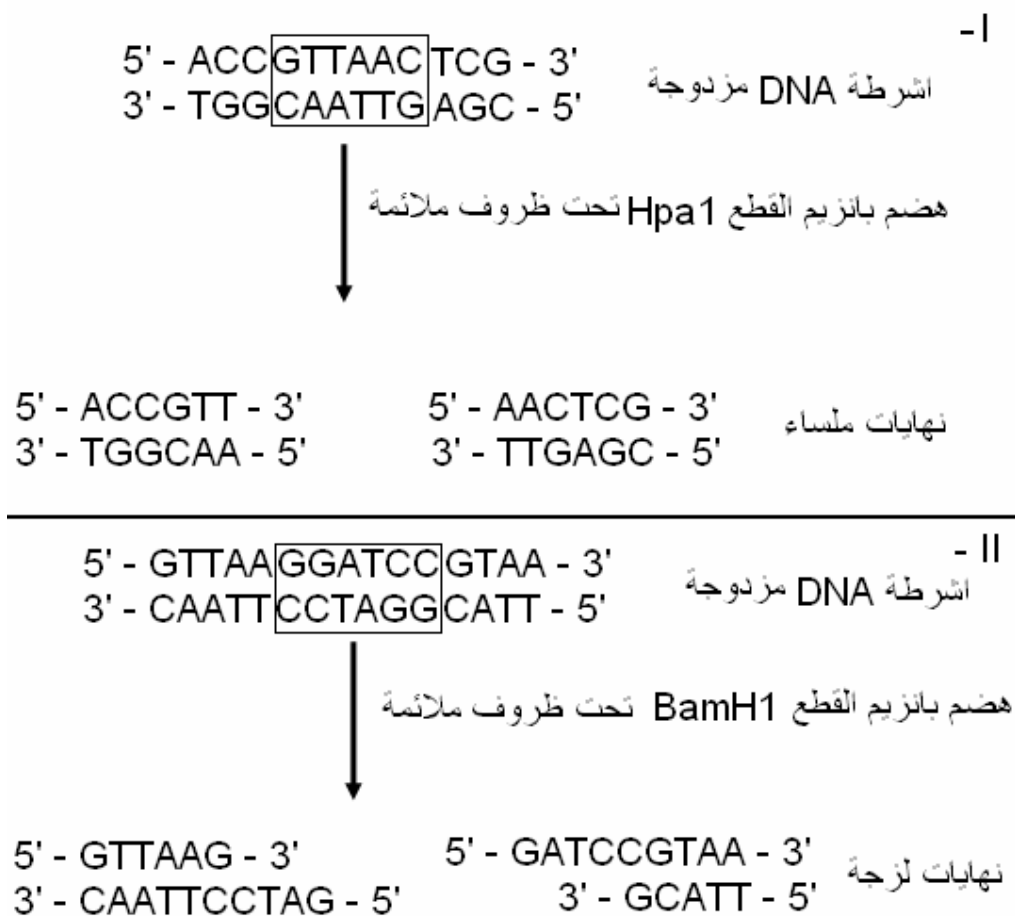
ولكن في الخطوة الاولى تكون انزيمات القطع هي المهمة وهي من DNAases التي تستطيع تمييز توالي معين من النيوكليوتيدات في اشرطة DNA ثم تفلق الجريئة في موضع التعرف او موضع مجاور له . وتقسم الانزيمات الى ثلاث اقسام I ، II ، III ، الصنف الاول والثالث لا تستعمل بكثرة في الكلونة الجزيئية ولكن الصنف الثاني هو المستعمل وقد اكتشف عددا كبيرا منها في الاحياء بدائية النواة وعزلت ، ويستعمل العديد منها في عملية الهندسة الوراثية .

وتعتمد تسميتها على استعمال الحرف الأول من الجنس للاسم العلمي للكائن مع الحرفين الاولى من اسم النوع ، وتستعمل بعدها الارقام اذا كان الكائن ينتج اكثر من انزيم واغلب الانزيمات في الصنف الثاني تميز توالي مكونا من 4 ، 5 ، 6 قواعد والتي تكون متناظرة التوالي Palindromic sequence ، لذلك تكون احتمالية وجود مواقع الفلق بنسبة $1/4^n$ و n تمثل عدد القواعد لذلك فان الانزيمات التي تحتاج الى توالي مكون من 4 قواعد تكون مواقع الفلق لها متكررة كل 256 قاعدة والتي تحتاج الى 6 قواعد تتكرر مواقعها كل 4096 قاعدة ، اما التي تحتاج الى 8 قواعد فتتكرر كل 65536 قاعدة ، فعندما يراد الحصول على قطع من الجين تستعمل الانزيمات التي تحتاج الى 4 من تواليات القواعد اما اذا كان الجين المطلوب كاملا فتستعمل انزيمات التي تحتاج توالي من 6 قواعد لتعطي قطع بحجم حوالي 4000 زوج قاعدة اما اذا اريد الحصول على قطعة كبيرة فتستعمل الانزيمات التي تحتاج الى تواليات مكونة من 8 او اكثر . والانزيمات التي تحتاج الى توالي طويل مثل 10 ، 11 ، 12 ، 13 ، 14 ، 15 من القواعد تسمى بانزيمات القطع النادرة وتقوم بقطع قطع كبيرة وتستعمل في كلونة القطع الكبيرة جدا لرسم الخرائط الطبيعية وقد وجد ان بعض الانزيمات المعزولة من احياء مختلفة تكون متشابهة بالتوالي الذي تتعرف عليه وتقطع في الموقع نفسه وهذه تسمى Isoschizomer كما في SacI ، و SstI التي تفلق التوالي

5'GAG CT *C3'

3'C *TC GAG5'

وعليه فان الانزيمات تختلف بشكل كبير في توالي الموقع التي تتعرف عليها اضافة الى اختلافها في المواقع التي تفلقها ، فالبعض تقص الشريطين في الموقع نفسه مؤدية الى انتاج نهايات ملساء للقطع الناتجة (Blunt restriction fragments) ، في حين ان انزيمات اخرى تقطع احد الاشرطة في موقع والشريط الاخر في موقع اخر مؤدية الى انتاج قطع بنهايات لزجة Sticky ends كما موضح في الشكل الاتي (شكل 30)



شكل 30 : مواقع تأثيرات انزيمات القفطع على DNA

- I - انتاج نهايات ملساء باستعمال Hpa1
- II - انتاج نهايات لزجة باستعمال BamH1

واهم الانزيمات القاطعة المستعملة في الهندسة الوراثية موضحة في الجدول (4)

جدول 4 : اهم الانزيمات القاطعة المستعملة في الهندسة الوراثية

الانزيم	الكائن المنتج	توالي التعرف (5' -----3') (3' -----5')
AatII	<i>Acetobacter aceti</i>	G ACGT*C C*TGCA G
AccII	<i>Acinetobacter caloaceticus</i>	CG*CG GC*GC
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	AG*CT TC*GA
ApaI	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	G GGCC*C C*CCGG G
Asp718	<i>Achromobacter sp 718</i>	G*GTAC C C CATG*G
AvaI	<i>Anabaena variabilis</i>	C*pyCGpu G G PUGCpy*C
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefacines H</i>	G*GATC C C CTAG*G
BanII	<i>Bacillus aneurionlyticus</i>	G*puGCpy C G pyCGpu*G
BclI	<i>Bacillus caldolyticus</i>	T*GATC A A CTAG*T
BglII	<i>Bacillus globigii</i>	A*GATC T T CTAG*A

C*TCGA G G AGCT*C	<i>Brevibacterium luteum</i>	Blu
G CG*C C*GC G	<i>Clostridium formicoaceticum</i>	CfoI (HhaI)
AT*CG AT TA GC*TA	<i>Caryophanon latum</i>	CalI
C*TNA G G ANT*C	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	DdeI
TTT*AAA AAA*TTT	<i>Dienococcus radiophilus</i>	DraI (AhaIII)
G*AATT C C TTAA*G	<i>Escherichia coli BS5</i>	EcoRI
GAT*ATC CTA*TAG	<i>Escherichia coliJ62pLg74</i>	EcoRV
pu GCGC*py py*CGCG pu	<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeII
GG*CC CC*GG	<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeIII
GTPy*puAC CApu*pyTG	<i>Haemophilus influenzae Rd com - 10</i>	HindII (HincII)
A*AGCT T T TCGA*A	<i>Haemophilus influenzae</i>	HindIII
G*ANT C C TNA*G	<i>Haemophilus influenzae</i>	HinfI

GTT* AAC CAA* TTC	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HapI
C*CG G G GC* C	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	HapII (MspI)
G GTAC* C C*CATG G	<i>Klebsiella pneumoniae OK8</i>	KpnI
C*TA G G AT* G	<i>Methanococcus aeolicus PL- 15 /H</i>	MaeI
A*CG T T GC* A	<i>Methanococcus aeolicus PL- 15 /H</i>	MaeII
A*CGCG T T GCGC* A	<i>Micrococcus luteus</i>	MluI
C*CG G G GC* C	<i>Moraxella sp</i>	MspI
GCC*GGC CGG*CCG	<i>Nocardia aerocolonigenes</i>	NaeI
C*CATG G G GTAC* C	<i>Nocardia corallina</i>	NcoI
CA*TA TG GT AT* AC	<i>Neisseria denitrificans</i>	NdeI
GATC CTAG	<i>Neisseria denitrificans</i>	NdeII (MboI)
G*CTAG C C GATC* G	<i>Neisseria mucosa</i>	NheI
GC*GGCC GC CG CCGG* CG	<i>Nocardia otitidis- caviarum</i>	NotI

TCG*CGA AGC*GCT	<i>Nocardia rubra</i>	NruI
A TGCA*T T*ACGT A	<i>Neisseriasicca</i>	NsiI
C TGCA*G G*ACGT C	<i>Providencia stuartii</i>	PstI
CG AT*CG GC*TA GC	<i>Proteus vulgaris</i>	PvuI
CAG*CTG GTC*GAC	<i>Proteus vulgaris</i>	PvuII
GT*AC CA*TG	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	RsaI
G AGCT*C C*TCGA G	<i>Streptomyces achromogenes</i>	SacI (SstI)
G*TCGA C C AGCT*G	<i>Streptomyces albus G</i>	SalI
GATC CTAG	<i>Staphylococcus aureus 3A</i>	Sau3A
AGT*ACT TCA*TGA	<i>Streptomyces caespitosus</i>	ScaI
CCC*GGG GGG*CCC	<i>Serratia marcescens</i>	SmaI
TAC*GTA ATG*CAT	<i>Sphaerotilus natans</i>	SnaBI
A*CTAG T T GATC*A	<i>Sphaerotilus natans</i>	SpeI

G CATG*C C*GTAC G	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	SphI
AAT*ATT TTA*TAA	<i>Sphaerotilus</i>	SspI
G AGCT*C C*TCGA G	<i>Sphaerotilus stanfordii</i>	SstI
AGG*CCT TCC*GGA	<i>Streptomyces tubercidicus</i>	StuI
T*CG A A GC*T	<i>Thermus aquaticus YT1</i>	TaqI
T*CTAG A A GATC*T	<i>Xanthomonas badrii</i>	XbaI
C*TCGA G G AGCT*C	<i>Xanthomonas holcicola</i>	XhoI

N نيكلو تيد

Pu قاعدة بيورينية

Py قاعدة بيريميدينية

وفي حالة كون الانزيم يؤدي الى انتاج نهايات ملساء فعندها يمكن اضافة قطع صغيرة من النيوكلو تيدات وهي المكيفات Adaptors متكاملة على طرفي قطعة DNA المراد إدخاله وذلك لتسهيل عملية ارتباطه نتيجة لتكامل القطع مع بعضها اعتمادا على ازدواج القواعد والتي يسهل ربطها بإنزيمات اللحم في الخطوة التي تليها . ومن الانزيمات الاخرى المكملة والضرورية موضحة في الجدول (5) .

وباختيار الانزيمات الملائمة يمكن تحديد حجم القطع المراد نقلها من جينومات البكتريا او العاثيات . وقد ساعدت خرائط القطع Restriction maps التي وضعت للكشف او تحديد مواقع او اهداف كل انزيم ، ومثل هذه الخرائط وضعت لعدد من البلازميدات والعاثيات وكذلك لجينوم *E . coli* وبعض البكتريا الاخرى .

جدول 5 : الإنزيمات المستعملة في الكلونة العامة

الإنزيمات	الفعالية	الاستعمال
<i>E. coli</i> DNAP I	• إضافة dNTPs • 3' → 5' exonuclease activity • 5' → 3' exonuclease activity	لتعليم DNA بالمواد المشعة
Klenow fragment (<i>E. coli</i> DNAP I)	dNTPs إضافة 3' → 5' exonuclease activity	ملء الفجوات تعليم نهايات قطع DNA تحديد تواليات DNA تكوين الشريط الثاني cDNA
الفوسفيتيز القاعدي من أمعاء العجل	لإزالة مجاميع الفوسفات من النهاية 5' للـ RNA أو DNA	لإزالة مجاميع الفوسفات من النهاية 5' للـ RNA أو DNA
إنزيم DNA ligase من العاثي T4	لربط النهاية الفوسفاتية 5' إلى النهاية 3' الحاوية على OH	ربط النهايات للزجة أو الملساء الناتجة من تأثير الإنزيمات القاطعة
إنزيم DNAP من العاثي T4	إلى النهاية dNTP إضافة أي 5' → 3' polymerase activity 3' → 5' exonuclease activity	لتعليم الحوامض النووية بالمواد المشعة
إنزيم النسخ العكسي	تخليق أشرطة DNA من RNA كقوالب	• يستعمل في كلونة cDNA • يستعمل في تصنيع مسابر معلمة مفردة الأشرطة
إنزيم Polynucleotide kinase من العاثي T4	• يستعمل في نقل مجاميع الفوسفات . • إزالة مجاميع الفوسفات	تعليم RNA أو DNA
إنزيم Terminal deoxynucleotidyl transferase	إضافة dNTP إلى النهايات 3' OH في نهايات DNA	• تعليم النهاية 3' في DNA • إضافة السلاسل المكملة إلى النواقل و

cDNA		
يساعد في تحديد مواقع الانترونات والاكسونات يساعد في عملية تحديد التوالي	يحلل الاشرطة المفردة من DNA و RNA عند النهايات 3' و 5'	Exo III
يساعد في تحديد مواقع الانترونات والاكسونات يساعد في تحديد المواقع القابلة للانتساخ	يحلل الاشرطة المفردة من DNA و RNA	SI nuclease
تستعمل لعمل ثلمات في الاشرطة المزدوجة لتحضير نسايل عشوائية في عملية تحديد التوالي	يحلل الاشرطة المفردة والمزدوجة من DNA وخاصة بوجود Mg^{++} في أماكن عشوائية وعند وجود Mn^{++} يفلق شريطي DNA في نفس الموقع	DNAase I
يحول النهايات 5' الحاوية على الفوسفات في الاشرطة المزدوجة DNA	يفكك DNA من النهايات 5' ويفكك الاشرطة المزدوجة بفعالية تصل الى 100 بقدر الاشرطة المفردة	Exonuclease من العائلي لمدا

وبعد تحضير قطع DNA المطلوبة يتم فصلها باستعمال الهجرة الكهربائية في الهلام Gel electrophoresis وتحويراته مثل Pulse – field gel electrophoresis او غيرها . ويكون الفصل على أساس الحجم فالقطع الصغيرة تسير أسرع ويؤثر على سرعة الحركة في الهلام الطبيعة الكيماوية للهلام وتركيزه والاتصالات العرضية ، فالهلام الحاوي على اتصالات عرضية كثيرة يسمح بفصل قطع صغيرة من DNA ، وتصيب صفائح الهلام بـ Ethidium bromide لتظهر بشكل حزم متفلورة تحت الضوء البنفسجي ، او تحدد باستعمال مسابر خاصة ، وهذه تسمح بفصل قطع تصل أحجامها الى 100 كيلو قاعدة . ويمكن ان تؤخذ هذه القطع وتضخم بطريقة PCR .

تفاعل الكوثرية التسلسلي Polymerase chain reaction

تقنية تستعمل لزيادة كمية DNA ، اذ تسخن القطع في البداية الى درجة 95° م لمسح DNA وفصل الاشرطة ، ثم تضاف قطع البدء التي تكون ضرورية لبناء الاشرطة الجديدة بالاعتماد على اشرطة DNA التي انفصلت في الخطوة الاولى ، ويجب ان تكون قطع البدء Primers ملائمة لكلا الشريطين ، وتضاف وحدات تخليق DNA وهي النيوكليوتيدات (dTNPs) ويبرد النموذج عند هذه المرحلة ثم يضاف انزيم كوثرية DNA والمستعمل بكثرة Taq المستخلص من الاركيا المحبة

للحرارة *Thermus aquaticus* ، وترفع الحرارة الى 72° م ليقوم الانزيم بتكوين الاشرطة المقابلة او المكملية . وتعاد العملية لـ 30 - 40 مرة على مدى 3 - 4 ساعات ، وبذلك تتكون ملايين القطع ، والقطع المضخمة يتم تشخيصها باستعمال الهلام والتصبيغ ، او بربط القطع بالبايوتين لكل قطعة بدء وتضاف الى حفر في Microtiter plates مغطاة بـ DNA التي ترتبط الى القطع DNA الناتجة ويتم تحديد البايوتين باضافة بروتين الافيدين (Avidin) مع انزيم مثل الفوسفيتيز القاعدي الذي يؤدي الى انتاج مركب ملون ثم تضاف مادة الاساس للانزيم الاخير وتحدد شدة اللون الناتج والخطوات موضحة في الشكل (31) .

وتستعمل التقنية في تشخيص الأمراض الوراثية وكذلك الناتجة عن الاصابات باحياء عضية العزل والتنمية مثل *Chlamydia* و *Mb. tuberculosis* ، وفي حالة البكتريا الاخيرة فعند وجود قطع من DNA في القشع فالتشخيص يمكن ان يتم بسرعة ، وكذلك يمكن في حالات اخرى مثل حالة الإسهال يتم البحث عن القطع المشفرة للسلم المعوي في الغائط ، ولكن نجاح الطريقة محددة بقله DNA البكتيري او الفيروسي وكثرة DNA غير المستهدف في النماذج .

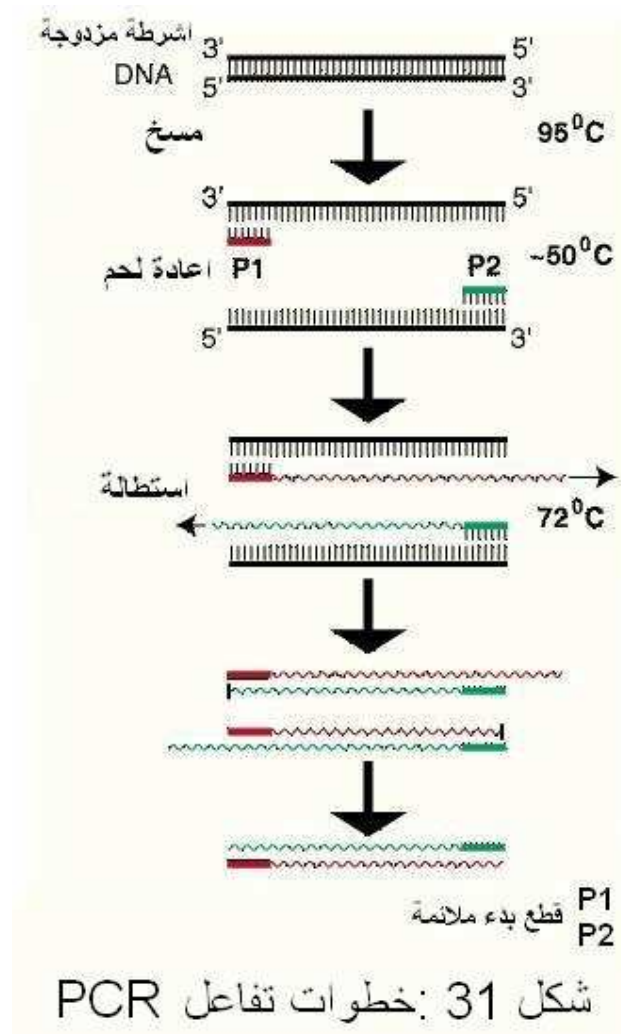
وفي الخلايا حقيقة النواة فان قطع DNA تخلق من mRNA وذلك لان المادة النووية تحوي على قطع الانترونات غير المشفرة في حين ان mRNA يكون معالجا بإزالتها (وحاويا على الاكسونات Exons) ويستعمل في ذلك انزيم النسخ العكسي المستخلص من فيروسات جينومها مكون من RNA .

الخطوة الثانية : اختيار النواقل

النواقل Vectors : وهي الاحتياج المهم الثاني لغرض التغيير الوراثي ، وذلك لان قطع DNA المدخلة الى الخلايا المضيفة تتلاشى اذا لم تدمج مع متضاعف مثل كروموسوم الخلية ، لذلك تدخل ضمن نواقل او متضاعفات مستقلة ، وتعد عملية انتقاء النواقل خطوة مهمة لنجاح عملية التغيير وهناك بعض الاسس التي يتم انتخاب النواقل على ضوءها :

- ان يكون الناقل مكونا من جزيئة صغيرة لتسهيل تحضيره والتعامل معه .
- ان يحوي منطقة تضاعف ليكون قادرا على التضاعف بشكل مستقل في الخلايا المضيفة .

- ان يكون حاويا على اكثر من موقع للانفلاق بانزيمات القطع لإدخال القطع المراد ادخالها ويفضل ان تكون ضمن جين إعلان مثل المقاومة للمضادات الحيوية ، وعند ادخال القطعة تؤدي الى التعطيل ويسهل الكشف عنها .



• ان يكون الناقل حاويا على مميزات خاصة بصفاته ، والتي يمكن ان تستعمل من قبل القطع المدخلة في حالة نقلها بدون مميزات .

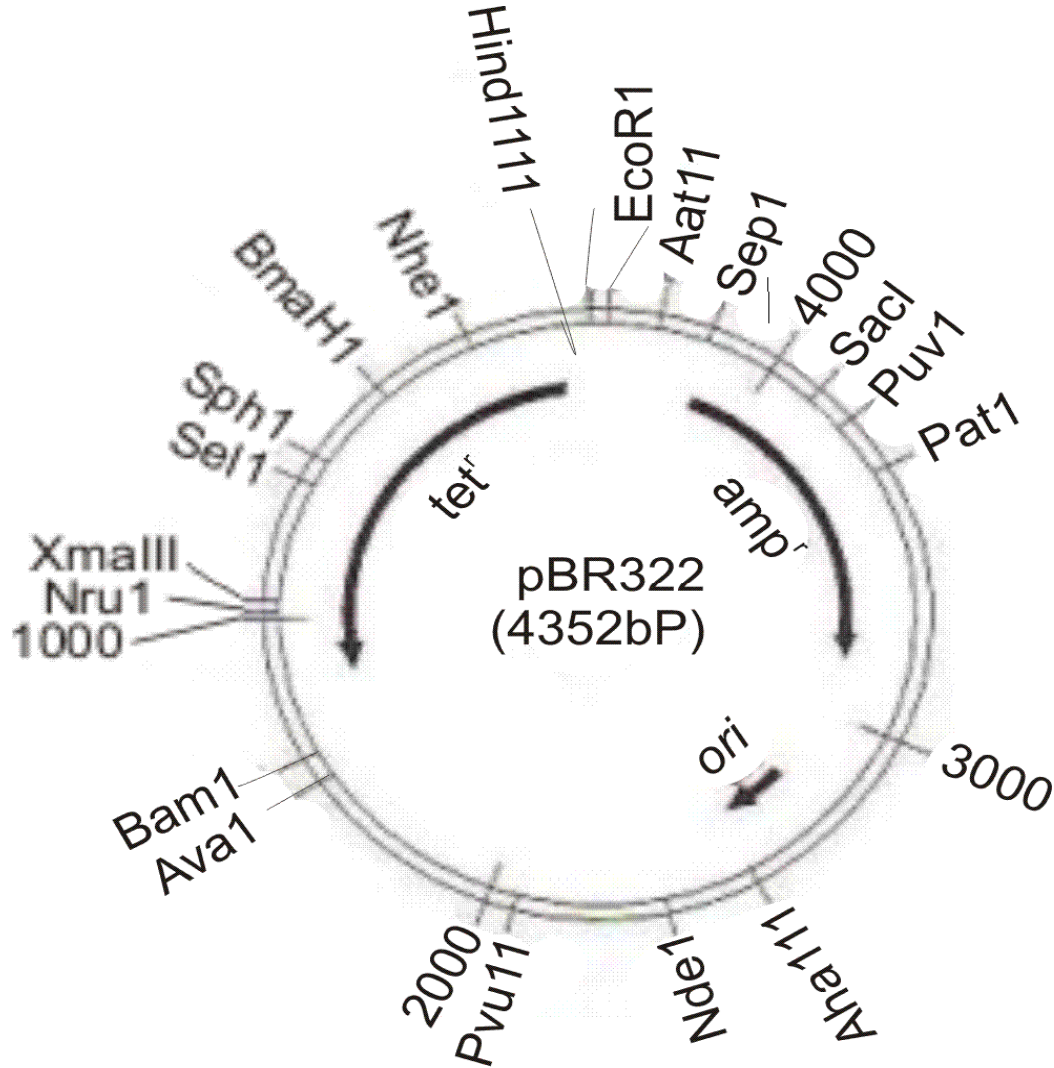
وقد امكن تحضير اعداد كبيرة من النواقل والتي أساسها معتمدة على البلازميدات والعائيات التي تنقل قطع بحجم 10 كيلو قاعدة مع اجراء بعض التحويلات المطلوبة ، وحضرت كذلك نواقل مكوكية Shuttle vectors التي يمكن ان تتضاعف في اكثر من خلية مضيفة ليست بينهما علاقة ، وفي اغلب الاحيان فان نقطة تضاعف هذه النواقل تشتق من البلازميد pMBI و ColEI L .

اولا : البلازميدات

وتعد اهم النواقل المستعملة ومنها :

- البلازميد pBR322 الموضحة خارطته في الشكل (32) .

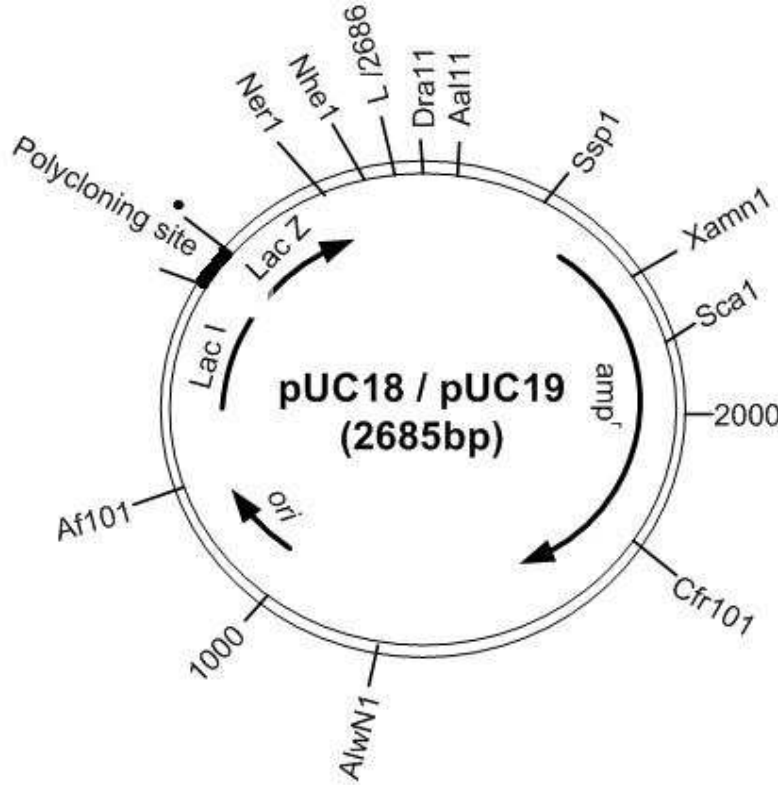
ويتراوح حجم البلازميد بحدود 4.36 كيلو قاعدة ، ويحمل جين مقاومة الامبسيلين amp^r والتتراسايكلين tet^r ، كما يحوي على عدد من مواقع الانفلاق بعدد من الانزيمات القاطعة . ويمكن ان تستعمل صفات المقاومة للتحري لان حشر القطعة المراد نقلها في احد الجينات يعطل صفة المقاومة وبالتالي يتم التحري عنها باستعمال المقاومة للمضاد الاخر .



شكل 32: خارطة البلازميد pBR322

- البلازميد pUC18 ، pUC19 من البلازميدات المهمة المستعملة في كلونة الجينات وخارطتها العامة موضحة في الشكل (33) .

وتختلف البلازميدات في التواليات التي يمكن ان تنفلق بانزيمات القطع التي تكون معكوسة الترتيب كما موضح في الشكل . وهي تحوي على قطعة من البلازميد pBR322 وهي EcoRI او PvuI ، اضافة الى جين مقاومة الامبسلين وكذلك تحوي على قطع من اوبرون اللاكتوز مثل LagZ اضافة الى موقع فلق يمكن ادخال العاثي M13 .



- مواقع الكلونة في البلازميد 18 تحوي على 10 مواقع للانفلاق بانزيمات قطع مختلفة. والبلازميد 19 يحوي على 10 مواقع للانفلاق بانزيمات قطع مختلفة عن الاولى بعد ادخال تواليات مقلوبة لما موجود في البلازميد الاول

شكل 33 : البلازميد pUC18 , pUC19

ثانيا : العاثيات

ويمكن ان تستعمل كنواقل كفوءة في الهندسة الوراثية او تستعمل في تحضير نواقل مهجنة . ومن المعروف ان العاثيات يمكن ان تكون من DNA او RNA . ونظرا لاهمية العاثيات في الهندسة الوراثية فقد تم وضع خرائط القطع لها Restriction maps يمكن ان تستعمل لتشخيص عاثيات من DNA ، اذ يعزل الاخير ويعامل بالانزيمات القاطعة ثم تفصل القطع على اساس الحجم بالترحيل الكهربائي في الهلام وتناسب حركة الجزيئات عكسيا مع الحجم ويتم الكشف عنها بطرق الإشعاع Radiography او أي طريقة اخرى . وقد امكن باستعمال هذه الطرق رسم الخرائط

الطبيعية او الفيزيائية للتمييز بين انواع الفيروسات خاصة التي لا يمكن زرعها . ويمكن تحديد وظائف الجينات (القطع المعزولة) والبروتينات التي تنتجها وتحديد مواقعها ، كما يمكن اجراء عمليات التطهير في مواقع محددة من جينوم الفيروس ، ويمكن استعمال PCR في رسم الخرائط واجراء عمليات التطهير .

وتكون العاثيات المكونة من اشرطة مزدوجة dsDNA اسهل في عمليات الكلونة وان كانت تحتاج الى خطوات كثيرة . اما العاثيات المكونة من RNA فيستعمل cDNA نظرا لعدم توفر طرق وراثية وكيموحيوية للتعامل معها ، كما ان cDNA يعطي نقاوة اكثر ويتجنب التغيرات التي تحصل في جينومات الفيروسات اثناء تضاعفها في مزارع الخلايا . وتوفر الحالة إمكانات اكبر لإحداث الطفرات في جينوم الفيروس مثل طفرات الحذف او الطفرات النقطية وتوفر إمكانية انتاج طفرات شرطية وهي التي تكون مميتة ولا تستطيع انتاج جزيئات فيروسية قادرة على الاصابة تحت ظروف معينة او ظروف غير متاحة ، ولكن مثل هذه الجزيئات قادرة على توليد الاصابة عند ظروف اخرى أي ظروف الإتاحة ، ومن اهمها الطفرات الحساسة للحرارة التي تنمو بدرجات حرارية واطئة . وتوفر الطريقة إيجاد طفرات من العاثيات تكون ذات مدى واسع من المضايق ، وكل هذه تساعد في رسم الخرائط الكروموسومية وتحديد عملية التضاعف على المستوى الجزيئي .

الفيروسات الناقصة Defective viruses : وهي فيروسات ينقصها جين او اكثر وبذا تفقد بعض الوظائف التي يحتاجها الفيروس للتضاعف ولذلك تستعمل كنواقل جيدة في الهندسة الوراثية مع استعمال فيروسات مساعدة لتساعد في خطوة او اكثر من عمليات التضاعف والنضج . وقد تكون الفيروسات الناقصة فقدت جزءا من جينومها تلقائيا او اثناء التحضير ولكنها تبقى محتفظة ببروتينات القفيصة الطبيعية وهذا يؤدي الى احتفاظها بقابلية الاصابة مثل فيروس التهاب الكبد Hepatitis النوع D . تستعمل الفيروسات في تحضير اللقاحات .

وتوجد انواع اخرى من الفيروسات التي يمكن استعمالها وهي الفيروسات الكاذبة Pseudoviruses وهي فيروسات ناقصة وتحوي على DNA من الخلية المضيفة بدلا من مادتها الوراثية ، وعندها تحيط القفيصة بجزء من جينوم الخلية المضيفة بدلا من الجينوم الفيروسي ، وهذه تشبه الفيروسات الطبيعية من الناحية الشكلية المظهرية ولكن لا تستطيع التضاعف ولكن يمكن ان تنقل المواد الوراثية من خلية الى أخرى .

الفيروسات القهقرية المحولة Transformed retroviruses : فيروسات ناقصة استبدل جزء من جينومها بقطعة من DNA الخلية المضيفة التي تشفر لبروتين محول يساعد في التعرف على جينات السرطان ، وبعضها لا يستطيع التضاعف ويحتاج الى فيروسات مساعدة لاجراء عملية التضاعف .

ويمكن ان تحصل للفيروسات العائدة الى العائلة او المجموعة نفسها عند وجودها في الخلية المضيف الواحدة اذ تتداخل مع بعضها منتجة افراد جديدة لا تشبه أي من الأبوين ، وقد يكون التداخل وراثي أي تداخل الحوامض النووية وتكون الابناء لا تشبه الاباء ، او يكون التداخل لا وراثي وتكون الافراد الناتجة تشابه الآباء وراثيا . وعمليات التداخل الوراثي تتم بعملية التأشب ، والطريقة التقليدية حدوث كسور في اشربة الحوامض النووية ويرتبط جزء من جينوم احد الاباء مع جزء من جينوم الاب الثاني . والفيروسات الناتجة تكون ثابتة وتعطي أحفاد مشابه لها عند التضاعف . وتختلف الفيروسات في مدى حدوث التأشب فيها .

وفي الفيروسات التي تكون جينوماتها مقسمة مثل فيروس الأنفلونزا فإن الافراد الجديدة تنتج من إعادة ترتيب الجينوم نفسه وليس حدوث تبادل قطع الجينوم وهي الاكثر سهولة والاكثر حدوثا . واي من الفيروسات المذكورة اعلاه هندست لتعمل كنواقل تضاعف وتعبير عن الجينات الفيروسية والخلوية ، ويمكن لأي فيروس ان يستعمل ناقلا اذا احتوى على معلومات التضاعف والسيطرة على الانتساخ وإشارات التعبئة . وتقنيات انتاج النواقل الفيروسية تعتمد على جينومات الفيروسات من نوع DNA (كما ذكر انفا) ومنها الفيروسات التي تصيب الحيوانات ، ولكل نظام مزاياه الحسنة ومساؤه .

العائلي لمدا (٨) : من العائيات المهمة المستعملة نواقلا في الهندسة الوراثية . والعائلي يمكن ان يؤدي الى تحلل الخلايا او الاستقرار في حالة استذابة . ويتكون العائلي من رأس متعدد الأوجه يحوي على جينوم العائلي ويحاط بغلاف بروتيني وذنب يساعده على الالتصاق الى الخلايا الحساسة له وحقن الجينوم . ويتكون جينوم العائلي من 49 كيلو قاعدة تتوزع في مناطق منها 40 % أي حوالي 20 كيلو قاعدة غير ضرورية للعائلي ويمكن ان تستبدل بـ DNA غريب ، اما الباقي فتتجمع على شكل عناقيد وتمثل 60 % وتكون ضرورية لفعاليات حث الإصابة ، ويتكون الذراع الأيسر من 20 كيلو قاعدة وتشمل الجينات المسؤولة عن تكوين الرأس والذنب وتحمل الرموز من A – J ، اما الذراع الأيمن فيتكون من 10 كيلو قاعدة وتضم مواقع الالتصاق عندما يكون العائلي بتركيب حلقي . ومواقع الالتصاق Cohesive sites (Cos) تمتد الى مسافة 12 قاعدة وتكون على طرفي الجينوم وتكمل احدها الاخرى ، وهذ النهايات اللزجة تساعد العائلي على تكوين التركيب الحلقي وتؤثر في عمليات تضاعف وتكاثر العائلي كما تساعد للاندماج مع كروموسوم الخلية التي يصيبها . وعند دخول العائلي الى داخل الخلية فإنه يدخل طور الاستذابة والاندماج مع كروموسوم الخلية عندما تساعد الظروف على التعبير عن البروتين C1 الذي يكبح الجينات العاملة في دورة التحلل . او يتم تحفيز Cro وانتاج البروتين Cro الذي يؤدي الى تحفيز تضاعف العائلي وتعبئته وبالتالي انفجار الخلية كما موضح في الشكل (34) .

ويستعمل العاثي في تحضير انواع من النواقل منها :

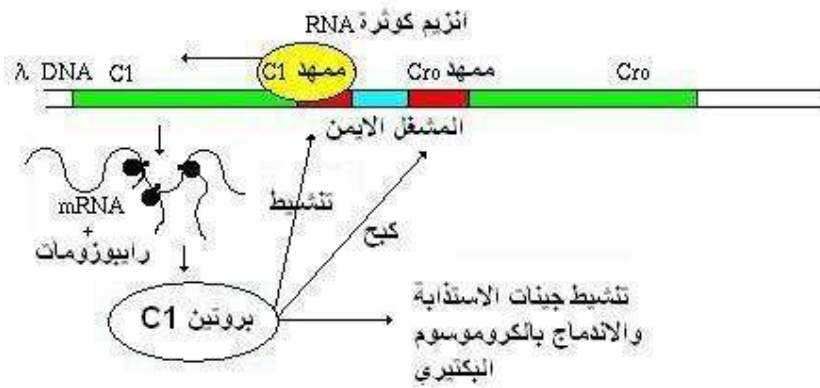
1 - نواقل الاقحام Insertion vectors وفيها ازيلت المناطق غير المهمة واستبدلت بالمواد المراد نقلها

2 - نواقل الاستبدال Replacement vectors وفيها يحوي الناقل على موقعين للانفلاق بالانزيمات حول المنطقة غير الضرورية والتي يمكن ان تستبدل بقطعة DNA المراد نقلها .

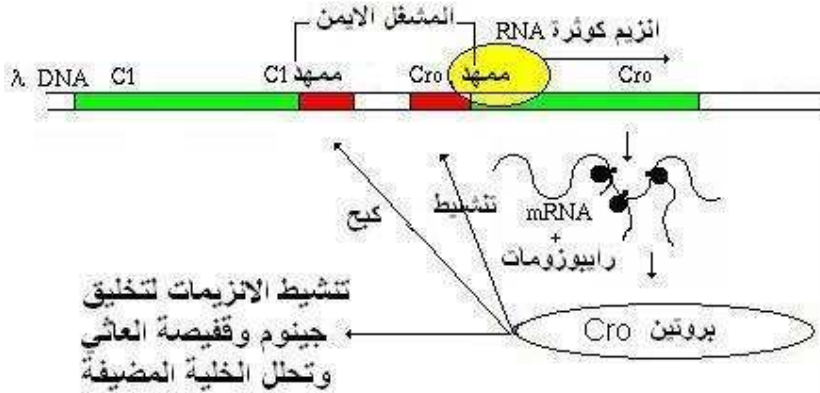
ويستعمل العاثي ومشتقاته لكلونة الجينات التي تكون نواتجها سامة او مؤذية للخلايا ، وعند اختيار الناقل من مجموعة العاثي لمدا فانه يجب الأخذ بنظر الاعتبار حجم القطعة المراد نقلها وذلك لانه لا يوجد ناقل من مشتقات العاثي ملائما لكلونة قطع DNA من مصادر مختلفة .

الدورة التحليلية وحالة الاستدابة للعاثي λ

• حالة الاستدابة



• حالة التحلل

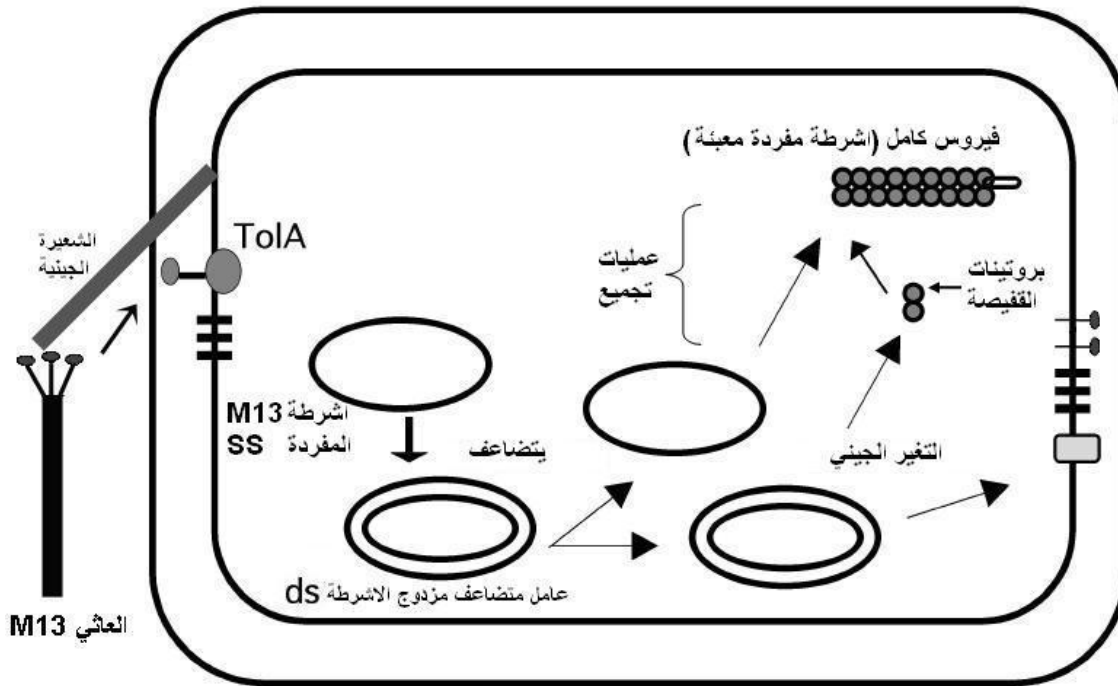


شكل 34 : حالة الاستدابة والدورة التحليلية للعاثي λ

وتتعرض عملية الإصابة بالعائى فيما اذا عبا بزيادة من المواد الوراثية تصل الى 105 % ، كما انها تتعرض عند حذف بعض جينومه ليكون 80 % من الحجم الاصلي .

العائيات الخيطية Filamentous phages

واهم هذه المجموعة المستعملة نواقلا في الهندسة الوراثية هو M13 الذي يتكون جينومه من 6.4 كيلو قاعدة . والعائى مكون من اشربة مفردة من ssDNA معبا في قفيصة بسيطة التركيب تتكون من مكررات لثلاث بروتينات وبذلك فهي تحتاج الى 3 جينات ، ويكون شكله خيطي كما موضح في الشكل (35)

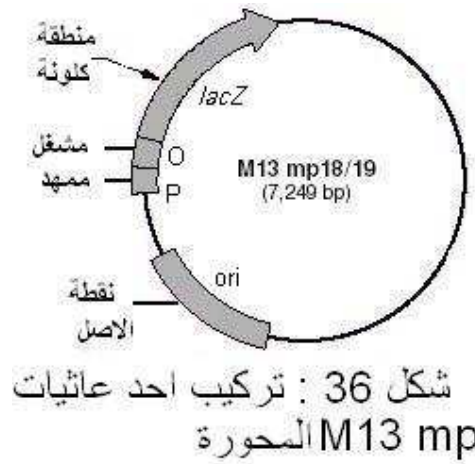


شكل 35 : تركيب ودورة تضاعف العائى الخيطي M13

يرتبط العائى بالشعيرة الجنسية على سطح الخلية ثم يدخل الجينوم الحلقي مفرد الاشربة ويعمل كقالب لتكوين جزيئة DNA ثنائية الاشربة تعرف بالعامل المتضاعف Replicative factor (Rf) والآخر يستعمل كقالب للتضاعف لعدة دورات وكذلك للتعبير عن الجينات المسؤولة عن تكوين بروتينات القفيصة . وعندما تتجمع حوالي 100 – 200 نسخة من العامل المتضاعف يقوم العائى بحث بروتينات تمنع الاشربة الجديدة من التحول الى عامل متضاعف مزدوج الاشربة ، وتعباً الموجودة في القفيصات كما موضح في الشكل .

وبما انه من الصعوبة التعامل مع اشربة DNA المفردة لذلك تستعمل العوامل المتضاعفة مزدوجة الاشربة لادخال قطع DNA المزدوجة المرغوبة ، ويمكن تنقية العوامل المتضاعفة

الحاوية على الجينات المراد نقلها من الخلايا المصابة ، وتنقل الى الخلايا المؤهلة بعملية التحول وتبدأ بالتضاعف مثل البلازميدات . وقد اشتقت من العاثي نواقل مهمة هي M13 mp بعد اقحام قطع صغيرة من الجين المنظم لاوبرون اللاكتوز من *E. coli* للمساعدة في الكشف عن الخلايا التي دخل العاثي اليها ، كما انها تحتوي على العديد من مواقع الانفلاق بالانزيمات كما موضح في الشكل (36) . ولذلك يكون العاثي المحور ملائما للعديد من عمليات الكلونة اذ ان حجمه مثالي كناقل اضافة الى احتواءه على واسمات تسهل عملية تتبعه ، كذلك وجود مواقع الفلق التي تستعمل لادخال قطع DNA

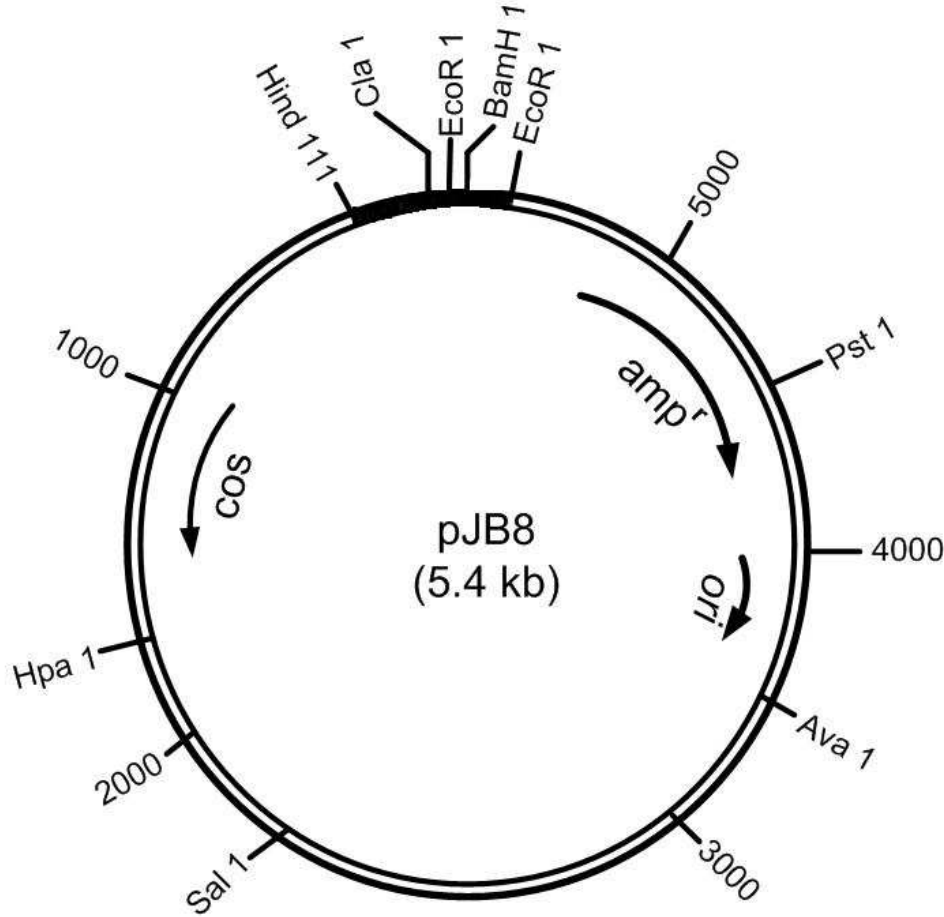


ثالثا : النواقل المشتقة

وتشمل المجموعة عدد من النواقل التي اشتقت من العاثيات والبلازميدات او تم تصنيعها لتلائم أغراض خاصة ومنها :

1 – الكوزميدات Cosmids : نواقل هجينة من البلازميدات والعاثيات . والاساس فيها البلازميد الذي يحوي على اصل التضاعف من ColEI وجين المقاومة الذي يحمله اضافة الى تواليات الالتصاق Cos من العاثي لمدا وتكون لازمة لتعبئة DNA الكوزميد المتأشب في رأس العاثي . ومن صفات هذه النواقل انه في الخلية البكتيرية يتضاعف كبلازميد ، وتستعمل لنقل قطع كبيرة من DNA تصل الى 35 - 45 كيلو قاعدة ، لذلك تكون ملائمة لنقل جينات الخلايا حقيقة النواة كقطعة واحدة . ومن الكوزميدات المستعملة لنقل جينات حقيقيات النواة الكوزميد c2XB و pJB8 ، والاخير موضحة خارطته في الشكل (37) .

ويصل حجم الكوزميد 5.4 كيلو قاعدة ويحوي اصل التضاعف ColEI ويحوي على منطقة واحدة من Cos اضافة الى جين مقاومة الامبسيلين ومواقع انفلاق مختلفة كما موضح في الشكل ، وتصل سعته لكلونة قطع مكونة من 33 - 46.5 كيلو قاعدة .



شكل 37 : خارطة الكوزميد pJB8 المستعمل في نقل جينات الخلايا حقيقية النواة

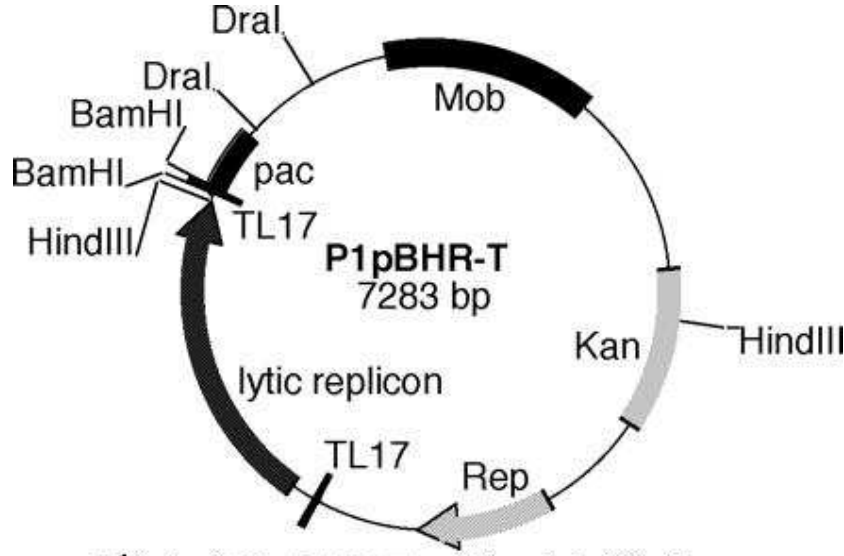
2 – الفاجميدات Phagmids : نواقل هجينة من البلازميدات والعاثيات تحتوي نقطة اصل

للتضاعف من عاثي خيطي . فمثلا الفاجميد pRS314 يحضر من العاثي M13 لانتاج نسخة صغيرة من الفيروس الذي حجمه حوالي 4.78 كيلو قاعدة ، ولذلك فانه يكون نسخ متعددة من أشرطة مفردة .

ويختلف الفاجميد عن الكوزميد الذي يمكن ان يدخل الخلايا بكفاءة ، فالعاثي المستعمل في تحضير الفاجميد لا يمكن ان يدخل الخلايا ، وكذلك لا يستطيع ان يتضاعف نظرا لإزالة كمية كبيرة من مواده الوراثي واستبدالها بالمواد المراد نقلها الا اذا استعمل مع بعض العاثيات المساعدة مثل f 1

اما ما تبقى من الفعاليات مثل تخليق بروتينات القفيصة فهي لا تزال موجودة . وبعد التضاعف فان الناقل يعبأ في رأس العائلي .

تستعمل الفاجميدات لتنظيم وتكثير قطع من DNA الخاصة التي تدخل الى نواقل مصممة من البلازميدات والعائيات والكوزميدات وغيرها . ومن الفاجميدات المهمة التي صممت لتعمل في عدة مضاييف من البكتريا السالبة لصبغة كرام ، الفاجميد P1pBHR-T وهو فاجميد صغير يتكون من 7283 زوج قواعد وتركيبه موضح في الشكل (38) .



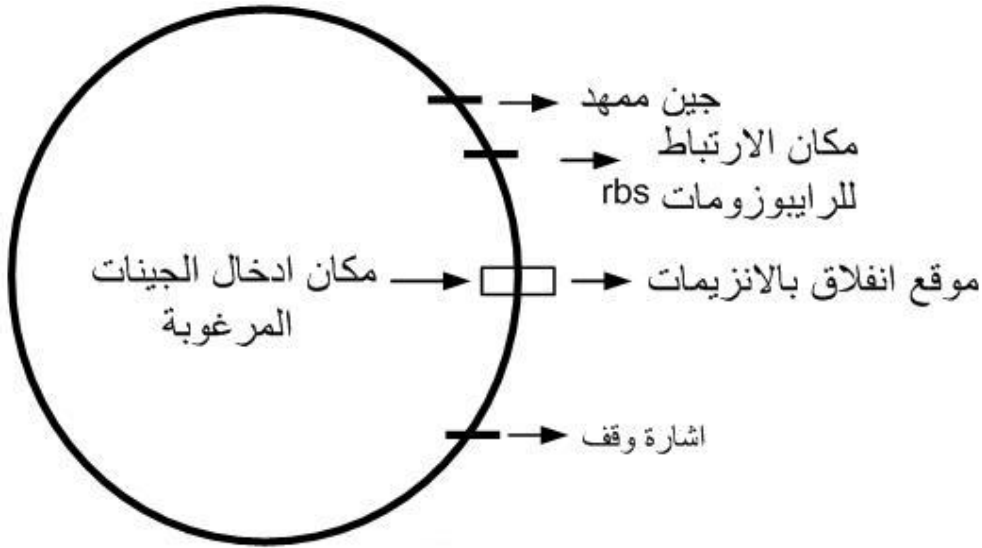
شكل 38: تركيب الفاجميد P1pBHR-T المستعملة في هندسة البكتريا المعوية

وهو يتكون اساسا من العائلي P1 الذي يستعمل لإنتاج العديد من البكتريا المتأشبة وذلك لقابليته على نقل الواسمات الكروموسومية وكذلك واسمات بلازميدية مثلا من البلازميدات F و R ، والعائلي يمكن ان يصيب عددا من سلالات *E. coli* اضافة الى عدد كبير من انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام تصل الى 25 نوع . وانتشاره الواسع هذا ناتج من قابليات او وظائف مضادة للتقطيع عند دخوله الخلايا ، فالعائلي نادرا ما يتعرض للتقطيع عندما يصيب خلايا تحوي على انزيمات القطع من الصنف الاول ، وهذه المقاومة تعود الى وجود بروتينات خاصة *Defense against restriction proteins* (DarA و DarB) الموجودة في رأس العائلي .

استعمل العائلي مع البلازميد pBR322 الواسع المضاييف ويشترك البلازميد في التشفير لبروتينات التحريك *mob* ويحوي نقطة التضاعف *Rep* والمقاومة للكاناميسن او الامبيسيلين *kan^r* / *amp^r* ، اما مشاركة العائلي فتكون بـ *pac* المسؤولة عن تعبئة المكونات في رأس العائلي وكذلك مسؤولة عن التضاعف التحليلي *Lytic replication* ، ويحوي على نقطة لإنهاء الانتساخ وهي مشتقة من *α-operon* من *E. coli* ، اضافة الى وجود مواقع فلق بانزيمات القطع . والناقل

يتضاعف بشكل معتدل ، ويكون الفاجميد مشابه للبلازميد الذي اشتق منه وكذلك يتوافق مع البلازميدات الاخرى ولذلك يستعمل لإصابة السلالات التي تحوي على البلازميدات الطبيعية المقيمة في الخلايا . كما يمكن تحميله بقطع تصل الى 100 – 115 كيلو قاعدة ، وهذه الصفة مهمة لأنها تسهل نقل الجينات الكبيرة او مجموعة من الجينات التي تشفر لمكونات تعمل في مسار ايصي معين او مسار لنقل الإشارات Signal transduction pathway كاملا . وتتم حماية DNA المنقول بواسطة بروتينات الحماية Dar A و DarB التي يحملها العاثي لذلك فان مثل هذه النواقل تكون ملائمة لتصميم سلالات تحوي على جينات تعبر عن البروتينات المتباينة Heterologous proteins .

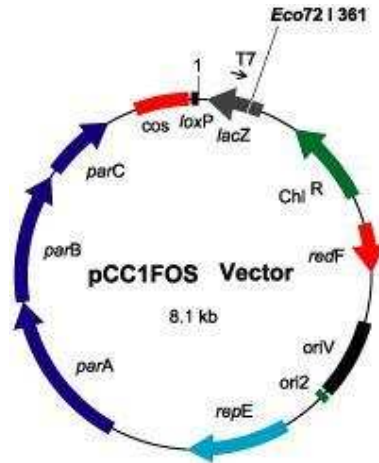
3 – نواقل التعبير Expression vectors : في كثير من النواقل هناك اساسيات وعدد من السيطرات الواجب توفرها ومنها وجود جين ممهد يحوي على بداية لانتساخ mRNA اضافة الى موقع لارتباط mRNA على الرايبوزوم لبدء عملية الترجمة Ribosome binding site (rbs) ، ونظرا لان القطع المراد نقلها في بعض الاحيان لا تحتوي على مثل هذه الضروريات او تفقد اثناء التحضير ولذلك تربط على نواقل تعبير بسيطة الموضحة في الشكل (39)



شكل 39 : التركيب الاساسي لنواقل التعبير

والممهدات المستعملة قد تكون قوية لإنتاج كميات كبيرة من النسخ او ضعيفة لإنتاج نسخ قليلة وبالتالي كميات من البروتينات المعتمدة عليها والتي بدورها تعتمد على الغرض التي حضر من اجلها الناقل . ومن الممهدات المستعملة هي ممهدات اوبرون اللاكتوز Lac او اوبرون التريبتوفان Trp او استعمال هجين منهما tac ، ومن الممهدات القوية المستعملة هي تلك المشتقة من العاثي لمدا . ومن هذه النواقل صممت نواقل Cassette وذلك باحداث تغييرات في مواقع الفلق بالانزيمات ، ويمكن اجراء أي تغييرات اخرى .

4 - الفوزميدات Fosmids : نواقل وراثية تشابه الكوزميدات ولكن البلازميد المستعمل هو بلازميد الخصوبة F- plasmid . ويكون استعماله في الكلونة محددا نظرا لأنه يستعمل في *E. coli* كمضيف له ، والخلايا يمكن ان تحوي فوزميد واحد فقط . والفوزميدات تكون أعداد نسخ واطئة مما يضيف عليها الثباتية مقارنة بالكوزميدات التي تكون عدد كبير من النسخ ، استخدمت هذه النواقل وساعدت في برامج تحديد توالي الجينوم البشري . والشكل (40) يوضح تركيب احد هذه النواقل .

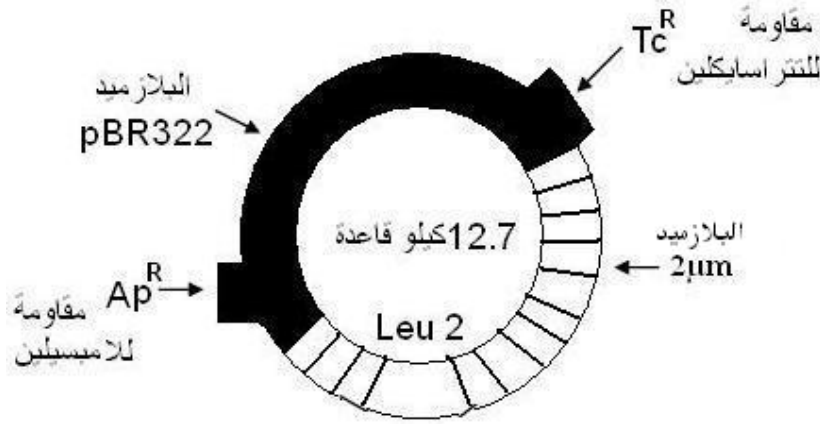


شكل 40: تركيب احد الفوزميدات الخاصة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام

نواقل الفطريات والخمائر : نظرا لأهمية هذه المجموعة في العمليات التصنيعية الحيوية الإنتاجية فقد طورت لها العديد من النواقل لتحسين مواصفاتها .
فالمخمر مثل خميرة الخبز تحوي على البلازميد $2\mu\text{m}$ الذي يتراوح حجمه حوالي 6 كيلو قاعدة وهو ملائم جدا للعمل كنواقل كلونة واستعمل في تحضير بعض النواقل المهمة في هذه المجموعة من الاحياء ، ويحمل جين تخليق الحامض الاميني الليوسين ويمكن ان يتضاعف في الخلية لينتج حوالي 200 نسخة ، وقد استغلت صفة تخليق الليوسين كواسمة وراثية ملائمة لان مقاومة المضادات الحيوية تعد واسمات غير ملائمة في الخمائر . ومن هذه النواقل :

١ - Yeast episomal plasmid (YEP) الذي حضر من البلازميد $2\mu\text{m}$ والبلازميد البكتيري pBR322 وبحجم يقرب من 12.7 كيلو قاعدة والموضح تركيبه في الشكل (41) .
ويستطيع الناقل الاندماج مع كروموسوم الخلية نظرا لوجود تشابه في المناطق المشفرة للحامض الليوسين . والناقل الاخر المشابه له هو Yeast integrated plasmid (YIP) مشتق من البلازميد pBR322 وبعض مكونات جينوم الخميرة الخاصة بتخليق الليوسين . والناقل Yeast replicative

plasmid (YRP) وهو ايضا مشتق من البلازميد pBR322 والجين المسئول عن تخليق الحامض الاميني التربتوفان ، ويستطيع الاندماج مع جينوم الخلايا في المناطق المشفرة للتربتوفان .
ويستخدم البلازميد $2\mu\text{m}$ في بناء نواقل في الخمائر الأخرى وكذلك الفطريات المهمة من النواحي الصناعية .



شكل 41 : نواقل الخمائر (YEP)

نواقل القطع الكبيرة : وهي تمثل انواع مختلفة من النواقل تستعمل لنقل قطع DNA الكبيرة التي لا تستوعبها النواقل المذكورة اعلاه وهي تمثل نواقل صناعية ومنها :

أ - كروموسومات البكتريا الصناعية Bacterial artificial chromosomes (BACs) :
من نواقل الاقحام يمكن ان تساعد في نقل قطع تصل الى 300 كيلو قاعدة . وحضرت النواقل من عدة اجزاء ضرورية مثل نقاط أصل التضاعف التي يمكن ان تشتق من البلازميد f 1 او تشتق من عاثيات البكتريا مثل P1 .

ب - كروموسومات الخمائر الصناعية Yeast artificial chromosomes (YACs) ويمكن ان تنقل قطع تصل الى 1 ميكا قاعدة ، لذلك تستعمل لنقل جينات الإنسان ، وساهمت في مشروع تحديد تواليات الجينوم البشري .

ج - كروموسومات اللبائن الصناعية Mammalian artificial chromosomes (MACs) : وهذه تخص عمليات الكلونة في اللبائن وتستطيع نقل قطع 1000 كيلو قاعدة على الأقل ، وتحتاج النواقل الى احتياجات خاصة تلاؤم خلايا اللبائن مثل وجود جسيم مركزي Centromere وكذلك وجود أطراف الكروموسومات Telomeres وتستعمل لدراسة الجينات ووظائفها وطرق تنظيمها .

نواقل الخلايا حقيقية النواة الراقية : هذه النواقل تستعمل لتحويل خلايا اللبائن والنباتات . وتكون النواقل حاوية عناصر تنظيم وهي الممهديات التي يمكن ان تضاف لها المشجعات Enhancers التي

توضع بجانب الممهد لزيادة انتساخه . وتحتوي على إشارات لعملية إنهاء كفاءة ، وكذلك آليات لتحويل النسخ بعد ترجمتها مثل عملية اضافة الادنين Polyadenylation ، وبعض الاحيان ربط بعض التواليات من الانترون وقد هندست العديد من الفيروسات لنقل الجينات بين الخلايا سواء من انواع التي تمون مادتها الوراثية من DNA مثل SV40 وكذلك الفيروسات الغدية وفيروسات الهربس Herpes ومجموعة فيروسات شلل الاطفال والفيروسات القهقرية .

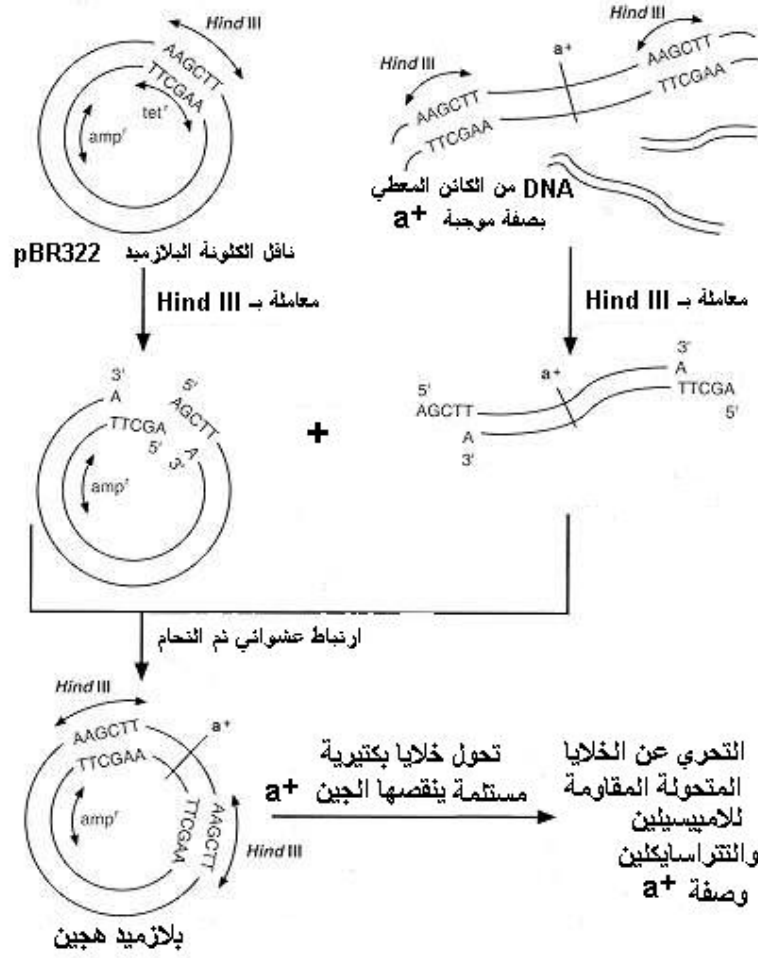
الخطوة الثالثة :

بعد الانتهاء من تحضير قطع DNA المراد نقلها وايجاد نواقل الكلونة الملائمة تربط القطع الى النواقل بعد تحويلها مثل ازالة مجموعة الفوسفات لمنع عودة ارتباطها مع بعضها ، وهناك العديد من الانزيمات العاملة في هذه الخطوة والخطوات التي بعدها والموضح بعضها في الجدول (5) ومنها :

- E. coli DNAP I لاضافة النيكلوتيدات ، وله فعالية القطع الخارجي بالاتجاه من 5' الى 3' وكذلك له فعالية القطع بالاتجاه المعكس .
- قطعة Klenow جزء من انزيم كوثرة DNA (DNAP) في البكتريا اعلاه ، تقوم القطعة ايضا باضافة النيكلوتيدات ، ولها فعالية القطع الخارجي بالاتجاه من 3' الى 5' فقط .
- الفوسفيتيز القاعدي من أمعاء العجول ، يساعد في ازالة مجموعة الفوسفات من الحوامض النووية
- الانزيم اللاحم Ligase من العاثي T4 يربط النهاية الفوسفاتية 5' الى النهاية الهيدروكسيلية 3'
- انزيم كوثرة من العاثي T4 لإضافة النيوكلووتيدات وله فعالية القطع الخارجي بالاتجاه من 3' الى 5' فقط .
- انزيم النسخ العكسي يعمل لإنتاج DNA من اشرطة RNA .
- انزيمات الكاينزات وتكون من مصادر مختلفة تعمل على تحريك ونقل مجاميع الفوسفات .
- انزيمات النقل مثل Terminal deoxynucleotidyl transferase لاضافة النيوكلووتيدات الى النهاية OH' من DNA .
- EoxIII لتفكيك اشرطة DNA المفردة و RNA عند النهايات 3' و 5' .
- SI nuclease لتفكيك اشرطة DNA المفردة و RNA عند الثلمات والفجوات . Gaps

- Mung bean nuclease لتفكيك اشربة DNA المفردة و RNA عند Gaps .
- DNAase I لتفكيك اشربة DNA المزدوجة بوجود ايونات المغنسيوم في مناطق عشوائية ولتفكيك اشربة DNA المزدوجة بوجود ايونات المنغنيز في المناطق نفسها .
- انزيمات القطع الخارجي من العائي لمدا لتفكيك DNA عند النهاية 5' وتكون قدرته لتفكيك الاشربة المزدوجة اكثر ب 100 بقدر فعاليتها لتفكيك الاشربة المفردة ويتم عادة تحضير قطع DNA ومعاملة النواقل بالانزيم نفسه كي يكون هناك تلاؤم في النهايات الناتجة مثل توليد النهايات اللزجة التي تسهل عملية الربط . وعند قطع البلازميدات التي تكون بمثابة حلقات شديدة الالتفاف تتحول الى تراكيب مفتوحة متراخية ، ثم تزال مجاميع الفوسفات لمنعها من تكوين التركيب الحلقي وذلك باستعمال الفوسفيتز ، ثم تربط بقطع DNA الحاوية على مجاميع الفوسفات بالانزيمات اللاحمة وبالتالي يتم الحصول على الناقل او البلازميد المتأشب Chimeric plasmids وبتركيب ملتف جدا cccDNA (Covalently closed circular) . ويجب ان يكون البلازميد بشكل حلقة كي يستطيع التضاعف في الخلايا المضيفة وهي *E. coli* في المراحل الوسطية ثم يتم انتخاب الخلايا التي التقطت الجين المطلوب . والخطوط العامة للعملية موضحة في الشكل (42) .

فبعد ربط القطع بالناقل تنتج نواقل هجينة يتم إدخالها الى الخلايا المضيفة اما بطريق التحول او التنبيغ بالعائي او أي طريقة اخرى ملائمة (المارة الذكر) ، وفي حالة عدم ملائمتها يمكن استعمال طريقة التنقيب الكهربائي Electroporation وفي هذه الطريقة يمكن نقل الجينات الى احياء مختلفة ، اذ تخطط الخلايا مع قطع DNA ثم تعرض الخلايا لمجالات كهربائية عالية الفولتية لمدة وجيزة جدا مما يؤدي الى اضطراب الطبقات الخارجية من الجدران والاعشية الخلوية فاسحة المجال امام قطع DNA بالدخول ثم تعود الى حالتها الطبيعية . ويمكن ان تجرى على الخلايا الطبيعية او الجبيلات Protoplasts او Sphaeroplasts . او تستعمل طريقة القذف الحيوي Biolistics وفيه تخطط المواد الوراثية مع جسيمات صغيرة من فلز ويستعمل التنكستن او الذهب ، وتكون هذه الجسيمات بقطر اصغر من 1 مايكرومتر وتقذف بوسائل خاصة مثل مدفع الجزيئات Particle gun الذي يتصل بأنبوبة بقطر 0.22 مايكرومتر لحمل الجزيئات ، ثم تحقق بسرعة كبيرة لتدخل الى داخل الخلية . ويمكن تطبيقها مع كل الخلايا او مع العضيات مثل المايكوندريا ، وتستعمل للخلايا والأنسجة لذلك يمكن ان تستعمل لعلاج خلايا الإنسان الجسمية بالجينات ضمن ما يعرف بالعلاج الجيني Gene therapy .



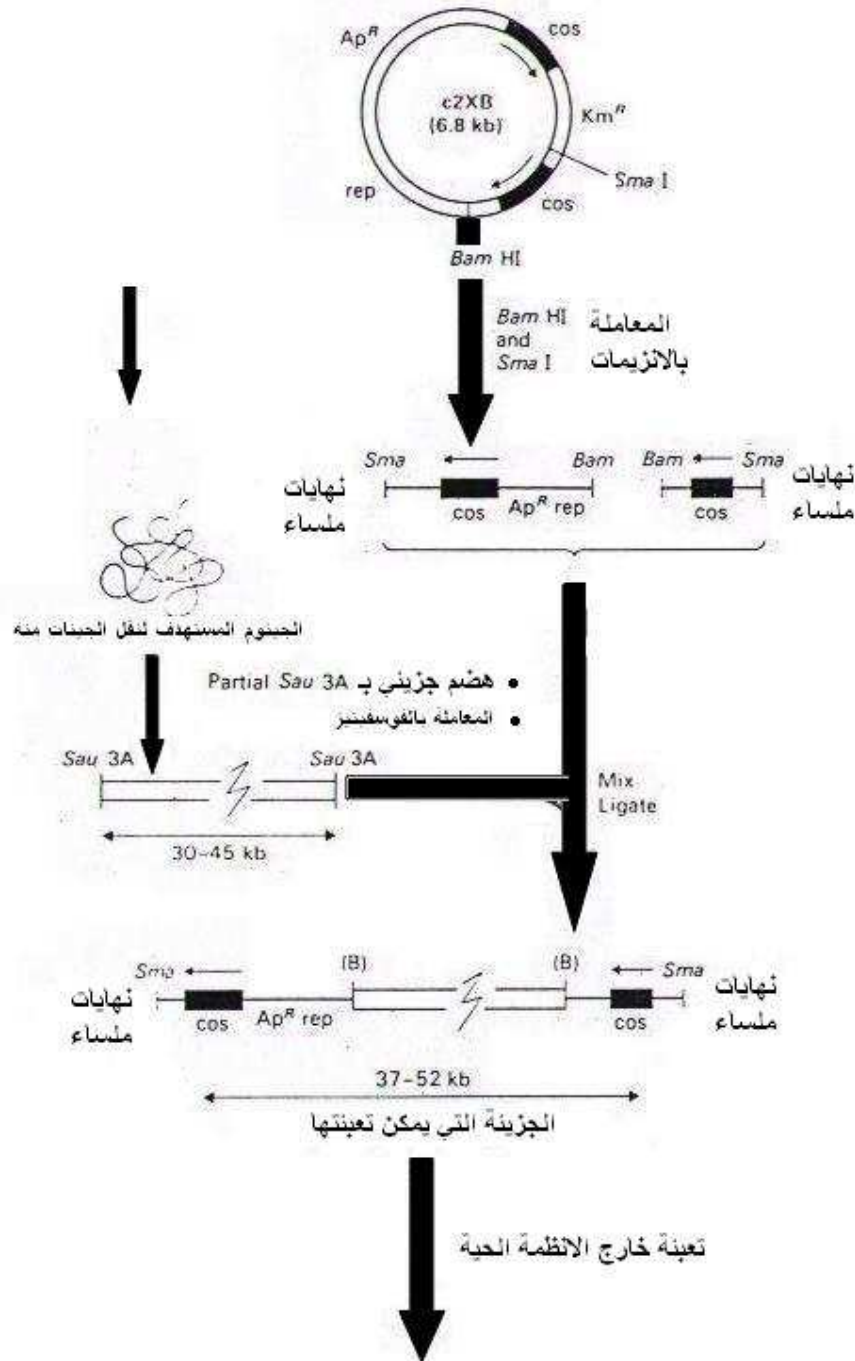
شكل 41 : الخطوط العريضة لكونة الجينات

وعمليات التنقيب الكهربائي والقصف الحيوي وان كانت ملائمة للأغلبية العظمى من الخلايا والتي ساعدت في فهم التعقيدات وفشل طرق التوصيل الاخرى ، ولكن هذه الطرق لها ما يعيق استعمالها منها انها تحتاج الى جهد كبير ووقت طويل وكذلك صعوبة إعادة التجارب بنتائج متطابقة . كما ان الطرق تحتاج الى دراسة ووضع الظروف المثلى لكل سلالة يراد تحويلها واستعادة الجدران الخلوية في حالة استعمال خلايا منزوعة الجدران (الجبيلات) وقد وجد ان عملية تنقيب الخلايا الكاملة تكون متغيرة بشكل كبير وتعتمد على عدد من الظروف منها :

- الوسط المستعمل لتنمية الخلايا .
- طور النمو الذي تكون فيه الخلايا عند استعمالها .
- تركيز الخلايا النهائي للنموذج المستعمل .
- مكونات وتركيبية وسط التنقيب .
- المؤشرات الكهربائية .

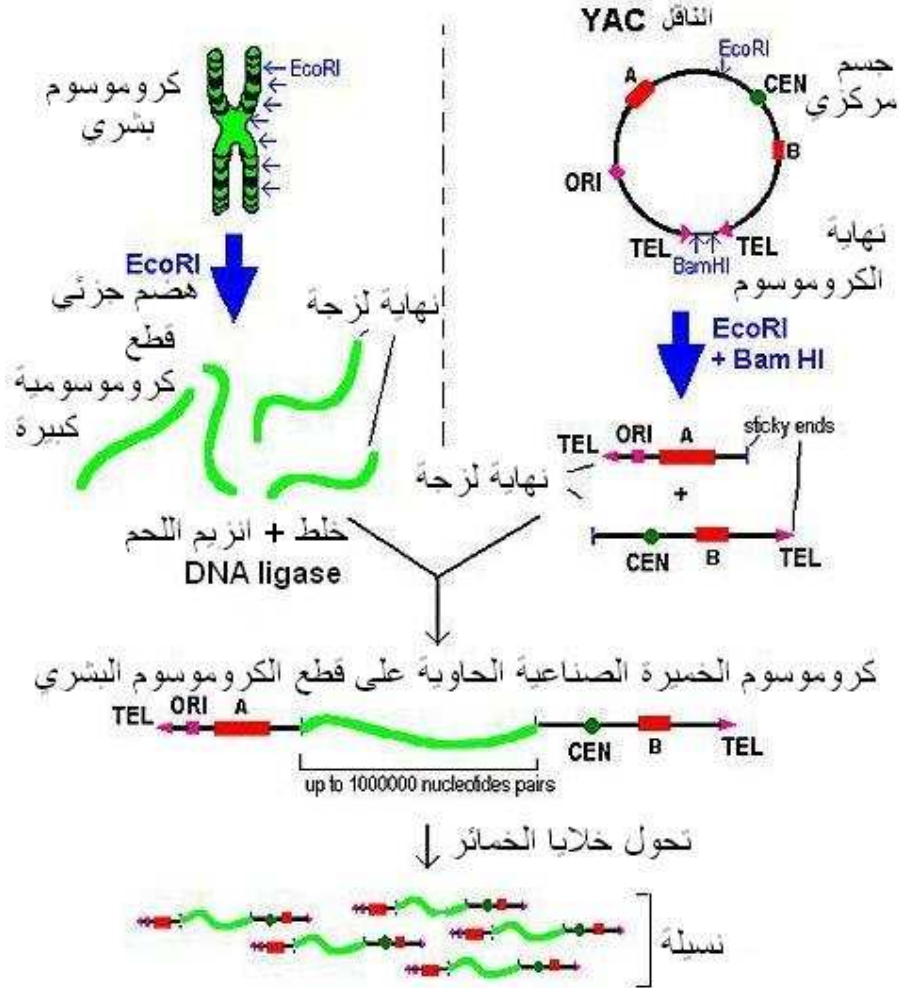
• الظروف المستعملة لانتخاب الخلايا المحولة .

فعند استعمال النواقل المشتقة من الفيروسات مثل الكوزميدات فتدخل الخلايا بعملية التنبيغ والتي تستعمل في نقل جينات اللبائن الموضحة خطوطها العريضة في الشكل (43)



شكل 43 : كلونة جينات اللبائن باستعمال الكوزميدات

اما عندما يراد نقل قطعة كبيرة من جينوم اللبائن او الانسان فتستعمل YAC والخطوات موضحة في الشكل (44)



شكل 44 : نقل القطع الكبيرة او الجينات البشرية بواسطة كروموسومات الخمائر الصناعية YAC

ومن الخلايا المستعملة كمضاييف لتسلم قطع DNA المهجنة او النواقل المهجنة هي خلايا بدائية النواة وبشكل خاص *E. coli* ، اما من الاحياء حقيقة النواة فتستعمل الخمائر بشكل رئيس وان كان ممكنا استعمال الخلايا الحيوانية والنباتية وذلك يعتمد على عدد من الأمور مثل صلاحية إشارات الانتساخ في الخلية المضيفة وقابلية تحويل البروتينات بعد الترجمة وغيرها . ويمكن ان تمرر النواقل في اكثر من مضيف خاصة عند استعمال النواقل المكوكة . ثم بعد تكثير النواقل يمكن ان تعاد الى الخلايا الأصلية او الى خلايا أخرى منتجة .

الخطوة الرابعة :

الكشف عن الخلايا المكلونة ، وتعد الخطوة الأخيرة في عمليات الكلونة ، وهناك عدة طرق للكشف عن الخلايا التي التقطت الجين المطلوب . وكما مر ذكره ان اغلب النواقل تحمل صفة مميزة لها مثل مقاومة المضادات الحيوية او طفرات العوز الغذائي Auxotroph . وهذه الصفات يمكن ان تستعمل بشكل مباشر في التحري كما يمكن استعمال الصفات الكيموحيوية والطرق المناعية والتي تطورت بشكل هائل باستعمال الأجسام المضادة وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies التي ترتبط بحاتمة واحدة Epitope لتحديد الخلايا او النسيلة Clone وهي الافراد الناتجة من خلية واحدة التقطت الجين من مجموع الخلايا ، ويمكن استعمال الطرق الكيماوية المشعة وذلك باستعمال نيوكليوتيدات تحوي الفسفور المشع ^{32}P التي تدمج مع DNA بفعالية الانزيم DNAP . وهذه الطريقة غير مفضلة لقصر العمر النصفي للفسفور المشع او المعلم ، وهي حوالي اسبوعين اضافة الى خطر الاشعاع المرافق لاستعمالها . ويمكن استعمال طرق تهجين الحوامض النووية للكشف عن الجين الملتقط فيما اذا توفرت مسابر DNA (Probes) او RNA ملائمة . كما ان الجين الذي ادخل في مكان بحيث لا يؤثر على تضاعف الناقل ، فالأخير يمكن تضخيمه او تضخيم نواتجه ثم تنقى وتدرس ، كما يمكن اجراء تحوير في الجين المنقول ومقارنته بخارطة القطع له اذا كانت متوفرة .

تحليل DNA المكلون : وتعد الطريقة مهمة للكشف عن قطع DNA المكلونة وتستعمل فيها مسابر DNA . وهذه المسابر DNA probes تستعمل في دراسة تواليات الحوامض الامينية في البروتينات الناتجة بشكل غير مباشر وتحضر المسابر من استعمال cDNA المشفر له بـ mRNA والتي تستعمل لتحديد التواليات في الجين المكلون .

وهناك عدة طرق مثل :

- استعمال تهجين DNA للـ RNA بواسطة Northern blots التي يمكن ان تعطي معلومات حول الكميات المختلفة من RNA .

- يمكن تحضير تواليات معينة من DNA بواسطة انزيمات القطع تفصل على الهلام وتهجن مع DNA الناتج من الكلونة باستعمال Southern blots . وكلونة القطع تمكن من عزل المناطق المحيطة بـ DNA بطريقة تعرف Chromosome walking .

- اما طريقة Western blot والمستعملة بكثرة فهي تعتمد على الأجسام المضادة لتحديد الجين المكلون وذلك بارتباط الأجسام المضادة الى البروتينات الناتجة من الجين المكلون .

وتستعمل مسابر DNA بكثرة في عمليات التحليل وخاصة في الطب الشرعي والكشف عن العيوب الوراثية في جينوم الإنسان والتي تستعمل في الاستشارات الوراثية . كما انها تستعمل في الكشف عن الاحياء ذات المتطلبات الكثيرة Fastidious في النماذج السريرية التي يصعب تنميتها ،

وتستعمل في تشخيص العوامل المرضية بسرعة ومباشرة في الأنسجة . وتوجد مجسات لعدد من الأحياء المرضية صعبة الزراعة مثل *Mb. tuberculosis* و *Chlamydia trachomatis* . واستعمال المسابر لها بعض المتطلبات مثل المسابر نفسها وطريقة اعطاء الاشارات وكذلك نوعية اهداف DNA التي تحضر المسابر لها وظروف التهجين التي تستعمل اثناء تطبيق استعمال المسابر . فالمسابر الكبيرة تعطي نتائج أكثر صحة وذلك لأنها أقل حساسية للتغيير بنيوكلو تيد واحد في DNA المستهدف ، في حين ان المسابر الصغيرة تكون سريعة الاستجابة وحساسة جدا ويمكن ان تصمم لمناطق محددة وثابتة من DNA والتي لم يتم إحلال أي قاعدة غريبة فيها . وترتبط عملية استعمال المسابر مع تقنية PCR التي تستغل لتضخيم قطع DNA التي تهجن مع المسابر وهي طريقة افضل من استخدام المسابر مباشرة . وترتبط المسابر بجريئة إعلان مثل بعض الانزيمات التي تعطي ألوان محددة يمكن قياسها .

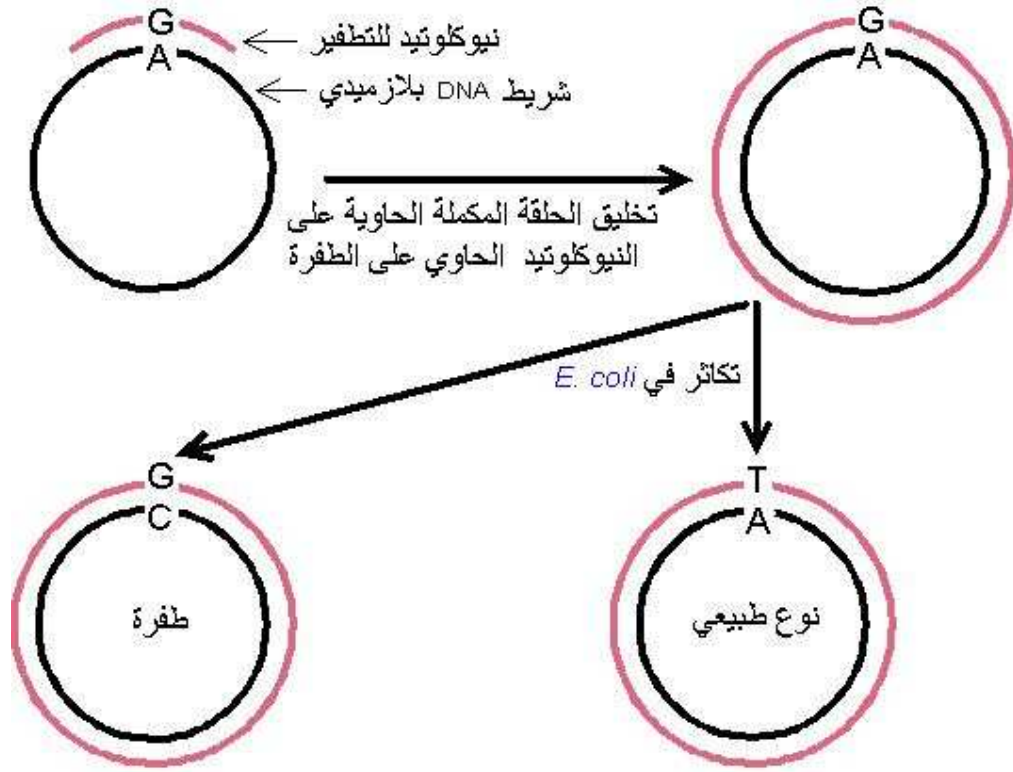
التطفير الموجه Site – directed mutagenesis

الفوائد من الخطوات المستعملة في الهندسة الوراثية مكنت من اجراء عمليات تطفير في مواقع محددة من الجينات ، والتي تكون مفضلة على عمليات التطفير العشوائي ، فالتخليق الكيماوي للنوكلو تيدات القليلة مكن العاملين من إحلال بعض القواعد او النيوكلو تيدات في توالي محدد من DNA ، وهذا الإحلال يستعمل لإظهار طفرات مصممة للتأثير على التعبير الجيني ، مثل دراسة تأثير إحلال حامض أميني مكان اخر على وظيفة البروتين الناتج لغرض تنشيطه او تثبيطه .

ويتم تحضير النيوكلو تيدات بالتوالي المطلوب الذي يحوي على الطفرة وتهجينها مع عاثيات مفردة الاشرطة من DNA ذات تواليات طبيعية ، كما موضح في الشكل (45) .

والتركيب الناتج يكون متباين Replicative heteroduplexes ويحول بواسطة الانزيمات الى شكل مزدوج الاشرطة الذي يستطيع التضاعف معطيا جزيئات او اشرطة ، واحد طبيعي واخر يحمل الطفرة يستعمل لاصابة البكتريا المضيفة بطريقة التحول ويتضاعف الجين في داخلها ويؤدي الى انعزال النوع الطبيعي والنوع المطفّر ، والاخير يمكن ان يعزل ويكلون .

وقطع النيوكلو تيدات المخلقة كيماويا يمكن ان تحضر لتحتوي على مواقع عديدة من مواقع الفلق بانزيمات القطع تسمح بادخال DNA محور وتشفر لبروتينات مطفرة او حاوية على طفرات متعددة وبذلك يمكن إنتاج بروتينات معينة مثل ذات المستضدية المتغيرة وبروتينات فاقدة للسمية وغيرها .



شكل 45 : التطهير الموجه

استعمالات الهندسة الوراثية

تقدم المعلومات الوراثية روافد لا تنقطع من المعلومات التي تساعد في توجيه استعمالات الاحياء لإغراض معينة والتي كان نتيجتها بروز الهندسة الوراثية وتخطي حواجز النوع والجنس في الاحياء مثل إدخال الجينات البشرية والحيوانية في خلايا بسيطة سريعة النمو لإنتاج البروتينات البشرية . وتركز فصول الكتاب القادمة على تطبيقات هذا المجال ولكن لا ضير من ذكر بعض الاستعمالات .

● ساعدت الهندسة الوراثية في تحسين النباتات وأدائها ، وعمليات تربية وتحسين النباتات بدأت منذ أمد ومن زمن بعيد قبل التعرف على القوانين الخاصة بتوارث الصفات والهندسة الوراثية ، ولذلك فإن التطورات التي حصلت في القرن المنصرم جعلت عمليات التربية والتحسين تقنية معتمدة على العلم ، وقد أثمرت العديد من التجارب في تحسين بعض المحاصيل من ناحية المقاومة للإصابة ببعض الحشرات . وكان ذلك بنقل الجينات بطريقة الهندسة الوراثية لتحمل صفات جديدة لم يكن بالإمكان الوصول إليها بالطرق التقليدية . وقد أنتجت العديد من ضروب الرز والقمح والقطن المقاومة للإصابة بالحشرات والأمراض . كما انها ساعدت في عمليات التدعيم الحيوي Biofortification للمحاصيل لغرض مواجهة الجوع وسوء التغذية مثل انتاج الرز الذهبي Golden rice الذي هندس وراثيا لزيادة محتواه من فيتامين A والحديد والذي يساعد في إنقاذ ملايين البشر والاحياء ، كما انه توجد

توجهات في عالم النبات لإنتاج اللقاحات المأكولة Edible vaccines ضد الامراض المميتة ، كما في انتاج بعض الأجسام المضادة للاسهالات في الموز لاستعماله في تغذية الاطفال .

• ساعدت الهندسة الوراثية وأثمرت عمليات تحديد خرائط القطع Restriction maps للعديد من قطع DNA والتي ساعدت بدورها في إيجاد توالي القواعد النتروجينية في المواد الوراثية DNA sequencing لانها ستزود بقطع صغيرة من Subclone التي تتعرض لعمليات تحليل دقيق لتحديد التوالي . الخرائط وفرت وسيلة لمعرفة حجوم الجينات وعلاقة ذلك بوظائفها . ووفرت ايضا معرفة قطع DNA المراد نقلها والتي تعد الخطوة الاولى في عملية الكلونة .

كما ان عملية تحديد توالي القواعد في DNA يساعد في إظهار تركيب الجين وبالتالي إمكانية تحديد المنتجات التي يشفر لها ، أي معرفة الجينات التركيبية والجينات المنظمة وتحديد المناطق الحساسة Hot spot لحدوث الطفرات . ومقارنة تواليات الجينومات الوراثية يمكن من الكشف عن العلاقة بين الأحياء ومراحلها التطورية وإيجاد شبكة من المعلومات تساعد في تصنيف الأحياء والفيروسات (كما سيأتي ذكره لاحقا) ، لان المعلومات عن المناطق الثابتة من الجينومات التي لم يطرأ عليها تغير اثناء التطور يمكن ان تستعمل كأساس للتصنيف مثل تواليات 16S rRNA .

وهناك عدة طرق لتحديد التوالي منها :

• طريقة Maxam – Gilbert والتي تعتمد على عدم الثباتية الكيماوية النسبية لبعض أو اصر النيوكليوتيدات .

• طريقة Sanger وتعتمد على قطع او إيقاف عملية الاستطالة للـ DNA وادماج dideoxynucleotides في التوالي ثم الكشف عنها .

وقد ساعدت في وضع الخرائط الطبيعية Physical maps للكروموسومات التي تم تحديد تواليات DNA لها ، وهذه تكون مهمة من عدة نواحي :

- يمكن تطبيقها على أي بكتريا وبدون الاعتماد على وجود محددات معينة في الكائن الحي .
- تمكن من قياس حجم الجينوم بدقة .
- تمكن من التعرف على كل متضاعف من الجينوم الكلي .
- استعمال الفيروسات او النواقل المحورة في العلاج الجيني (الذي سيمر ذكره في فصول قادمة).
- تعد كمالات لدراسات التواليات .

ومما ساعد في وضع الخرائط الوراثية والفيزيائية او الطبيعية :

1 – استعمال مكتبات الكوزميدات .

- 2 - استعمال خرائط القطع بالانزيمات القاطعة .
- 3 - استعمال فحص التكامل .
- 4 - استعمال مسابر DNA وتهجين Southern hybridization .
- 5 - وجود قواعد معلوماتية حيوية (Bioinformatics) للعديد من DNA وبروتينات الأحياء

المعوقات

ان ما ذكر اعلاه حول الهندسة الوراثية وجوانبها المشرقة وإمكانيتها التي تكاد ان تكون غير محدودة قد يصطدم بقلة المعلومات - على الاقل في الوقت الحاضر - اذ انه لم يتم لحد الآن وضع الخرائط الكروموسومية للعديد من الاحياء المهمة جدا ، وذلك فالحاجة مهمة لوضع قواعد معلوماتية لغرض الرجوع اليها (يراجع الفصل الرابع عشر) .

كما ان البكتريا والتي تعد أفضل المضاييف لتخليق البروتينات ولكن ليس كلها وذلك لان بعضها يحتاج الى وجود الأواصر ثنائية الكبريتيد لغرض بناء البروتينات ، كما انه من الصعوبة إدخال DNA لا يحوي على مجموعة المثل من الخلايا الحيوانية الى البكتريا والا تعرض للهضم بإنزيمات القطع ، وان أمكن التغلب عليها في بعض هذه الجوانب .

إضافة الى إمكانية تلاشي الاحياء المهندسة وراثيا من البيئة التي يمكن ان تفترس من قبل الاحياء الاخرى كما ان إطلاق الاحياء المهندسة وراثيا الى البيئة لا يزال يلاقي معارضة شديدة . وعليه نشأ علم الأخلاقيات الحيوية Bioethics وهو احد فروع علم الأخلاق والفلسفة والتفسيرات الاجتماعية الذي يهتم بعلوم الحياة وتأثيراته على المجتمع ، ولذلك يلاحظ ان مشروع الجينوم البشري العملاق خصص 3 % من ميزانيته للاهتمام بالجوانب الأخلاقية وما يتبعها من جوانب اجتماعية وسياسية . وقد خصص هذا الجزء من الميزانية لدراسة التأثيرات الجانبية المحتملة للأدوية الجديدة المعتمدة في اكتشافها على توالي النيوكليوتيدات في الجينوم البشري وحاجة المرضى لها والإسراع في انتاج المفيد منها ، وأكثر هذه المجالات تحسسا هو استعمال الأحياء المهندسة وراثيا ربما بشكل مباشر للإنسان كما في استعمال بكتريا حامض اللاكتيك في الأغذية الصحية او المصممة ، وكذلك دراسة دور التقنية الحيوية والهندسة الوراثية في بحوث المضغ والأجنة ، واستعمال المواد الوراثية في استثمارات التقنية الحيوية ، ومشاكل اخرى كثيرة لا تحدها قائمة او تحصرها حدود .

تصنيف الاحياء المجهرية وعلاقتها مع بعضها

الصفحة	الموضوع
144	الأسس الجزيئية المستعملة
147	التداخل بين الأحياء المجهرية
149	التصنيف المقترح
149	المجاميع الانتقالية
150	البكتريا
150	الاركيا
151	الأحياء حقيقة النواة

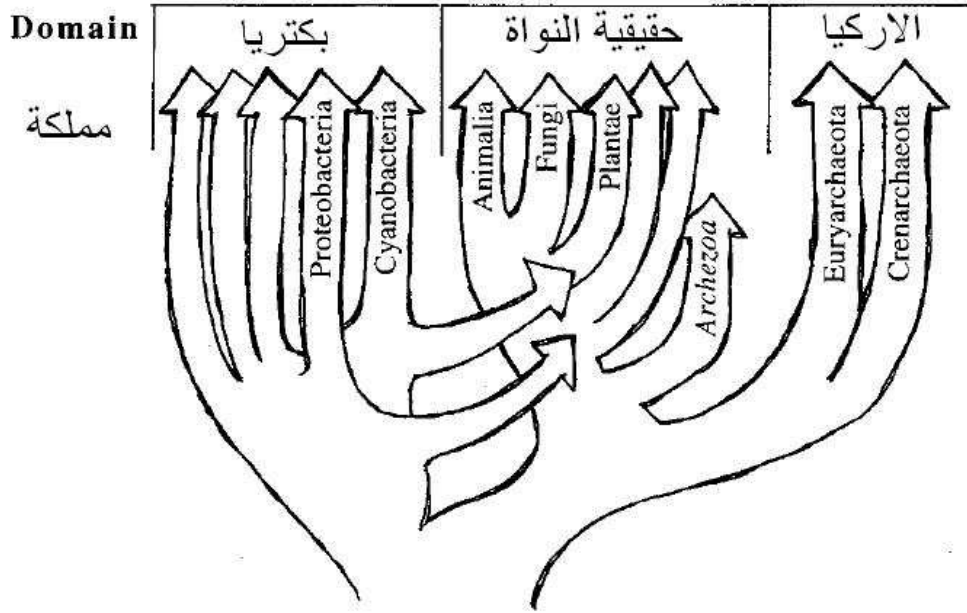
تصنيف الأحياء المجهرية وعلاقتها مع بعضها

عملية تصنيف الاحياء المجهرية وإيجاد العلاقات التطورية بينها تكاد تكون عملية غير مجدية ، وعملية التصنيف هي حالة متحركة - على الأقل بالنسبة للاحياء المجهرية - لذلك يلاحظ ان هناك تغييرا مستمرا في تسمية الأجناس والأنواع ونقلها من موقع الى اخر ، والمراجع الخاصة مثل الدوريات وكتاب تصنيف البكتريا Bergye's Manual في كل طبعة يتم اعادة ترتيب الاحياء فيه . واهمية الموضوع بالنسبة للتقنية الحيوية تنبع من مقولة انه من الأفضل اختيار الاحياء وإجراء المسح بعد الرجوع الى القواعد التصنيفية والقواعد المعلوماتية لتوالي جينومات الاحياء ، ولكن هذا التوجه قد يكون مصيبا في بعض الأحيان ومخطئا في الكثير من الاحيان . ويختلف العاملون في هذا المجال ، فالشركات تريد اجراء عمليات المسح بمستوى مئات بل الآف الفحوص نظرا لتوفر الطرق الملائمة ولكن من وجهة نظر الباحث الذي قد يحصل على عزلة او سلالة ذات إنتاج كبير لمادة ما وموافقة لأسس السلامة ، هل يتركها ؟ لانه لا تعرف هويتها التصنيفية ؟ وفي هذا المجال يمكن ان يتسع الجدل . وفيما يلي عرض لبعض جوانب الموضوع .

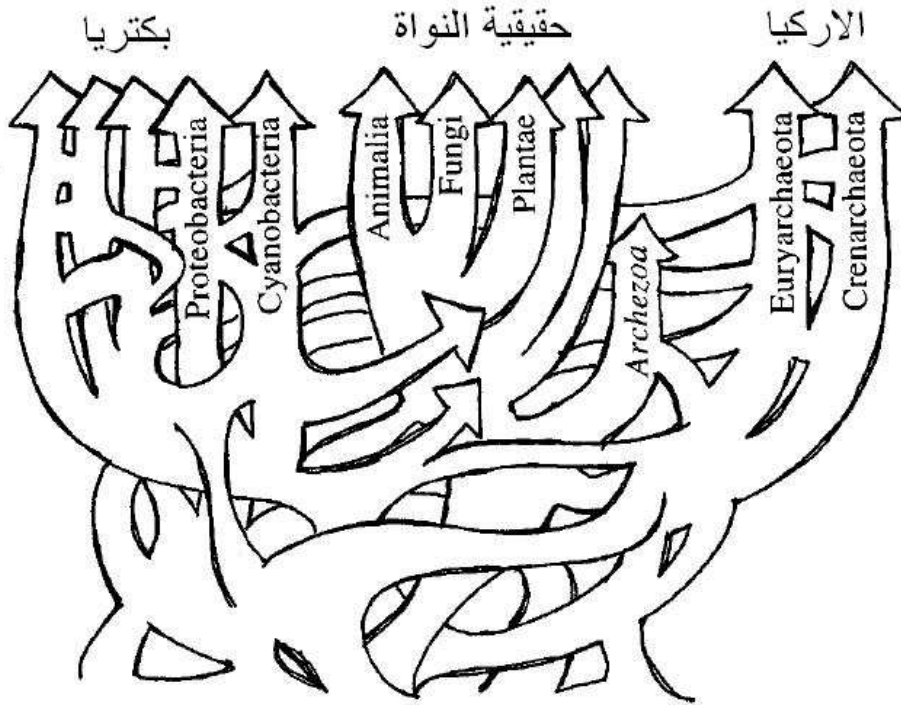
تعد عملية التصنيف غير مجدية الا في بعض المجالات ، وذلك يعود الى عدة اسباب منها :

1 - الافتقار لبعض العلاقات التطورية بين الاحياء ولعل اكبر الفجوات هي عدم امكانية الربط بين تطور الاحياء حقيقة النواة من بدائية النواة . ومحاولة وضع شجرة الحياة تكاد تكون مهمة صعبة ومتغيرة ، فوضع مثل هذه العلاقة التطورية يختلف من وقت لآخر وتزداد الاختلافات وعدم الوضوح كلما تطورت التقنيات والوسائل الدراسية وكما يتضح من الشكل التالي (شكل 46) الذي يوضح العلاقة بين افرع الحياة والفرق في تشعباتها أثناء عقد من الزمن (1991 - 1999) .

2 - يلاحظ ان مجتمعات الاحياء المجهرية تتداخل فيما بينها اضافة الى تداخلها مع الاحياء الراقية . وقد يكون التداخل مفيدا للاحياء كي تعيش ، ومعظم هذه التداخلات تعود بالمنفعة على الاحياء كما هو الحال في أمعاء الإنسان والذي يستفيد منه الطرفان ، ولكن قد تكون العلاقة غير ذلك كما في حالة التطفل التي تكون مؤذية للمضيف . وفي الحالتين وبمرور الزمن تؤدي العلاقة الى فقدان الوظائف (وبشكل خاص للاحياء المجهرية) وتصبح غير قادرة للعيش لوحدها ، فمثلا *Mycoplasma* وهي من الاحياء بدائية النواة ، أدى تطفلها الى فقدانها قابلية تخليق الجدران الخلوية وكذلك ادى الى اندماج كميات من الكولسترول في أغشيتها الخلوية والصفقات لا توجد في الاحياء بدائية النواة . والحالة المشابهة الأخرى الموجودة في مجموعة *Chlamydiae* و *Rickettsiae* وهي احياء صغيرة جدا يصل قطرها الى 0.2 - 0.5 مايكرومتر تعتمد على الخلايا المضيفة في العديد من المواد الايضية ومنتجات الانزيمات ، وهذا انعكس على وجود جينومات صغيرة وجينات قليلة .



العلاقة التطورية باستعمال توالي 16S rRNA



العلاقة التطورية باستعمال توالي 16S rRNA

وتوالي البروتينات والمؤشرات الجزيئية الاخرى

شكل 46 : شجرة الحياة المقترحة للعلاقة التطورية بين
الاحياء

ويمكن ان يذكر في هذا المجال حالة الماييتوكوندريا والبلاستيدات وهي الاجهزة المزودة للطاقة في الخلايا حقيقة النواة والتي يعتقد - ونظرا لوجود شواهد كثيرة - انها جاءت من عملية تعايش Endosymbiosis لخلايا بدائية النواة داخل خلايا حقيقية النواة . والعملية التعايشية ادت الى فقدان الخلايا بدائية النواة لبعض من جيناتها وانتقالها الى جينوم الخلايا حقيقية النواة وبالتالي أصبح الاثنان غير قادران على العيش بحالة منفصلة .

3 - وجود حالات الانتقال الأفقي للمواد الوراثية والجينات أدت في بعض الاحيان الى فقدان الكائن لهويته ، وان كانت هذه العملية مقيدة بشروط .

4 - وجود عوامل التطور مثل وجود التواليات قصيرة السلسلة SSR سواء في بدائية النواة او حقيقية النواة وما يمكن ان تفقد اليه من تغيير تواليات المواد الوراثية ، وتغير الجينات من خلال عمليات إدلاف الجينوم Genome shuffling او Panmicticism .

5 - قصور عمليات تحديد توالي الجينوم DNA sequencing في المناطق المشفرة في تحديد الانماط المظهرية نظرا لوجود اختلافات في الشفرات ، اذ ان العديد من الحوامض الامينية يشفر لها بأكثر من شفرة وراثية .

6 - قصور الطرق المستعملة في التصنيف فمثلا البكتريا يصعب تصنيفها اعتمادا على الشكل الخارجي او الصفات المورفولوجية لمحدوديتها ونظرا لبساطة الاختلافات ولذا فالاعتماد عليها يعد غير سليم او معلول .

ولكن لا تزال تستعمل صبغة كرام التي استعملت عام 1884 من قبل Christian Gram ولحد الان لم يعترض احد على استعمالها ، والحقيقة ان الاستجابة لصبغة كرام ليست دائما مرضية وذلك لانها تعتمد على الحالة الفسلجية للخلايا وسلامتها ، كما انها تعتمد بشكل كبير - فقط - على تركيب الجدار الخلوي ، ففي الخلايا الموجبة لصبغة كرام تمتلك جدار سميك يصل سمكه الى 20 - 80 نانومتر ، مكون من الببتييدوكلايكان ذات الاتصالات العرضية الكثيرة ويشكل 40 - 90 % من وزن الجدار ويحوي على حامض التيكويك و Teichouronic acid وسكريات مكوثرة ، ووضعت هذه وفق تصنيف Bergye's (1984) ضمن مجموعة Firmicutes ووضعت معها البكتريا المتغايرة لصبغة كرام . اما البكتريا السالبة لصبغة كرام الحقيقية وضعت في مجموعة Gracilicutes وهي التي تحوي على طبقة رقيقة من الببتييدوكلايكان (2 - 3 نانومتر) وتحوي على غشاء خارجي حاوي على LPS . اما Mycoplasma فيكون الغشاء الخلوي هو الحاجز الخارجي وبذلك لا تعد صبغة كرام ملائمة .

ان ايجاد العلاقة التطورية بين الاحياء شغلت العاملين في مجال علوم الحياة قرون طويلة ، وذلك لان كل الاحياء تحوي على جزيئات حيوية لها علاقة مع بعضها ، كما ان الاحياء تتبع نمط معقد

للتكاثر والنمو . وتشير الدراسات الحفرية ان الاحياء اللاهوائية ظهرت قبل ظهور الأوكسجين على الأرض ، اما الهوائية فنشأت عندما اصبح الأوكسجين ثابتا ومتوفرا بكميات كبيرة على الارض في وقت متاخر ، وبما ان اغلب الاحياء حقيقية النواة تحتاج الأوكسجين وان الاحياء اللاهوائية تكاد تنحصر في الاحياء بدائية النواة لذلك يعتقد ان بدائية النواة وجدت قبل حقيقية النواة .

وبعد اكتشاف المجهر في القرن السابع عشر ودراسة الاحياء الموجودة من الناحية الشكلية قسمت الاحياء الى احياء بدائية النواة وحقيقية النواة ، والتي تختلف في عدة صفات :

- وجود النواة المحاطة بغشاء كتركيب مميز في حقيقية النواة .
- وجود العضيات الداخلية المفصولة عن بعضها بالأغشية في حقيقية النواة .
- وجود الهيكل الخلوي في حقيقية النواة وانعدامه في بدائية النواة ما عدا بعض الاستثناءات التي تشير الى وجود نوع بدائي منه في بعض الاحياء بدائية النواة مثل الاركيا .
- وعليه قسمت الاحياء الى بدائية النواة وتضم أي كائن لا يحوي على نواة محاطة بغشاء . اما الحقيقية النواة فقسمت الى عدة مجاميع هي Animalia , Plantae , Prototista والفطريات اعتمادا على الصفات الشكلية وبمساعدة سجلات الحفريات . وفي عام 1977 تم عزل الاركيا في مجموعة مميزة والتي تمثل الشكل الثالث للحياة ، وبذلك اصبحت الاحياء بدائية النواة تحوي على البكتريا والبكتريا القديمة Archaeobacteria والتي غيرت الى Archaea والبكتريا الحقيقية Eubacteria .

الأسس الجزيئية المستعملة في التصنيف

ادى اكتشاف الطرق الملائمة لدراسة الجزيئات واستعمالها في نهاية الخمسينات وبداية الستينات الى تطورات كبيرة في مختلف المجالات منها استعمالها في عمليات تصنيف وإيجاد العلاقات بين الاحياء ومنها :

- 1- استعمال المواد الوراثية : وهي الطرق التي تعتمد الى تحديد توالي النيوكليوتيدات في المواد الوراثية ، او تهجين الحوامض النووية . ومن الجزيئات المعتمدة في تحديد التوالي استعمال rRNA الموجودة في الوحدة الصغيرة من الرايبوزوم (Small subunit rRNA) SSU rRNA او (16S rRNA) ، وهذه الدراسات أسفرت عن تقسيم الاحياء الى ثلاث مجاميع .
- I - خلايا حقيقية النواة وتضم معظم الاحياء .
- II - البكتريا الحقيقية وتضم البكتريا السالبة والموجبة لصبغ كرام والبكتريا المزرقة .
- III - البكتريا القديمة والتي غالبا ما تعيش في ظروف متطرفة مثل الاحياء المولدة للميثان Methanogenes والاحياء المحبة لحرارة متطرفة Extreme thermophiles والاحياء المحبة للملوحة المتطرفة Extreme halophiles .

وعليه فان هذه الدراسات اسفرت عن ان الاحياء بدائية النواة تضم مجموعتين هي البكتريا الحقيقية والبكتريا القديمة ولا تتقاطع مع الاحياء حقيقية النواة ، وقد اقترح اسم الاركيا Archaea للإشارة الى انه ليست لها علاقة بالاحياء بدائية النواة من البكتريا والبكتريا الحقيقية .

وادخل مفهوم النسبة المولية GC في جينوم الخلايا ليكون احد المؤشرات المستعملة في التصنيف على الأقل للتصنيف الثانوي مثل تقسيم البكتريا الموجبة لصبغة كرام الى مجموعتين احدهما عالية المحتوى وأخرى واطئة المحتوى .

2 - تحديد الحوامض الامينية في البروتينات : وهي طريقة مكملية لما ذكر اعلاه ، ولذلك يمكن اعتماد توالي القواعد النتروجينية وتوالي الحوامض الامينية في البروتينات لتحليل العلاقة التطورية ، اما بالنسبة للتواليات التي لا تشفر للبروتينات مثل الجينات المختلفة للـ rRNA و tRNA والانترونات فيمكن اعتماد تواليات القواعد النتروجينية فقط .

وقد اعتمد على البروتينات في تحديد العلاقة او التصنيف وذلك لان وجود مناطق مقحمة ثابتة Insertion ومناطق حذف (Indels) Deletion (مناطق الاقحام - الحذف) في تسلسل البروتينات ، كما يعد توالي التوقيع او الطمغة Signature sequence من العوامل المساعدة في دراسة العلاقات التطورية بين الاحياء .

ومما يعزز استعمال Indels هو توزيعها المنتظم في افراد النوع الواحد وهذا يشير الى انها دخلت الى الأجداد وانتقلت الى الأحفاد ولذا يعتقد البعض انها واسمة مهمة للتمييز بين المجاميع الرئيسة للاحياء ، ولكن مرة اخرى فان استعمالها قد لا يكون نهاية المطاف نظرا لوجود الانتقال الأفقي للمواد الوراثية او انها اقحمت في مناطق متعددة من الجينوم ويمكن ان تكون قد تضاعفت .

وتسلسل الطمغة في البروتينات يعرف على انه مناطق اصطفايف يمكن ان توضح أي تغيير في التركيب الأولي للبروتين في كل الانواع التابعة لوحدة تصنيفية وليس الانواع التابعة لوحدة تصنيفية مختلفة . والتغيرات الموجودة في تواليات الطمغة توضح وجود حامض اميني بديل او حصول عمليات حذف وازافة Indels . وفي جميع الاحوال فان تواليات الطمغة عند اعتمادها يجب ان تكون من النوع المحاط بتوالي ثابت . ولذلك فالتواليات Indels ذات الطول المحدود والتسلسل المحدد المحاطة على الجانبين بمناطق ثابتة يشير الى ان التغيرات الحاصلة هي حقيقية وليس خاطئة في عملية الصف او تحديد التوالي .

وقد وجد ان استعمالها يؤدي الى نتائج جيدة في انواع مختلفة وتفسير ذلك ان هذه Indels قد اقحمت مرة واحدة أثناء عملية التضاعف ثم انتقلت عموديا الى الأحفاد .

وقد اقترح استعمال الحوامض الامينية في البروتينات على انه الأفضل وان كانت بعض الاقتراحات تجد ما يفندها ومنها :

1 - ان توالي الحوامض الامينية يعد صورة مطابقة لتوالي القواعد النتروجينية ولكن هذا لا يكون سليما حتى بالنسبة للحامض الاميني الواحد ، اذ يوجد اختلاف في الشفرات الوراثية Degeneracy codons واغلب الحوامض الامينية يشفر لها بأكثر من شفرة ما عدا الميثايونين والتربتوفان ، اضافة الى ان عمل الشفرة الوراثية الواحدة هو ليس عاما في كل الاحياء . اذ ان الموقع الثالث من الشفرة الوراثية والتي قد تختلف دون التأثير على الحامض الاميني في البروتين أي مبدأ المراوغة Wobble hypothesis والتي تحدث في الانواع القريبة من بعضها ، ولذلك فان إدراج مثل هذه القواعد في التحليل سوف يؤدي الى عدم التأكد من القاعدة النتروجينية في الموقع الثالث من الشفرة وبالتالي الى احتمالية عدم وجود علاقة تطورية

2 - لا توجد أفضلية لاستخدام تواليات الحوامض الامينية بدلا من القواعد النيتروجينية وذلك نظرا للاختلاف في احتواء الجينومات من GC بكميات مختلفة ، وهذه تكون حقيقية ومؤثرة حتى في الانواع التي تنتمي الى الجنس نفسه ، وتكون GC موزعة بشكل متجانس على الجينوم . وهذا الوضع يؤدي الى تفضيل بعض الشفرات Codon preference خاصة التي فيها اختلاف في الموقع الثالث من الشفرة

فالأحياء الحاوية على كميات كبيرة من GC فان الأفضلية في الموقع الثالث هي اما C او G والتي تصل الى 90 % من الحالات ، اما الاحياء ذات المحتوى الواطيء من GC فانها تفضل A او T في الموقع الثالث للشفرة ، ولذلك فان الانواع البعيدة عن بعضها ولكن حاوية على كميات متشابهة من GC قد تحتوي على القاعدة النتروجينية نفسها في الموقع الثالث وعند استعمال الحوامض الامينية تظهر تشابها كبيرا ولكن على اسس خاطئة ، ولذلك فان الموقع الثالث من الشفرة بدلا من يساعد في إعطاء معلومات اكثر فانه يعطي تحيزا في التحليل .

وكذلك الحال مع الشفرة الاولى فكل الخلايا بدائية النواة تبدأ بشفرة الميثايونين الحاوية على Formyl لذلك خاصة بالنسبة للموقع الاول والثالث فانها تؤدي الى نتائج مضللة . كما ان توالي القواعد في 16S rRNA لا يمكن الاعتماد عليه بشكل كبير .

واضافة الى ما ذكر فان تحديد التواليات سواء القواعد النتروجينية او الحوامض الامينية قد يتأثر بالاطفاء التقنية اثناء العمل ، ولكن الخطأ الواحد في حالة القواعد النتروجينية يشكل 25 % (باعتبار وجود 4 قواعد نتروجينية) ، اما الخطأ في الحوامض الامينية فان الخطأ الواحد يشكل 5 % على اعتبار وجود 20 حامض اميني . ويتأثر المقياس الجزيئي Ultimate molecular chronometer بعدد القواعد النتروجينية فمثلا في تواليات 16S rRNA في بدائية النواة يوجد 1500 قاعدة ، وفي حقيقية النواة يوجد 2000 وفي المايكوبكتيريا يوجد 612 قاعدة ، لذلك فعمليات الصف Alignment قد لا تكون منطبقة بالاعتماد على التوالي الاولى للنوكليوتيدات خاصة عند وجود كميات مختلفة من

GC في الاحياء المتباعدة ، لذلك يؤخذ بنظر الاعتبار التركيب الثانوي للـ rRNA والذي يكون ثابتا الى حد كبير ويمكن ان يعطي دليلا على المواقع المتجانسة في التواليات الأولية .

وبعد الدراسات التي اجريت حول تضارب اهمية دراسة التواليات سواء للبروتينات او القواعد النتروجينية استقرت الدراسات الحديثة واعتمدت على دراسة مجموعة من البروتينات التي يعتقد انها ثابتة لتساهم مع دراسات توالي DNA في التصنيف وايجاد العلاقات التطورية ومن البروتينات المستعملة عامل الاستطالة في ترجمة البروتينات EF-1 α / Tu و EF-2 / G والوحدات الفرعية I و II لانزيم الكوثر RNAP وبروتينات الصدمة الحرارية HSP70 و F-type ATPase و V- type ATPase ونواتج الجينات *trpB* , *trpD* , *his H* , *his F* , *his C* وانزيم نزع هيدروجين الكلوتامات و Glutamine synthetase ولعل اهم هذه البروتينات هو HSP70 الذي يكون تسلسل الحوامض الامينية فيه ثابتا بشكل كبير وذو حجم متشابه في العديد من الاحياء سواء في الاحياء بدائية او حقيقية النواة .

التداخل بين الاحياء المجهرية

التغيرات التي تحصل في افراد النوع الواحد اضافة الى تبادل المعلومات الوراثية تعد من اهم العقبات امام عملية التصنيف وتتبع العلاقة التطورية خاصة في الاحياء المجهرية .

ان النقل الافقي للمواد الوراثية يمكن ان يساهم بشكل فاعل في حدوث التطور خاصة في البكتيريا ، اذ يؤدي الى توليد مجموعة جديدة من الجينات في مجموع النوع الواحد ليكون متطبعاً لظروف بيئية معينة ثم ينقل التطبع الى احفاد المجموعة والى مجاميع اخرى تشغل البيئة نفسها . وعلى افتراض ان التطور الطبيعي الحاصل في النوع الواحد فان الجينات التي تشفر للعوامل التي يمكن ان تتداخل مع بيئات غير معروفة قد تكون ذات فائدة للخلايا وبالتالي للمجموع الذي تمثله الخلايا ، واغلب هذه الجينات توجد في مناطق تعرف المواقع ذات التطفر العالي او المفرط Hypermutable sites وهذه تسمح بوجود مرونة وراثية ولكن مع الحفاظ على سلامة الجينوم ، فمثلا في البكتيريا تكون التواليات القصيرة SSR التي يحصل بها تطفير عالي والذي يعطي مزايا انتخابية جيدة للخلية الواحدة ومن ثم للمجموع البكتيري ، وقد تم ايضاح ان العديد من التواليات القصيرة لها علاقة بجينات الضراوة التي تعمل في صالح البكتيريا .

كما ان هناك مناطق في جينومات الخلايا البدائية النواة قابلة للتطور بعدة وسائل اعتمادا على مكونات DNA ومدى إمكانية التعرف عليه من قبل الانزيمات المحورة له ، فتدميره يعد مصدرا أساسيا في حدوث الطفرات ، اضافة الى حدوث الاخطاء التلقائية اثناء التضاعف وحدث الطفرات لا يكون متساويا في كل مواقع الجينات ولكن توجد بعض المواقع المؤهلة لذلك مثل حدوث تغير من C

الى T في الاشرطة المشفرة وذلك اعتمادا على التركيب الخاص للقطعة والذي يعتقد ان التواليات القصيرة تقوم بذلك وتتغير لإظهار هذا النوع من التأثير .

كما ان تحديد العلاقة الوراثية تكون عملية معقدة وذلك لحصول عمليات Genome reshuffling بين سلالات النوع الواحد وهذه تعرف بـ Panmicticism . اما الانتقال الافقي للمعلومات الوراثية فهو لا يكون عاما ولو كان عاما لأصبح من غير الممكن تحديد الانواع بالاعتماد على توالي الطمغات . ولو ان بعض الدراسات تشير الى ان الانتقال الافقي عام ولكن حتى يحصل لابد من توفر بعض المقومات منها :

- 1 - ان الجين المنقول يجب ان يضيفي فائدة محددة للخلايا المستلمة .
- 2 - ان الظروف البيئية الانتخائية يجب ان تشجع نمو وبقاء الانواع التي استلمت الجين حتى يبقى في الخلايا .

ففي البيئة توجد الاحياء مجتمعة البعض منها ينتج المضادات الحيوية او أي وسيلة دفاعية اخرى ، وبالمقابل هناك احياء حساسة ولبقاء الاخيرة لابد انها تكون قد عانت من تغيرات في الأهداف التي تصيبها المواد المفروزة من الاحياء المجاورة لذلك فان الجينات الملائمة قد حصل لها انتخاب . وقد تكون المقاومة انتقلت من الاحياء المنتجة للمواد المضادة بعد موتها وتحللها . ومجموعة الجينات التي تنتقل في البيئات هي مجموعة صغيرة ويمكن أن تضيفي تكييف عام مثل المقاومة لمجموعة كبيرة من المواد المضادة او مقاومة ظروف بيئية مختلفة ، ويكون معدل وتكرار انتقال الجينات بين الخلايا عاليا عند ارتفاع درجات الحرارة .

ومن المفيد ذكره ان البكتريا السالبة لصبغة كرام قد أنشأت غشائها الخارجي وهذه تعد وسيلة دفاعية وذلك على الاقل لتقليل تأثير المواد المضادة للحياة ، كما انه يعمل كحاجز انتخابي تجاه الحرارة ، ولذلك يلاحظ ان العديد من البكتريا السالبة لصبغة كرام هي مقاومة بشكل طبيعي للعديد من المواد الكيماوية والمضادات الحيوية .

اما البكتريا الموجبة لصبغ كرام مثل *B. subtilis* وعند تحديد توالي جينومها وجد ان هناك حوالي 77 جين تشفر للـ ABC transporters وهذه تساعد في تخليص البكتريا من التأثير القاتل او السام للعديد من المواد الضارة بالخلايا .

ولذلك يلاحظ ان خلايا بدائية النواة قد طورت العديد من الوسائل للهروب من تأثير المواد السامة والضارة وربما كان هذا واضحا بالنسبة لانتشار المقاومة للمضادات الحيوية المستعملة في العلاج الذي تم على مدى زمني يعد قصيرا .

التصنيف المقترح

بناء على ما تقدم اقترح عام 1990 درجة تصنيفية اكبر من المملكة وهي Domain التي تحوي الاركيا ، البكتريا وحقيقية النواة Eucarya (كما موضح في الشكل 46) وسميت Three – life tree .

والملاحظات العامة حول التطور تشير الى ان :

1. ان المجاميع الثلاثة هي متساوية البعد عن بعضها .

2. ان الاركيا أكثر قربا الى الخلايا حقيقية النواة .

3. ان العلاقات الشائكة يمكن ان تنشأ من النقل الأفقي للجينات .

ويمكن استعمال دراسة التواليات سواء في الحوامض النووية او توالي الحوامض الامينية في البروتينات وتدعيمها بالصفات المظهرية والكيموحيوية يعني استعمال Polyphasic taxonomy قد يساعد في الوصول الى نتائج مرضية او مقبولة . ولكن يفضل البعض تصنيف الاحياء المجهرية الى أحادية الجلد او الغلاف Monodermata وتشمل الاركيا والبكتريا الموجبة لصبغة كرام من الاحياء بدائية النواة والحاوية على غشاء خلوي واحد .

والاخرى ثنائية الطبقة او الجلد Didermata وتتمثل بالبكتريا السالبة لصبغة كرام الحقيقة والحاوية على الغشاء الخارجي والى الداخل الغشاء الخلوي .

وتقسم البكتريا الموجبة لصبغة كرام الى مجموعة عالية المحتوى من GC وهي قريبة من البكتريا السالبة لصبغة كرام . ومجموعة واطئة المحتوى من GC .

المجاميع الانتقالية

توجد مجاميع انتقالية بين وحدات التصنيف المذكورة اعلاه ومنها :

• Cyanobacteria البكتريا المزرقّة تقع بين الاحياء اللاهوائية من البكتريا وحقيقيات النواة ، ان إطلاق هذه المجموعة للأوكسجين ادى الى تغير الظروف اللاهوائية . وبعد تطور البكتريا المزرقّة نشأت مجاميع ثنائية الجلد مثل Green , Spirochetes , Cytophagas , Planctomycetes sulfur bacteria .

• Deinococci تشير الدراسات الى انها اقرب الى البكتريا السالبة لصبغة كرام منها الى الموجبة مع انها موجبة لصبغة كرام ، اذ ان نسق الحوامض الدهنية في أغشيتها مشابهة لما موجود في البكتريا السالبة اكثر من الموجبة ، كما ان وجود الغشاء الخارجي في مجموعة *Deinococcus* – *Thermus* يكون مميزا للبكتريا السالبة . اما دراسة توالي طمغات البروتين فتوضح انه يمكن ان توضع مع البكتريا السالبة او الموجبة لصبغة كرام ، وهذا يشير الى ان هذه المجموعة انتقالية بين

البكتريا الموجبة لصبغة كرام الى البكتريا السالبة لصبغة كرام ، وان العائلة Deinococceae هي مشتقة من البكتريا الموجبة لصبغة كرام ذات المحتوى العالي من GC .

البكتريا

البكتريا Proteobacteria هذه تم تصنيفها اعتمادا على توالي الحوامض الامينية في بروتينات معينة مثل تلك المذكورة سابقا وكذلك بعض البروتينات الخاصة مثل Alanyl-tRNA synthetase وكذلك توالي القواعد في 16S rRNA . وكلمة Pro آتية من الكلمة الإغريقية Proteus أي ان لها القابلية على اتخاذ أشكال مختلفة ، ومنها البكتريا الأرجوانية Purple bacteria وتوابعها ولها صفات مختلفة .

وتصنف Proteobacteria الى حوالي 200 جنس ضمن مجاميع هي α ، β ، γ ، Δ ، ϵ وتكون في حالة تصنيفية معقدة وكذلك علاقة تطورية معقدة . ودراسة تواليات البروتينات اشارت الى ان مجموعة β ، γ تقع في فرع والباقي α ، Δ ، ϵ في فرع ثاني ، كما ان تسلسل الحوامض الامينية في البروتين الوصيف Hsp60 يكون مميزا للمجموعة α .

الاركية Archaea

وحدة تصنيفية عرفت بدراسة الصفات الكيموحيوية وصفاتها المظهرية المتميزة اضافة الى دراسة تواليات المواد الوراثية لبعضها وكذلك توالي الحوامض الامينية ، وتمتاز :

1. بعدم احتوائها على Muramic acid في جدرانها الخلوية .
 2. دهون أغشيتها ترتبط باواصر أثيرية بدلا من الارتباط الاستري .
 3. يكون انزيم الكوثرية فيها RNAP ذات وحدات مميزة التركيب .
 4. عدم وجود القاعدة Ribothymine في حلقة C ψ T لجزيئة tRNA .
 5. وجود تواليات طمغة خاصة في بروتينات الوحدة الرايبوزومية الكبيرة مثل L5 , L14 .
 6. تحوي على جينات خاصة تشترك بروتيناتها في تضاعف DNA والانتساخ والترجمة وكذلك في التعديل Splicing للـ RNA والهستونات والبروتين الوصيف Tcp1 .
- تظهر بعض التشابه مع البكتريا الموجبة لصبغة كرام كما في الانزيم Glutamine synthetase ولكن في النواحي الاخرى هي اكثر شبها بالخلايا حقيقية النواة وقد وجد هذا التشابه في توالي البروتينات EF-1 α / Tu و EF-2 / G والوحدات الفرعية I , II لانزيم الكوثرية RNAP وبروتينات الصدمة الحرارية Hsp70 و F-type ATPase و V-type ATPase وكذلك وجود تشابه في بعض بروتينات الرايبوزوم والانزيم DNAP B والبروتينات

TATA binding proteins ، اضافة الى التشابه في عوامل الانتساخ II B و III B . وتتشابه الاركيا والخلايا حقيقية النواة في تسلسل الحوامض الامينية للبروتينات الرايوزومية مثل S5 , L5 وتمثل الاركيا مجموعة تصنيفية متحدة من الناحية التطورية Monophyletic group والتي تختلف عن الخلايا بدائية النواة في عمليات التضاعف والانتساخ . وتقسم الى قسمين رئيسية اعتمادا على توالي الحوامض الامينية للبروتين EF-1 α / Tu الى Euryarchaeota , Crenarchaeota والاولى احياء محبة للحموضة والحرارة ومعتمدة على الكبريت وتضم احياء لاهوائية و احياء محبة للحرارة تسمى Ecocyte لانها بدائية وهذه المجموعة هي الاكثر شبيها بالاحياء حقيقية النواة . اما Euryarchaeota فتختلف عن المجموعة اعلاه من النواحي المظهرية ولا توجد مجموعة خاصة تمثلها .

ويعتقد ان الضغوط الانتخابية والبيئات المتطرفة التي توجد بها عموم افراد الاركيا هي ادت الى تطورها وتطور مقاومتها للمضادات الحيوية وغيرها من العوامل .

الاحياء حقيقية النواة

تشير دراسات التوالي الى ان الاحياء المجهرية حقيقية النواة هي Chimera (متعددة الاصول) نتجت من اندماج أصول مختلفة مثل خلايا بدائية النواة والبكتريا القديمة والمحبة للحرارة وبكتريا سالبة لصبغة كرام . وهي اقرب الى البكتريا القديمة Archaeobacteria اكثر من البكتريا الحقيقية .

الأحياء المجهرية في الطبيعة

الصفحة	الموضوع
152	التواصل بين الخلايا
155	الوظائف المرتبطة بـ AHLs
156	تحسس الخلايا
157	الانجذاب بأنظمة النقل
158	التحسس عن طريق انجذاب الطاقة
159	انجذاب الطاقة
161	متحسسات مؤشرات الطاقة
161	التبوغ
167	الأغشية الحيوية
168	تكوين الأغشية الحيوية
169	تغير فعاليات الخلايا داخل الأغشية الحيوية
169	المقاومة للأدوية
174	العوامل المؤثرة على الأحياء المجهرية
174	المواد القاتلة Biocides
184	المضادات الحيوية
187	المقاومة للمضادات الميكروبية
191	موت الخلايا
191	موت الخلايا بدائية النواة
195	موت الخلايا حقيقية النواة

الأحياء المجهرية في الطبيعة

تعيش الأحياء المجهرية في الطبيعة بشكل مختلف جدا عن معيشتها في المختبر اذ تتغير الظروف بشكل كبير . ومثل هذه الحالات يجب ان تؤخذ بنظر الاعتبار عند استعمال الاحياء خاصة المجهرية في عمليات الانتاج الحيوي . ولذلك يلاحظ ان التطبيق العملي يخفق عند الاعتماد على المنطق النظري المختبري والذي يكون مثاليا بعيدا عن وجود الاحياء في الطبيعة .

فالاحياء المجهرية وخاصة البكتيريا قد يوجد منها انواع صغيرة الجينومات مثل *My. genitalium* الذي يحوي على حوالي 468 جين في حين يحوي *E. coli* ما يقرب 4288 جين ، وتخصص الخلايا عددا من الجينات للتلاؤم مع البيئة والظروف المحيطة به ، علما انها تشغل مدى واسع من البيئات وقد تخصصت كل مجموعة للعيش تحت ظروف معينة . وبما ان الاحياء المجهرية وخاصة وحيدات الخلايا تكون في مواجهة مباشرة مع البيئة ومتغيراتها لذا كانت لها انظمة تلاؤم كفوءة جدا . والاحياء المجهرية في الطبيعة تعيش بشكل مجاميع او جوقات منسجمة *Consortia* وهي تمثل أفضل الوسائل للبقاء وتكون هذه المجاميع من احياء مختلفة وذات صفات فسلجية مختلفة ولكنها كلها تصب في صالح المجموع ومحاولة الحفاظ على الخلايا حية . والملاحظ ان الخلية الواحدة التي تنمو *Clone* لوحدها تكون فعاليتها تختلف عن فعالية الخلية نفسها في المجتمع ، لذلك فان التغيرات الوراثي الذي هو ينبوع التطور ويسمى الانتخاب الطبيعي يكون موجودا حتى في خلية النسيلة الواحدة . ففي المجتمعات تقوم بعض الخلايا بإفراز المكوثرات الحيوية الخارجية المسماة الاغشية الحيوية *Biofilms* لتوفر الحماية لها و للاحياء الاخرى الموجودة معها ضد المواد الضارة مثل المضادات الحيوية والمعادن الثقيلة بحيث ان التراكيز القاتلة من هذه المواد تفوق أضعافا مضاعفة تلك اللازمة لقتل الخلايا المفردة .

التواصل بين الخلايا

تواصل الخلايا المجهرية ومنها البكتيريا بطرق مختلفة ، فالبكتيريا مثلا تستعمل ظاهرة تلامس الخلايا مع بعضها ضمن ظاهرة تحسس الزحام *Quorum sensing* لغرض تنظيم انتاج الجينات المشاركة في العديد من الفعاليات الحيوية مثل :

- الوميض الحيوي *Bioluminescence* .
- نقل البلازميدات بالاقتران .
- إنتاج محددات الضراوة .

ان تحسس النصاب او الزحام يعتمد على انتاج واحد او اكثر من جزيئات الإشارة التي تسمى بالحاءات الذاتية *Autoinducers* او الفرمونات *Pheromones* التي تساعد الخلايا في تسجيل كثافة الخلايا ، لتبدأ بحث العديد من الجينات التي لم تكن مستحثة في حالة عدم الزحام .

والمظهر الاخر هو انتاج الساييتوكينات Cytokines والمعروف ان هذه تعمل في السيطرة على تنشيط وتكاثر الخلايا حقيقية النواة خاصة التابعة للجهاز المناعي . وهي جزيئات بروتينية تعمل في مجال الإشارات الخلوية Cell – signaling وتشمل عددا من عوامل النمو وهي منتشرة في الفقرات واللافقرات .

وقد وجدت هذه الجزيئات المنظمة في الاحياء وحيدات الخلايا مثل الهدبيات Ciliata وكذلك في البكتريا . فالخلايا بدائية النواة تتواصل فيما بينها باستعمال مواد ايض صغيرة الحجم او بيبتيديات صغيرة الحجم N – acyl homoserine lactones (AHLs) . وتساعد الساييتوكينات في إنقاذ العديد من الخلايا ، ففي البيئة لا يمكن لكل الاحياء الموجودة في النموذج النمو أي انها غير قابلة للزرع ولا يعرف هل هي ميتة ام حية ، ام هي في حالة سبات ، وان كانت الاخيرة فيمكن إنقاذها باستعمال عوامل النمو . فمثلا بعض الانواع البكتيرية مثل *Micrococcus luteus* وهي بكتيرية غير مكونة للابواغ تكون خلاياها حية 100 % عند استعمال طريقة العد العيوشي Viable count مقارنة بالعدد الكلي Total count وعندما تصل طور الاستقرار تدخل حالة سبات والتي يمكن ان تبقى حية فيها عدة اشهر وتصل اعدادها الى 10^{-4} ولا يمكن ان تقاس الا باستعمال MPN (Most probable number) . ولكن عند اضافة وسط غذائي لمزروع بكتريا نمت الى نهاية الطور اللوغاريتمي النهائي بطريقة المزارع المغلقة بعد تعقيمه بالترشيح فان هذا يؤدي الى انقاذ البكتريا السابتة وزيادة اعدادها الحية لتقارب الأعداد الكلية . وقد وجد ان البكتريا واحياء اخرى تنتج مواد فرمونية منقذة Rpf) Pheromonal resuscitation promoting factor (وهو بروتين بوزن جزيئي 12 – 17 كيلو دالتون . وجين البروتين منتشر في البكتريا ذات GC العالية مثل *Streptomyces* , *Mycobacteria* , *Corynebacteria* .

Rpf من البكتريا *M. luteus* يمكن ان يحفز نمو العديد من بكتريا *Mycobacteria* مثل *Mb. tuberculosis* و Rpf يسرع من نمو البكتريا *Mb. smegmatis* من 6 ايام الى 20 - 24 ساعة . والمركبات البروتينية او عوامل الإنقاذ تكون حساسة للحرارة والتربسين وتعمل بتركيز قليلة جدا تصل الى بيكومول (Picomole) . والجين المشفر له هو *rpf* حجمه بحدود 1.4 كيلو قاعدة وفيه موقع انفلاق بالانزيم SmaI . وتوجد هذه العوامل في *Mycobacteria* مثل *Mb. tuberculosis* و *Mb. leprae* وتحوي الجينات على تواليات مسؤولة عن إفراز البروتين .

العديد من المركبات الكيماوية (الفرمونات) يكون تأثيرها على النوع نفسه Autocrine وهي مركبات تؤدي الى استثارة وتنسيق عمليات التخصص والتمايز في الخلايا بدائية النواة مثلاً أثناء عمليات التبروغ والاقتران وكذلك التعبير عن جينات الضراوة . ولذلك يمكن تلخيص بعض صفاتها :

- تنتج من قبل الكائن نفسه الذي يتأثر بها .

• تكون فعالة بتركيز قليلة جدا .

• تختلف طبيعتها الكيماوية بشكل كبير باختلاف الاحياء .

ففي البكتريا السالبة لصبغة كرام يكون وزنها الجزيئي قليل جدا وبشكل خاص مشتقات AHL ، والبكتريا الموجبة لصبغة كرام تستعمل بروتينات وبيبتيدات متعددة . ومن جهة ثانية فان بعض عوامل النمو مثل هرمونات اللبائن يمكن ان تحفز نمو الاحياء وحيدات الخلايا مثل الهديبات وكذلك تحفز النمو البكتري . وتوجد انواع منها تؤثر على انواع بعيدة عنها Paracrine ، والمركبات او البروتينات لها صفات السايوتوكاين لانه يؤدي الى تحفيز نمو الخلايا الحية ويمكن ان يكون عاملا في السيطرة على نمو وتضاعف الخلايا الطبيعية . ولذلك فالخلايا في البيئة والتي تكون غير قابلة للزرع Unculturable يمكن ان تنمو عند اضافة هذه المواد .

والبكتريا المهمة في هذا المجال *Mb. tuberculosis* خاصة السلالات الجديدة التي ظهرت وهي مقاومة للعديد من المضادات الحيوية وكذلك *Mb. leprae* التي تظهر نوعا من السبات داخل الجسم الحي ، يمكن تحفيز نموها بمواد من عائلة Rpf والتي تعمل بشكل Autocrine او Paracrine ، وجزيئات الإشارة هذه يمكن ان تفرز تحت ظروف مختلفة او تفرز لأغراض خاصة وترتبط على سطوح الخلايا وقد تستعمل هذه الجزيئات لإيجاد استراتيجيات علاجية او تستعمل في تحضير لقاحات لمنع نمو الكائنات داخل الجسم .

لذا فمن الواضح ان البكتريا تتواصل مع بعضها بواسطة إفراز وارتباط بعض الجزيئات لغرض التنسيق والتعبير المظهري على مستوى المجتمعات وهذا النوع من التنظيم يهيأ إمكانية التنافس في البيئة التي تعيش فيها . فالمعروف ان فعاليات الاحياء المجهرية في البيئة ترتبط بشكل أساسي بسطوحها الخارجية وهي الوسيلة التي تواجه بها البيئة المحيطة . لذلك فان قابلية البكتريا لتنظيم فعاليتها بين التراكيب او الأشكال التي تنتظم فيها مثل الاغشية الحيوية او الحوائط وتوزيع الفعاليات الحيوية بين افراد الجوقة المختلفة تعتمد على بروتين AHL synthetase وهو من عائلة بروتينات Lux I ، والبروتين الاخر هو مستلم AHL الذي يعود الى عائلة منظمات الانتساخ Lux R . فعند التراكيز الواطئة من عدد الخلايا تنتج الخلايا مستوى واطئ وأساسي من الجزيئات وعند زيادة أعداد الخلايا تزداد عدد جزيئات AHLs وعند وصول تراكيزها الى حد حرج تبدأ بالارتباط الى مستلماتها الخاصة على سطوح الخلايا وهذا الارتباط يؤدي الى حث او كبح عدد من الجينات التي تنظم بـ AHLs ضمن دائرة تنظيم خاصة .

والدائرة من تسلسل الفعاليات في البكتريا السالبة لصبغة كرام تنظم عددا من الفعاليات مثل الحركة والاقتران بالبلازميدات ونقلها ، والتعبير عن الامراضية والوميض الحيوي (في البكتريا البحرية بشكل خاص) ، كما انها تعمل في نقل الإشارات بين الخلايا التي تسيطر على عدد من

الاستجابات الفسلجية وتشارك في إنشاء العلاقات التعايشية مع الاحياء الاخرى مثل *Rhizobium* ، وهناك علاقات تعتمد على هذه الاشارات مثلا بعض الخلايا حقيقية النواة في البيئة البحرية تفرز مواد اشارة تنافس الإشارات البكتيرية وتشوش عليها عمليات تنظيم النمط المظهري التي تتم بهذه الجزيئات . والحقيقة ان AHLs لا تمثل الآلية الوحيدة التي تستعملها البكتيريا وانما هناك دوائر ووسائل اتصال اخرى ، كما ان الخلايا تستعمل اكثر من طريقة لتنظيم النمط المظهري على مستوى الخلية وعلى مستوى المجموع .

الوظائف المرتبطة بالـ AHLs وتحسس الزحام

تنظم هذه الجزيئات بعد حثها بعدد من الاسباب العديد من الفعاليات منها :

- الاستجابة للمجاعة ، فعند دخول المزارع طور الاستقرار بعد نهاية الطور التزايدي او اللوغاريتمي نتيجة لعدد من الأسباب منها نفاد الكربون والنيتروجين ، بقاء الخلايا حية يعتمد على دخولها استجابة للمجاعة ، ويمكن زيادة الاستجابة باضافة رائق نمو مزارع أخرى نامية الى نهاية الطور اللوغاريتمي للتزويد بمركبات او مواد الاشارة . ووجد في البكتيريا *Ps. aeruginosa* ان الجين *rhl* هو النظام الذي يتحسس الزحام ويكون لازما للتعبير عن الجينات الخاصة بطور الاستقرار .

- تكوين الاغشية الحيوية والاستعمار ، والخلايا في هذه الحالة تنظم فعاليتها والانجذاب الكيماوي والاشارات الخاصة بتواصل الخلايا (خلية - خلية) عند تلامسها مع السطوح الصلبة او عند عدم ملائمة الظروف للنمو بشكل عالق ، وعند تكوين التراكيب الغشائية الحامية والتي قد تضم انواعا واجناسا مختلفة من البيئة الطبيعية والتي يحصل بينها علاقات تغذوية Syntrophism وتصبح البيئة ملائمة لعيشها . كما ان بعض الاحياء خاصة المرضية تستطيع ان تبني تراكيب خاصة ضد الدواء او المضاد الحيوي لمقاومته . ونظرا لطبيعة الاختلافات في الاغشية الحيوية في جوانب عدة فهذا يشير الى وجود آليات مختلفة للمقاومة ، ووجود AHLs في الاغشية الحيوية يشير الى أهميتها في تواصل الخلايا وكذلك ضرورتها لاستعمار السطوح الصلبة .

- تساهم الجزيئات في تحسس الزحام وما ينتج عنه من مواد في التأثير على حركة الاحياء المجهرية كما في حالة السباحة في البكتيريا *Proteus* وكذلك في سباحة البكتيريا *Serratia liquefaciens* ، وامتداد مستعمرات الخميرة على سطوح المواد الغذائية .

- انتاج المضادات الحيوية فعند استعمال *Ps. aureofaciens* التي تحمي النباتات من احد الامراض الذي يسببه فطر كيسبي بإنتاج المضاد الحيوي Phenazine فان تنظيم انتاج المضاد يتم بواسطة تحسس الزحام . كما ان إنتاج الصبغة البنفسجية Violacein التي تعمل كمضاد حيوي من البكتيريا *Chromobacterium violaceum* يسيطر عليها ايضا بظاهرة تحسس الزحام .

● إنتاج عوامل الضراوة ، فتحت ظروف غير طبيعية تضطر البكتريا للعيش تحت ظروف قاسية ولذلك فانه في العديد من الحالات تقوم بإنتاج الانزيمات وغيرها كما يحصل عند إصابة الإنسان او النبات تحت تأثير تحسس الزحام ، فمثلا البكتريا *Ps. aeruginosa* المغتمة الفرص في الأشخاص معلولي المناعة تسبب اصابات المستشفيات خاصة في مرضى التحوصل الليفي وتزيد من إنتاج عوامل الضراوة اعتمادا على آليات تحسس الزحام ، وكذلك تزيد بعض البكتريا من المواد العلبية التي تعد احد عوامل الضراوة عند زيادة الزحام ، كما ان معظم عوامل ضراوة البكتريا *Staph . aureus* مرتبطة بهذه الظاهرة . والحال مماثل للبكتريا التي تصيب النباتات مثل البكتريا *Erwinia* اذ تقوم بافراز الانزيمات المحللة للسليولوزات وجدران الخلايا النباتية والبروتينات وكل ما يلزم لغزو الأنسجة النباتية .

● تساعد الظاهرة على نقل البلازميدات او قطع DNA كما يحصل في البكتريا *Ag. tumefaciens* ، اذ ينظم تحسس الزحام ارتباط البكتريا بالنبات المضيف واثناء الإصابة والمرض تنتقل قطعة T- DNA من البلازميد الى خلايا النبات وتندمج مع جينومها مؤدية الى حدوث الورم التاجي .

● المساعدة في ظهور حالة التأهل في بعض البكتريا مثل *B. subtilis* و *St. pneumoniae* ، اذ يستعمل نظام الاشارة ذو المكونين (Tow component system) في الاستجابة للفرمونات لحث عملية التأهل التي تعتمد على نوع من عوامل سيكما .

ان ما ذكر من نمو الاحياء في الطبيعة بشكل مجاميع وربما داخل تراكيب خاصة مثل الاغشية الحيوية او Glycocalyx وتواصلها فيما بينها يعمل كحاجز لحماية الخلايا المقيمة داخله من تقلب الظروف البيئية

تحسس الخلايا

ان فلسفة الخلايا المقيمة Sessile cells في الاغشية الحيوية او أي تراكيب اخرى يختلف عن الخلايا التي تعيش بشكل عالق او حر Plankton . ولكن في الحالتين وبما انها خلايا حية فهي تتحسس مختلف الظروف المحيطة ثم تستجيب لها . ويكون التحسس ضروريا خاصة للاحياء وحيدات الخلايا التي تتفاعل وتتداخل مع البيئة مباشرة . وتمتلك الاحياء المجهرية انظمة بسيطة ولكن مؤثرة تسمح لها بتنظيم الاستجابات الخلوية عند التغير بالظروف المحيطة . فالانجذاب (والذي مر ذكر بعض جوانبه عند مناقشة التغذية والحصول على الطاقة) يمثل حركة الاحياء المتحركة نحو العامل الملئم لها سواء كان ضوءا او مادة كيميائية او الابتعاد عنها بحيث تتوقف عند أفضل الظروف الملائمة لنموها وبقائها في أفضل حالة . ويسيطر على الانجذاب بمسارات او انظمة نقل الاشارات .

وقد درست هذه الانظمة بالتفصيل في البكتريا *E. coli* و *Sal. typhimurium* , *Sal. enterica* وهي من البكتريا المعوية . وتقيس البكتريا المعوية التراكيز خارج الخلايا باستعمال مستلمات تستعرض الاغشية الخلوية والتي يطلق عليها ناقلات الانجذاب الكيماوي Chemotaxis transducers وتقوم بنقل الاشارات الى داخل الخلايا . والمستلمات الغشائية التي يكون جزءا منها داخل الغشاء مرتبة في مصفوفات ليكون النظام حساس جدا للتغيرات التجسيمية او الشكلية ، ولكن هناك الكثير من الأدلة التي تشير الى ان نقل الاشارات عبر الاغشية هي ليست الطريقة الوحيدة للتحسس بالكيماويات ، اذ ان انجذاب *E. coli* في كثير من الاحيان لا يكون معتمدا على قبط المادة الكيماوية التي تأيضاها ومنها الانجذاب نحو الكلاكتوز يكون طبيعيا في الطفرات التي ينقصها نظام نقله وتأيضه . لذلك تم التركيز على الفعاليات غير المعتمدة على التأيض مثل دراسة انسياب المعلومات من المستلمات الى محركات الاسواط ، فمثلا *E. coli* تمتلك 5 انواع من المستلمات الكيماوية ، اربعة منها تساهم في نقل الاشارات عبر الاغشية منها Tar الخاص بالاسبارتات ، Tsr الخاص بالسيرين و Trg الخاص بسكري الرايبوز والكلاكتوز و Tap الخاص بالبيبتيدات الثنائية التي تشكل 90 % من جزيئات نقل الاشارات في *E. coli* وهي تمتلك تركيب ذو طوبوغرافية متشابهة في الاغشية ويتكون من حلزونات تستقر في الاغشية وجزء يقع في الفسحة المحيطة وجزء اخر في الساييتوبلازم لنقل الاشارات . وارتباط المادة الكيماوية المنفذة للمستلم في الفسحة المحيطة يكون ضروريا وكافيا لإحداث التغييرات في تصرف الخلايا . فالتغييرات الشكلية في المستلم تؤثر على انزيم فسفرة الهستيدين الذاتي Histidine autokinase (Che A) الذي يكون بمثابة معطي للفوسفات لمنظم الاستجابة البروتين Che Y والشكل المفسفر للبروتين الاخير يسيطر على عملية السباحة من خلال الارتباط الى محرك السوط مؤديا الى تغيير دورانه من عكس عقارب الساعة الى اتجاه عقارب الساعة ان شيوع آليات ارتباط المواد الى الربائط Ligands عند استلام الاشارات الكيماوية يمكن ان توضح بعض الافتراضات التي وضعت حول ظاهرة التحسس وهي :

1. ان المضاهيات والمواد القابلة للتأيض تعمل مواد جاذبة .
 2. ان الطفرات الحاصلة في مسارات تايض المواد الجاذبة لا تؤثر على عمليات الانجذاب الكيماوي .
 3. ان بعض المواد الكيماوية تجذب الخلايا حتى عند وجود مواد اخرى قابلة للتأيض .
- الانجذاب بانظمة النقل :** ومن افضل امثلتها PTS taxis وفيه يكون تصرف الخلايا معتمدا على عمليات النقل ، فبالإضافة الى الاستجابات الموضحة اعلاه ضمن ظاهرة الانجذاب الكيماوي فان الخلايا مثل *E. coli* تظهر انجذابا للمواد التي تنقل بنظام PTS (Phosphoenol pyruvate – dependent carbohydrate phosphotransferase) ويلاحظ ان عملية نقل المواد وليس عملية

الايض هي اللازمة لإظهار استجابة وتصرف الخلايا . فعند نقل السكريات يتم فسفرتها بإنزيم مرتبط بالغشاء E II الذي يستقبل الفوسفات من معط غير متخصص E I (PEP - dependent histidine kinase enzyme I) وكذلك يساهم في عملية الفسفرة Hpr (Phosphohistidine carrier protein). ان E I يتداخل مع البروتين Che A مباشرة وفي حالة وجوده بشكل مفسر يقوم بتنظيم الفسفرة الذاتية للـ Che A . وتوجد حالات مغايرة في احياء اخرى مثل *B. subtilis* فإن المستلم الكيماوي يقوم مباشرة في التوسط والاستجابة وهي حالة غير طبيعية . ويوجد الانجذاب الكيماوي غير المتعمد على الايض في العديد من البكتريا مثل الانجذاب لعدد من الحوامض الامينية في *B. subtilis* والحوامض العضوية الحلقية في *Ps. putida* .

التحسس عن طريق الانجذاب للطاقة

تتصرف الخلايا في العديد من الاحيان بشكل يعتمد على العمليات الايضية ، فالاستجابة في بعض البكتريا للانجذاب الى مادة كيماوية يفترض ان تقوم بتايضها مثل انجذاب *E. coli* للبرولين او الكليسرول او غيره من المواد ، فعند وجود طفرة في مسار ايض الكليسرول او وجود مادة بديلة تؤدي الى منع الانجذاب للكليسرول . ولكن وجد في بعض البكتريا من مجموعة α - proteobacteria يحصل انجذاب للمواد التي تايضها مثل البكتريا المثبتة للنتروجين *Azospirillum brasilense* وهي من بكتريا التربة وتستطيع استعمار جذور عدد من محاصيل الحبوب والحشائش وفي هذه الحالة :

1. تكون مضاهيات المواد التي تأيضاها البكتريا غير قادرة للعمل كمواد جاذبة .
2. تثبيط عمليات ايض المادة الكيماوية الجاذبة يؤدي الى تلاشي ظاهرة الانجذاب الكيماوي وبشكل خاص للمادة الجاذبة .
3. يكون هناك ترابطا قويا بين كفاءة المادة كمادة سائدة للنمو وعملها كمادة منفذة للانجذاب في هذه البكتريا .

وتوجد الظاهرة في بكتريا اخرى من هذه المجموعة مثل *Rhodobacter sphaeroides* اذ ان كل المواد الجاذبة هي مواد قابلة للتأيض من قبل البكتريا وأكثرها قوة الحوامض العضوية والعديد من السكريات والحوامض الامينية والكحولات المتعددة .

وتساعد الظاهرة البكتريا والاحياء الاخرى على أداء دورها في البيئة فمثلا البكتريا *Sinorhizobium meliloti* (*Rhizobium*) المثبتة للنتروجين تعايشيا مع جذور نباتات البقول تحتاج الى الانجذاب الى الجذور لخلق العلاقة التعايشية مع النباتات ، وتكون عملية الانجذاب قوية جدا بعد تجويع الخلايا مما يشير الى ضرورة عمليات الايض ، فهي تنجذب الى الحوامض العضوية والحوامض الامينية مثل البرولين و الكاربوهيدرات والفلافونات وهذه كلها موجودة في افرازات

الجنور . وقد سجلت ظاهرة زيادة الاستجابة للخلايا الجائعة في احياء اخرى مثل *Spirochaeta aurantia* التي تعيش حرة في البيئات الملائمة وكذلك في البكتريا *Campylobacter* من مجموعة *ε-proteobacteria* .

فأضافة المواد القابلة للتأييض بعد التجويع يؤدي الى تغير الجهد على جانبي الغشاء الخلوي Membrane potential مما يشير الى ان تسجيل حالة الطاقة داخل الخلية تكون هي الاساس في استجابة الانجذاب للمواد التي تستعملها الخلايا .

انجذاب الطاقة Energy taxis

في العديد من الخلايا مثل *E. coli* توجد علاقة بين التغير في تصرف الخلايا وبين نقل الالكترونات وجهد الاغشية الكهربائي اثناء عمليات الانجذاب للمواد مثل البرولين والكليسيرول ووجدت مثل هذه العلاقة في *Az. brasilense* اثناء انجذابها القوي لبعض المواد ، وهذا يشير الى ان عمليات الانجذاب المتعمدة على الايض تشارك في مسارات نقل الاشارات وغيرها من الاستجابات .

ويعرف انجذاب الطاقة على انه استجابة في تصرف الخلايا تجاه المحفزات التي تؤثر على مستويات الطاقة في الخلية ، وهي تشمل الاستجابات التي ترتبط بعمليات نقل الالكترونات وتوليد الطاقة مثل الانجذاب للهواء Aerotaxis والانجذاب للضوء Phototaxis كذلك انجذاب الأكسدة والاختزال Redox taxis والانجذاب لمستقبلات الالكترونات البديلة .

والاشارات في هذا النوع من التصرف تنشأ في نظام نقل الالكترونات حيث تسجل التغيرات لنقل الالكترونات وغيرها من المؤشرات ويتم التحسس بها بواسطة انظمة نقل الاشارات . وقد درست في حالة مستقبلات الالكترونات والضوء التي تؤدي الى بدا عملية نقل الالكترونات . فالمواد القابلة للايض بسرعة التي تساعد في ضخ المكافئات المختزلة Reducing equivalents الى نظام نقل الالكترونات وتحدد معدل نقل الالكترونات يتم التحسس بها على انها مواد جاذبة عن طريق آلية الانجذاب . وعليه فان مواد الأساس القابلة للاستهلاك يمكن ان تعمل كمحفزات كيميائية في البكتريا ما دام هناك عملية قياس للتغيرات لنظام نقل الالكترونات .

وفي مثل الآليات فان مثبطات السلاسل التنفسية تكون بمثابة مواد منفرة لأنها تؤثر على جهد الأكسدة الاختزال . وتؤدي الى تلاشي ظاهرة الانجذاب . ولذلك تكون هناك علاقة قوية بين الاستجابة في الانجذاب الكيميائي ومعدل سريان الالكترونات في السلاسل التنفسية وما تولده من جهد الغشاء الخلوي

مستلمات انجذاب الطاقة

يتم التحسس والانجذاب للطاقة بواسطة المستلمات ومنها :

Aer في *E. coli* وهو مثل باقي ناقلات الانجذاب الكيماوي مكون من بروتين ثابت عند النهاية الكربوكسيلية اما النهاية الامينية فتتكون من عدة مناطق وهذه المناطق وجدت في مئات البروتينات العاملة في نقل الاشارات في الممالك الثلاثة للاحياء ويتحسس الضوء والأوكسجين وجهد الأكسدة والاختزال ، ويتوسط في الاستجابة لعدد من المواد العضوية مثل والكلسيرول وغيرها من المواد التي تسبب انجذاب الطاقة ، ويسيطر على عمليات الانجذاب الكيماوي للمواد القابلة للاستهلاك باستعمال آلية التحسس للطاقة .

Tsr مستلم كيماوي يحوي على الحامض الاميني السيرين يعمل ناقلا في مجال الطاقة ويستجيب لكل المحفزات التي يستجيب لها *Aer* . ويتحسس البروتين للرقم الهيدروجيني داخل وخارج الخلايا . ويمكن القول ان تحسس الطاقة والرقم الهيدروجيني قد يكون متشابها وذلك لان التدرج في الرقم الهيدروجيني وهو احد مكونات القوة الدافعة للبروتون *pmf* التي تتولد في نظام نقل الالكترونات . ولذلك فان الثمالات او الاجزاء المشحونة بشحنة موجبة على الجهة الساييتوبلازمية من الغشاء والمجاورة لمكونات النظام داخل الاغشية قد تكون هي عناصر التحسس ومثل هذه المناطق المشحونة بشحنة موجبة موجودة في اغلب البروتينات التي تستعرض الاغشية الخلوية وتكون تحت سيطرة تدرج البروتونات .

وقد وجد كل من *Aer* و *Tsr* في عدد كبير من الانواع التي تتحسس بالكيماويات عن طريق انجذاب الطاقة .

Dcr A من البروتينات *Heme – containing accepting proteins* يوجد في البكتريا *Desulfovibrio vulgaris* وهو اكثر المتحسسات التي تتحسس الفرق في الجهد أي يتحسس الفرق في جهد الأكسدة والاختزال في نظام نقل الالكترونات وكذلك يتحسس الأوكسجين .

Ptr من النواقل العامة العاملة في نقل اشارة الانجذاب للطاقة ويوجد في البكتريا التي تقوم بعمليات التخليق الضوئي مثل *Rhodospirillum centenum* من مجموعة البكتريا *α-proteobacteria* وهو مسئول عن التحسس للضوء وتصرف الخلايا اتجاهه ، واضطراب الجين *ptr* يؤدي الى تلاشي الاستجابة للضوء . والمتحسس يتكون من عدة اجزاء ، فيوجد جزء منه في الفسحة المحيطة والذي يقوم بتحسس حالة الاكسدة والاختزال لمكونات نظام نقل الالكترونات الخاصة بعملية التخليق الضوئي في الفسحة المحيطة .

واضافة الى ما ذكر اعلاه هنالك العديد من جزيئات الانجذاب الكيماوي التي تتحدد فعاليتها بالطاقة الايضية ومنتشرة في انواع مختلفة من الاحياء المجهرية ، ومن الاحياء الرئيسة للحياة على الأرض وهي التي تقوم بعمليات تثبيت النتروجين كما في *S. meliloti* المارة الذكر .

متحسسات مؤشرات الطاقة : بعض المستلمات الكيماوية تحسس المؤثرات ذات العلاقة بالطاقة وليس الطاقة مثل التحسس بالأوكسجين والضوء وتكون آلية عملها مشابه لعمل المستلمات الأخرى . اذ تقوم بتسجيل او تحديد تراكيز الاوكسجين داخل الخلايا ومنها Hem AT الموجود في عدد من الاحياء المجهرية وهو يسيطر على الاستجابة للتهوية ، اذ يحوي على Heme B الذي يرتبط مباشرة بالأوكسجين بشكل يشابه الهيموغلوبين ، اما بالنسبة للضوء والذي يكون مهما في الاحياء التي تقوم بعملية التخليق الضوئي مثل البكتريا المزرقة فان مستلماتها الكيماوية تحوي على اجزاء تتحسس بالضوء Photosensors .

وعليه فان قياس التغيرات في انظمة نقل الالكترونات يعد أكفاً طريقة لتسجيل الطاقة الايضية ويمكن إجمال ما ذكر اعلاه : ان قوة الانجذاب تعتمد على تركيب المادة القابلة للاستهلاك شريطة وجود مستلمات ملائمة لها . وعند نقصان مواد الأساس التي تستهلكها الخلايا تظهر فيها ظاهرة الانجذاب الكيماوي لتتحرك الى مناطق تكون فيها التراكيز أعلى او ملائمة . وكذلك الحال مع نقص الاوكسجين او أي مستلم للالكترونات خارجي فان الخلايا تظهر الانجذاب للهواء لغرض الوصول الى مناطق فيها الاوكسجين بتركيزات ملائمة وبذلك فان الخلايا تقوم بالبحث عن افضل الظروف المتوازنة بين المواد القابلة للاكسدة والاوكسجين او لغرض انتاج اكبر قدر ممكن من الطاقة فمثلا وجود اثنين من المتحسسات للطاقة في *E. coli* وهما Aer و Tsr والذي يقيس كل منهما مؤشرا مختلفا للطاقة يوفر للخلايا مجالا أوسع لتسجيل حالة الطاقة والتي تصب في مصلحة الخلية .

اضافة الى ما ذكر اعلاه فان هناك متحسسات اخرى تنتشر في الاحياء المجهرية لنقل اشارة الانجذاب الكيماوي منها كايينيز الهستيدين ونظام Adenylate cyclases / phosphodiesterases وغيرها . وتشترك هذه المتحسسات في الجزء المتحسس ، والاجزاء المتحسسة منها توجد ضمن شبكة انظمة نقل الاشارات في الخلايا حقيقية النواة ، مما يشير الى ثباتية صفة تحسس الكيماويات في مختلف الاحياء . وتعد ظاهرة الانجذاب الكيماوي للمواد الملوثة للبيئة ضرورية في عمليات المعالجة الحيوية Bioremediation .

التبوغ Sporulation

مما ذكر اعلاه يلاحظ ان الخلايا تكون مزودة بوسائل للشعور بما يحيط بها من الظروف . فمثلا البكتريا المكونة للابواغ وعند ازدحام الخلايا ونقص المواد الغذائية وزيادة الفضلات في محيط الخلايا النامية في أوساط مختبرية ، فهذه الظروف غير ملائمة تؤدي الى حث الطفرات لمواجهة الأخطار والتي تختفي معظمها عند عودة الظروف الى الحالة الطبيعية وزوال الاجهادات او الكروب Stresses ، اما الخلايا المكونة للابواغ فتحت مثل هذه الظروف تبدا بعملية التبوغ وتكوين الابواغ المقاومة لمختلف الظروف غير الملائمة وتبقى سابتة لمدة طويلة تصل الى ملايين السنين للحفاظ على النوع

وتعود للإنبات عند ملائمة الظروف وتختلف الاحياء المجهرية في التصرفات للوصول الى حالة السبات وتكوين الابواغ ومنها جنس *Bacillus* الهوائي و جنس *Clostridium* اللاهوائي كذلك جنس *Sporolactobacillus* من بكتريا حامض اللاكتيك وكذلك بكتريا *Sporosarcinia* من المكورات ، تدخل مرحلة التبروغ التي يتم ايضاحها في الآتي :

عملية التبروغ هي عملية هروب للخلايا من الظروف غير الملائمة ، وهي بمثابة عملية تمايز وتخصص في البكتريا التي تظهر فيها الخلايا بشكلين مختلفة ، فالبروغ لا يحتاج الى التغذية ويكون مقاوما للظروف غير الملائمة وذلك لان الخلايا بشكلها الهاجع تكون مقاومة للجفاف والحرارة والعوامل الكيماوية وغيرها . وعملية التبروغ عملية معقدة جدا وتشارك فيها العديد من الجينات التي تنتج العديد من الانزيمات والمتأيسات الاخرى ، تبدأ عند نهاية الطور اللوغاريتمي وترافقها اختفاء مستلزمات الخلايا الخضرية التي تعطل . وتعود التغييرات في الفعاليات الحيوية للخلايا التي هي في حالة تكوين البروغ الى الاختلافات في الفعاليات الانتساخية للانزيم RNAP نتيجة ارتباطه بعدد من البروتينات الخاصة هي عوامل سيكما Sigma factors الذي ينتج منها انواع تختلف في الطور الخضرى عما ينتج في طور التبروغ . وفي النموذج الدراسي لهذه العملية وهي بكتريا *B. subtilis* تستمر العملية حوالي 6 – 7 ساعات تحت الظروف المختبرية . وقد أمكن تمييزها الى عدة مراحل تحصل فيها تغيرات شكلية ظاهرية على الخلايا والبعض من الانواع ينتج المضادات الحيوية اثناء العملية والتي تلعب دورا مهما في تنظيم التبروغ .

متطلبات التبروغ : تبدأ عملية التبروغ عند وجود بعض الظروف التي تتعرض لها الخلايا ومنها

- ان تكون الخلايا في طور الاستقرار .
- ان تكون بكثافة عالية لغرض افراز بعض المواد ومنها عامل التمايز الخارجي EDF-1 (Extracellular differentiation factor -1) وهو بيبتيدي صغير يرتبط بالخلايا الجائعة لغرض إعطاء إشارة بدا التبروغ .
- ان تكون الخلايا جائعة بالنسبة للمواد الغذائية المهمة مثل مصادر الكربون والنيتروجين والفسفور سوية او أي منهم .

والإشارة الداخلية في الخلايا يعتقد انها مركبات GTP و GDP التي تكون ppGpp و

pppGpp

[3'-diphosphate-5'-diphosphate (ppGpp) ,Triphosphate-5'-diphosphate

(pppGpp)]

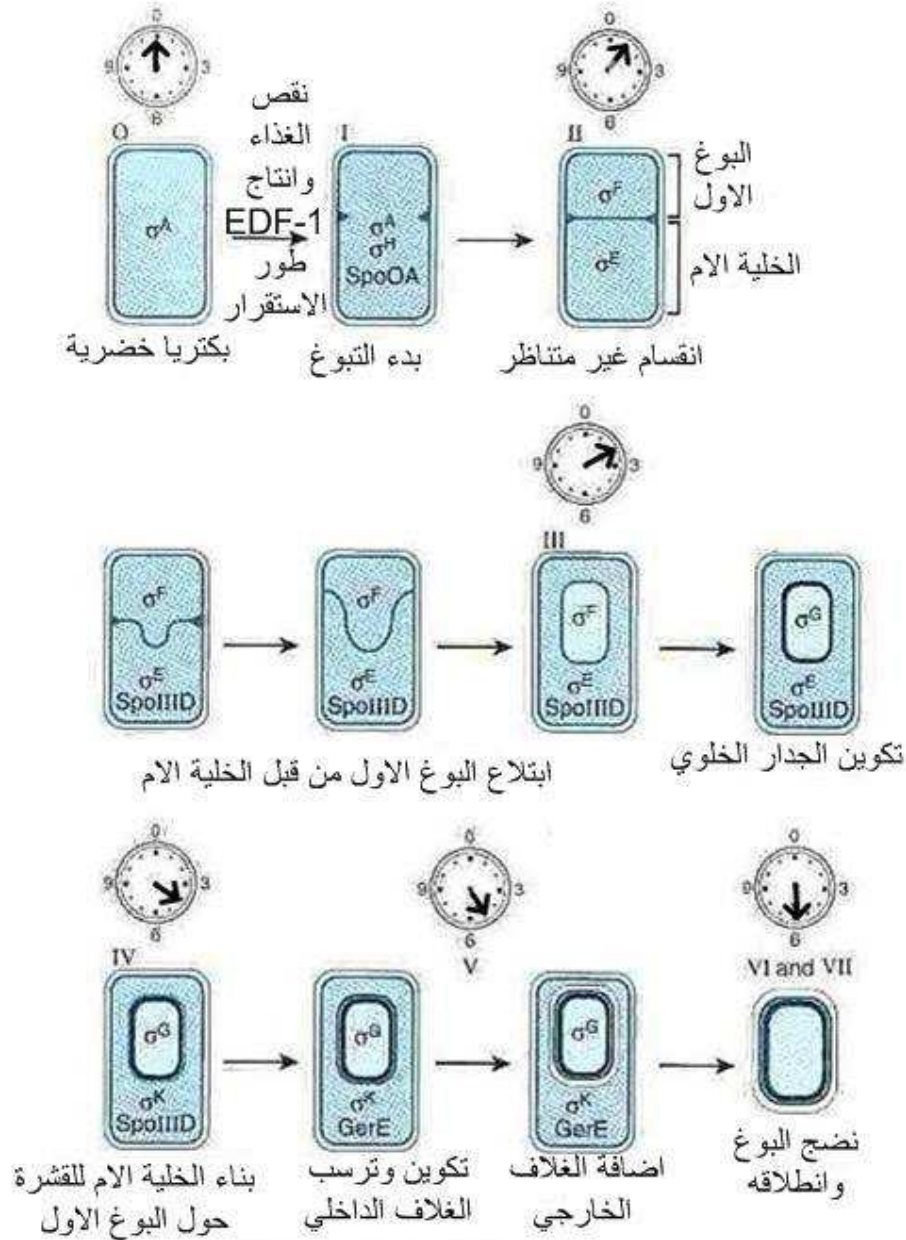
وهي ما يطلق عليها احيانا المنذرات Alarmons وعرفت في الاستجابة للمجاعة او الصوم (التي سيأتي ذكرها لاحقا) . وعند بدا عملية التبوغ تنقسم الخلايا بشكل غير متناظر كما موضح في الشكل (47) .

الجزء الصغير هو البوغ الأول Prespore والجزء الكبير هو الخلية الام . وتكون عملية التبوغ عملية معتمدة على الوقت ، والتي يتم فيها التعبير عن جينات جديدة في كل من الخلية الام والبوغ الاول على مراحل زمنية متعاقبة وهذا يشير الى ان العملية تنظم بعملية الانتساخ .

والمعروف ان انزيم الانتساخ RNAP مكون من مجموعة من الوحدات الفرعية $\alpha \beta \beta' \delta$ والعامل سكيما يتيح للانزيم تميز الممهدات المراد قراءتها في DNA وانتساخها . فجينات الطور الخضري تقرأ بمساعدة δ^A كعامل تميز وعند ارتباطه يعرف الانزيم δ^A E . اما عند التبوغ فيظهر عامل سكيما جديد هو δ^H وهو خاص بأول مجموعة من جينات التبوغ ، وتنشط اشارات التبوغ بانظمة الفسفرة الحاوية على مجموعة من المتحسسات والناقلات Transmitter protein kinases التي يفسر احدها البروتين SpoOA ، والاخير بعد فسفرته يمكنه الارتباط بالـ DNA لذلك يطلق عليه منظم الاستجابة لانه ينظم قراءة DNA استجابة لاشارات خارجية .

ويقوم δ^H E و SpoOA بقراءة الجينات الاولى من اوبرون التبوغ ، وتكون نتيجة القراءة انتاج اثنين من عوامل سيكما جديدة δ^E و δ^F (وهذه عند اكتمال عملية التبوغ وتكوين الحاجز العرضي بين الخلية الام والبوغ الأول فالـ δ^E يذهب الى الخلية الام اما δ^F فيذهب الى البوغ) . وبما ان البوغ الاول والخلية الأم تحوي على عوامل سيكما مختلفة فانها تؤدي الى إزالة الكبح عن مجموعات مختلفة من الاوبرونات او المنظمات (Regulons) ، لذلك فان مصير الجزئين سيختلف ، فالجينات المبكرة في البوغ تقرأ بالعامل δ^F وتظهر في البوغ عوامل اخرى مثل δ^G الذي يؤدي الى تغير الفعاليات الايضية فيه . اما الخلية الام فان فعاليتها تنظم بواسطة 4 من الجينات التي يتم قراءتها بعد تكون الحاجز وتتم السيطرة عليها δ^E .

واثناء عملية الابتلاع للبوغ الاول من قبل الخلية الام كما موضحة في الشكل ، يتم تشغيل او ازالة الكبح عن اوبرونات جديدة تعمل تحت سيطرة كل من δ^E و SpoIII D والذي هو بروتين يمكنه الارتباط بـ DNA ، هذه الاوبرونات تساهم في الخطوات القادمة فتكون القشرة الأولى يكون تحت سيطرة δ^E والبروتين SpoIII D . والخطوات التي تلي ذلك وهي تكون كامل للقشرة والنضج وتكون الأغلفة الخارجية فتتم بمساعدة منتجات جينات من اوبرونات تكون تحت سيطرة العامل δ^K وبروتينات اخرى ترتبط بـ DNA تعرف بـ Ger E proteins .



شكل 47 : عملية التبروغ في الاحياء المكونة للابواغ (جنس *Bacillus*)

وكحصيلة فان هنالك اكثر من 50 اوبرون يزال الكبح عنها بالتتالي اضافة الى ان بعض الاوبرونات تشفر لانزيمات متعددة او بروتينات تركيبية وتشمل *spo* (Sporulation) واوبرونات الانبات *ger* (Germination) وكذلك تنتج انزيمات تخليق الجدار الخلوي اضافة الى اوبرونات اخرى تعمل بتناسق وتعاون مع الأحداث المذكورة وبالرغم من ان الاوبرون *ger* سمي بهذا لانه يشارك في عملية الانبات الا ان العديد من انزيماته تلعب دورا مهما في تكوين البوغ الداخلي .

وباختصار فان السبب في سير الخلية الام والبوغ الاول في طريقين مختلفين يعود الى الاختلاف في عوامل سيكما ، فالبوغ تقرا معلوماته بمساعدة δ^F و δ^G ويتحول الى شكل سابيت . اما الخلية الام فتقرا المعلومات فيها بمساعدة δ^E و δ^K تحت تاثير البروتينات SpoIII D و Ger E وتقوم بتكوين جدار لحماية البوغ من الظروف الخارجية .

واثناء عملية التبوغ فهناك سلسلة من الأحداث والاشارات تكون مرتبة جزئيا لحدوث الاستجابة من اشارات تنتج من الخلية الام الى البوغ الاول وبالعكس ، وهذا التواصل بينهما يضمن حدوث الاحداث بشكل متناسق ومنضبط .

وبعد انتهاء احداث تكوين البوغ فان البوغ الناتج يتصف بانه :

1. يحوي على الكروموسوم الكامل للخلية وكذلك يحوي على الانزيمات اللازمة لتخليق بعض البروتينات ، ونظام توليد الطاقة الذي يعتمد اساسا على تحلل السكر Glycolysis (أي بدون فسفرة تاكسدية) وذلك لانه لا يحوي على السايتوكرومات حتى في الاحياء الهوائية وفي حالة الاعتماد على مسارات نقل الالكترونات فانها تكون مختصرة ومكونة من البروتينات الفلافونية (Flavoproteins) . ويحوي البوغ ايضا على كميات كبيرة من انزيمات الطور الخضري مثل Alanine racemase ، كما يحوي كميات كبيرة من بعض الانزيمات الخاصة مثل Dipicolic acid synthetase وتعود مقاومة البوغ الى حالة الجفاف التي يعانيتها وكذلك لوجود مركب Ca-dipicolinate التي تشكل 5 – 15 % من وزن البوغ الجاف وتتكون من المركبات الوسطية لمسار تخليق اللايسين اثناء عملية التبوغ .

2. اما جدار البوغ فالطبقة الداخلية وهي جدار البوغ فتحتوي على البيبتيدوكلايكان الطبيعي والتي ستصبح الجدار الخلوي للخلايا النابتة بعد عملية الانبات .

3. يحوي القشرة وتمثل اسمك الطبقات التي تحيط بالبوغ وتحوي على البيبتيدوكلايكان غير طبيعي اذ يحوي على اتصالات عرضية اقل من الموجودة في الجدار الخلوي ويكون حساس جدا لانزيم اللايسوزايم Lysozyme وعملية تحلله تلعب دورا مهما في انبات البوغ ، وينظم بفعالية δ^K E .

4. الغلاف Coat ويتكون من بروتين يشبه الكيراتين Keratin يحوي العديد من الاتصالات ثنائية الكبريتيد بين الجزيئات وتكون الطبقة غير ناضجة واليها تعزى مقاومة البوغ للمضادات الحيوية والمواد الكيماوية وتنظم ب δ^K E .

5. العلية الخارجية Exosporium وتكون بمثابة غشاء يحوي البروتينات الدهنية الحاوية على بعض الكربوهيدرات .

ان اطلاق البوغ الداخلي Endospore من تركيب الخلية الام تشارك فيها انواع من المحلات الذاتية Autolysins ، ينتج بعضها في نهاية الطور اللوغاريتمي او في نهاية عملية التبوغ منها

CwIC الذي ينتج في نهاية عملية التبروغ مع محلات تحتاج الى نواتج او بروتينات Ger E للتعبير عنها والآخر هو المسئول عن تنشيط عمليات انتساخ بروتينات الغلاف وكذلك يقوم بتنظيم التعبير عن δ^K الذي يعد المنظم الاخير لمسار معقد يبدأ بـ SpoOA كما مر ذكر اعلاه .

وعملية التحلل الحاصلة لا تتم باستعمال المحلات الذاتية لوحدها وانما تحتاج الى عوامل منشطة ، فبعد تكوين البوغ ينطلق عامل خاص يستهدف الخلية الام ويقوم بتحليلها ، وعملية التحلل هذه تعرض البوغ الى الظروف الخارجية ، كما ان عملية التحلل تؤدي الى إطلاق المواد التي تساعد الخلايا المتبقية التي هي في طور التبروغ وتزويدها بالطاقة لإكمال عملية التبروغ . وتزداد عملية تحلل الخلية الام عند نقل المزروع الى وسط فقير بمصادر الكربون ، والحقيقة ان عملية التحلل تنشط عند نقصان pmf وليس نقصان ATP .

انبات البوغ

وهي عملية أسرع من عملية التبروغ فهي تتم في مدة حوالي 90 دقيقة والسبب في اختلاف الوقت هو ان عملية الانبات هي ليست عملية عكسية للتبروغ . ومعظم الابواغ الناتجة لا يمكنها الانبات مباشرة ولكنها تستطيع ذلك بعد عدة ايام ، وعند ملائمة الظروف مثل تزويدها بالمواد الغذائية او تنشيطها باحد العوامل التي تدمر غلاف البوغ ، ومن العوامل التي يمكن ان تغلب على حالة سبات البوغ هي الحرارة والحك او الحموضة والمواد الحاوية على مجاميع من السلفاهيدريل (SH -) .

ويمكن ان تقسم عملية انبات البوغ الى عدة مراحل :

المرحلة الاولى : وهي التنشيط باستعمال بعض المنشطات المذكورة اعلاه واهمها الحرارة او المواد الكيماوية ، وعند تحفيز مستلم الالنين اليساري الذي هو احد البروتينات او غيرها . ومعظم الانواع المنتجة للابواغ طورت مستلمات للتمييز بين مختلف المنفذات مثل وجودها في وسط غذائي غني ، فالبعض يحفز بالالنين واخر يقدر بالادينوسين واخر يقدر بالكلوكوز وغيرها من المواد .

المرحلة الثانية : بعد ارتباط المستلم بالمنفذات (Effectors) يؤدي الى تنشيط المحلات التي تؤدي الى تفكيك البيبتيدوكلايكان في القشرة ، وقطب الماء وتنطلق Ca- dipicolinate واثناء هذه المرحلة يفقد البوغ خاصيته في المقاومة وعصيانه ويصبح نشطا من الناحية الايضية وتفكك عددا من مكونات البوغ الخارجية بالانزيمات الحالة وتصبح عملية الانبات غير قابلة للرجوع .

المرحلة الثالثة : وهي مرحلة النمو الخارجي للبوغ وهي التي تعيد البوغ الى الطور الخضري فبعد تفكك القشرة والطبقات الخارجية يؤدي ذلك الى بزوغ خلية خضرية جديدة مكونة من جبيلة البوغ (Spore protoplast) ثم تحصل عمليات تخليق للبروتينات ومكونات الخلية الاخرى بشكل نشط جدا ينتهي بانقسام الخلية وهذا يحتاج الى تزويد الخلايا بكل المواد اللازمة لنموها .

والابواغ بالرغم من انها سابتة الا انها تحوي عددا من الانزيمات التي تبدأ بالعمل على مواد الاساس لها بعد وقت قصير من حث عملة الإنبات . ومن مواد الاساس المهمة في الابواغ السابتة هي 3 - phosphoglycerate التي يتم هدمها اثناء الدقائق الاولى لعملية الانبات لانتاج الطاقة ATP . ولذلك يلاحظ ان عمليات الانبات تتميز بكونها عمليات هدم وتفكيك في المراحل الاولى ويتم فيها اطلاق الايونات الموجبة والحامض DPA ويتشرب البوغ بالماء وتحلل القشرة . اما عمليات التخليق الحيوي فتتمثل بعمليات النمو الخارجي الذي يؤدي الى انفلات البوغ من الغلاف Coat ويليه نمو وانقسام الخلايا .

اما الابتدائيات فعند تعرضها لظروف قاسية فانها تعاني حالة التكيس Encystment وتكون الاكياس Cysts السابتة ، وتكون الاكياس ذات نمط تركيبى معين فتكون الطبقات الخارجية الحاوية على بروتينات غير ذائبة في الحوامض . اما الطبقة الداخلية Endocyst مكونة من السيليلوز ولا تذوب في القلويات . وتكون مقاومة للمواد القاتلة خاصة بعد تكون الجدار السلياويزي وذلك لكونه يشكل حاجزا فيزيائيا ويكون مسئولا عن قلة الحساسية . وتكون الاكياس في حالة سبات من الناحية الابيضية

الأغشية الحيوية Biofilms

إحدى المظاهر التي تتعامل بها الاحياء المجهرية للعيش في الطبيعة والتي تختلف تماما عن عيشها في الأوساط الغذائية المختبرية او اوساط معدة التصنيع ، لذلك كان لابد من التعامل مع الموضوع لما له من اثر كبير في استخدامات الاحياء المجهرية والتعامل معها في مجالات كثيرة في التقنيات الحيوية مثل المجالات الطبية والبيئية وغيرها .

والاغشية الحيوية معروفة منذ أمد بعيد وتشير الدراسات والنظريات الى ان الاغلبية العظمى من الاحياء المجهرية تنتظم بشكل مجاميع تعيش في الاغشية الحيوية ملتصقة الى سطوح الانظمة البيئية التي توجد فيها ، وان حوالي 99 % من الاحياء المجهرية في البيئة تعيش في أغشية حيوية لأنها توفر لها الحماية ضد العديد من العوامل مثل المضادات الحيوية او المواد الكيماوية او العاثيات او عمليات الالتهايم من قبل الجهاز المناعي او تاثير مضادات الأجسام المضادة التي يكونها المضيف .

وقد وضعت عدة تعاريف للاغشية الحيوية كلها تصب في مضمون واحد هو وجود الاحياء ضمن تراكيب تحميها وهذه التراكيب قد تكون ليفية او مكوثرات سكرية ملتصقة بالسطوح الصلبة . وتكون سطوح لزجة على السطوح الصلبة في البيئة ، تتجمع فيها الخلايا من نوع واحد او انواع مختلفة من الاحياء مثل البكتريا والخمائر والفطريات ، التي تكون على شكل خلايا مفردة او مستعمرات صغيرة يمكن ان تنفقت منها الخلايا ولكن في العموم يكون التصاق الخلايا في الاغشية غير قابل للرجوع .

وداخل الاغشية الحيوية تختلف فعاليات الخلايا المقيمة Sessile cells عن الخلايا النامية بشكل عالق ، اذ يحصل تداخل كبير بين الخلايا في الحالة الاولى بينما يكون التداخل بسيط في الحالة الثانية

الطبيعة التركيبية للاغشية الحيوية : تتكون من مكوثرات سائلة الشحنة وسكريات مكوثرة او غيرها من المواد ويمكن ان تحوي على مواد لا عضوية ، وتكون ذات رطوبة عالية ، وتلتصق الاغشية الحيوية الى السطوح الصلبة كما ذكر وكذلك مع بعضها وتحوي الاحياء المجهرية داخل الثقوب الموجودة فيها ، وعملية الالتصاق تؤدي الى قدح التعبير عن الجينات التي تسيطر على عمليات تخليق الاغشية الحيوية والالتصاق ، وهذه الجينات تبدأ العمل عند بدء التصاق الخلايا .

اين توجد الاغشية الحيوية :

توجد في اغلب البيئات الطبيعية والصناعية ، واكثرها اهمية التي تتولد عند الأمراض ، فهي يمكن ان توجد عند التهاب صمامات القلب ، التهاب الأذن الوسطى ، التهاب غدة البروستات البكتيري المزمن والتحوصل الليفي وكذلك حول الأسنان Dental plaques والعدسات اللاصقة عند استعمالها في العيون ويمكن ان تشغل الممرات التنفسية في مرضى التحوصل الليفي اذ تقوم *Ps. aeruginosa* بتكوين الاغشية الحيوية . كما توجد على الأدوات الطبية مثل القنطرات Catheters التي تستعمل في مناطق مختلفة من الجسم وكذلك الأدوات المستعملة في الفحص وحتى في ممرات الماء في عيادات طب الاسنان . ووجد ان البكتريا *Staph. aureus* , *Staph. epidermidis* تنتشر حول العدسات اللاصقة وكذلك توجد في الاغشية الحيوية في الفم .

تكوين الاغشية الحيوية

تبدأ عملية تكوين الاغشية الحيوية عند حصول عملية الالتصاق ، ولذلك فانها يمكن ان تتأثر بطبيعة السطوح . واول الخطوات هو استعمار السطوح ، والبكتريا يمكن ان تستعمل الاسواط او الشعيرات الجنسية للالتصاق وانواع اخرى تعتمد على طبيعة سطوحها للالتصاق وعندما تصل أعداد الخلايا الى حد كبير تفرز جزيئات واطنة الوزن الجزيئي ضمن ظاهرة تحسس الزحام مثل AHLs (كما مر ذكره سابقا) وعندما يصل تركيز المواد حرجا تبدأ الخلايا بتغيير تصرفاتها وتبدأ بتنشيط مجموعة من الجينات المختلفة والتي تختلف من نوع الى اخر وتبدأ الخلايا بإنتاج السكريات المكوثرة الخارجية . فمثلا في البكتريا *Ps. aeruginosa* التي تنتج الالجينات بواسطة الانزيم Phosphomannomutase المسيطر عليه بالجين *aglC* ، فالجين يبدأ بالتعبير عنه في الدقائق الأولى بعد عملية الالتصاق . وقد وجد ان هناك 45 جين يحصل فيها تغيير عند اقامة الخلايا في الاغشية الحيوية عما هو الحال عند النمو بشكل عالق .

وبعد تكون الغشاء الحيوي يصبح التركيب له عالي للزوجة ويكون بمثابة تراكيب مطاطية ، ويلاحظ ان الاغشية المتكونة تحت ضغوط قوى رج عالية تكون قوية وصعبة التفكيك بالوسائل الآلية ، اما اذا تكونت تحت ظروف معتدلة فتكون سهلة الكسر .

ويمكن دراسة الاغشية الحيوية بعدة طرق منها :

- استعمال المجهر الالكتروني بطرقه المختلفة .
- قياس العد العيوشي للخلايا في الغشاء الحيوي .
- قياس المحتوى البروتيني الكلي .
- قياس السموم الداخلية .
- قياس ATP الكلي .

وهنال طرق اخرى يمكن ان تستعمل لدراسة الاغشية الحيوية للأغراض السريرية .
والاغشية الحيوية ليست تراكيب متجانسة او مكونة من طبقة من الخلايا الميكروبية على السطح وانما هي تراكيب متباينة تتغير باستمرار على النطاق الزمني والمكاني . والوحدات التركيبية فيها هي المستعمرات الصغيرة جدا والتي يمكن ان تتحسس الزحام وتكون مقاومة للأدوية والعوامل القاتلة ويمكن ان تنقل منها الخلايا الى مناطق اخرى . وتحتوي الاغشية كميات كافية من الماء لغرض بقاء الخلايا حية ، وتشكل الخلايا الحية في الاغشية حوالي 15 % ، اما المواد الاخرى فتشكل 85 % ، وتكون بشكل تراكيب تحوي على القنوات ليمر فيها الماء . وتكون للطبيعة التركيبية للاغشية تأثير كبير خاصة في الاصابات المزمنة وذلك لانفلات الخلايا من المستعمرات الصغيرة عند زيادة القوى المسلطة عليها حاملة معها المقاومة .

تغير فعاليات الخلايا داخل الاغشية الحيوية

تظهر الخلايا داخل الاغشية أنماطا مختلفة في فعاليتها التي تختلف عن الحالة العالقة ، فتختلف معدلات نموها والتعبير عن الجينات عما هو الحال في Non - biofilm population التي تشمل مستعمرات بكتيرية او غيرها من الاحياء تنمو على سطح اكرالواساط الغذائية ، اذ لا تظهر فيها صفة المقاومة بشكل اساسي التي تظهر في الخلايا التي تعيش في الاغشية ، وتكون معدلات النمو واطئة عادة ولا يمكن السيطرة عليها ، وانخفاض معدلات النمو تكون مرافقة لصفة كراهية سطوح الخلايا للماء والذي يساعد على استعمار الخلايا للمواقع التي تتصل بها . وتؤدي عمليات تكوين الاغشية الى تنشيط جينات عوامل الضراوة .

المقاومة للأدوية

اهم ما يميز الخلايا داخل الاغشية الحيوية هو مقاومتها للمواد القاتلة مثل المضادات الحيوية او غيرها ، كما انها تكون متوارية عن الجهاز المناعي . فالاحياء داخل الاغشية تكون مقاومة للمضادات الحيوية خاصة تلك التي تسبب إصابات مستعصية بنسبة 20 - 100 مرة بقدر الخلايا النامية بشكل عالق . ولذلك فان الطرق المتعمدة لقياس تأثير المضادات الحيوية على الاحياء المجهرية مثل طرق NCCLs والتي تعتمد على استعمال الخلايا العالقة لا يمكن ان تعطي صورة صحيحة عن كفاءة

الأدوية ضد الاحياء الموجودة في الاغشية ، ولهذا تم إيجاد طرق واجهزة تعتمد الى اختبار المضادات الموجودة او المثبطة في الاغشية الحيوية والتي تكون تحت تأثير العديد من العوامل .

ومن الجدير بالذكر ان طبيعة تركيب الاغشية الحيوية تؤثر على فسلجة الاحياء الموجودة فيها ومنها توارث المقاومة للمضادات بكل انواعها ، واليات المقاومة تشترك فيها عدة اطراف منها :

- تأخر نفاذ المضادات خلال مادة الغشاء الحيوي ، أي ان الاغشية تشكل حاجزا أمام انتشار المضادات .

- تغير معدلات نمو الاحياء داخل الاغشية .

- تغيرات فسلجية نظرا لطبيعة النمو في الغشاء احيوي .

ولكي تكون المضادات مؤثرة فهي يجب ان تنتشر خلال مادة الغشاء الحيوي لتصل الى الخلايا الموجودة فيه وتثبطها . فمثلا تأثير Ciprofloxacin على *Ps. aeruginosa* يحتاج الى 40 ثانية للوصول الى الخلايا العالقة ، في حين يحتاج الى 21 دقيقة للوصول الى الخلايا الموجودة داخل الاغشية الحيوية . كما ان الخلايا العالقة من البكتريا نفسها تكون حساسة للـ Tobramycin بحوالي 15 مرة اكثر من الخلايا الموجودة داخل الاغشية الحيوية . وكذلك الحال مع البكتريا *Staph. epidermidis* . ومن جهة ثانية قد يكون معدل الانتشار ليس هو السبب الوحيد فمضادات اللاكتام و Aminoglycosides تنتشر بسهولة ولكنها تتفاعل مع المواد المكونة للاغشية الحيوية مثل الالجيئات لذلك وبعد حصول التشبع تبدأ بالانتشار والتأثير الذي يحتاج الى وقت طويل يمتد الى 80 - 100 دقيقة ومن اكثر المؤشرات تأثرا هو معدل النمو ، وذلك لان الخلايا في حالة وجودها داخل الاغشية تكون في حالة نمو غير متزامن بشكل كبير فبناء عليه فان أنزيماتها تكون ذات علاقة مختلفة ويمكن ان تكون :

- انزيمات فعالة على طول دورة حياة الخلية .

- بعض الانزيمات تتضاعف كمياتها او فعاليتها عند مراحل معينة من الانقسام وهذه تفكيكها يعتمد على الرقم الهيدروجيني والحرارة ولا تكاد تكون ذات علاقة مع معدلات النمو .

- بعض الانزيمات تكون متناسبة مع الكتلة الحيوية .

- بعض الانزيمات تخلق بشكل دوري اعتمادا على المرحلة من دورة الخلية .

لذلك يكون تأثير الأدوية متغايرا في المزارع غير المتزامنة . مثلا الادوية التي تؤثر على DNA تكون فعالة في الخلايا التي يحصل فيها تضاعف ولذا فان جزءا كبيرا يكون مقاوما لها ، كما ان تأثير مضادات اللاكتام β - lactam يزداد بزيادة معدلات النمو ، اما في المزارع المتزامنة يلاحظ ان الخلايا تكون حساسة عند الانقسام وتصبح مقاومة في المراحل الأخيرة من الانقسام ودورة

الخلية . كما ان بطيء النمو يؤدي الى بطيء قبط المواد أيضا ولذلك كانت المقاومة عكسية مع معدل النمو .

اما الحالة الفسلجية للخلايا في الاغشية والتي تكون تحت ظروف اجهاد متعددة منها قلة المواد الغذائية ووجود المواد السامة وتغير كثير من الظروف فتكون متغيرة ، فقد وجد ان *E . coli* المقتنصة داخل الاكر تكون اكثر مقاومة للمضادات نظرا لقلة الاوكسجين ، أي ان الخلايا تحت اجهاد قلة الاوكسجين . كما ان ارتباط الخلايا وانطمارها في الاغشية الحيوية يؤدي الى كبح عدد من الجينات ومن ناحية ثانية تنشط فعاليات جينات اخرى تؤثر على فسلجة الخلايا وبالتالي على المقاومة .

وربما كانت آلية انخفاض معدلات النمو الأكثر تأثيرا ، والذي يجعل الخلايا متحملة هو تأثير الجين *relA* الذي يحبط عمليات الموت المبرمج في الخلايا . وفي مجتمعات الاغشية الحيوية تظهر المثابرات Presistors والتي هي ضروب من النمط الطبيعي وليست طفرات . فعند اضافة المضادات الى الخلايا في الاغشية الحيوية يحصل قتل بنسبة 100 – 1000 مرة عند نقطة البدء والباقي لا تموت حتى عند زيادة تركيز المادة القاتلة وهذا ما لوحظ عند استعمال عددا من الأدوية ومع أجناس بكتيرية مختلفة ، اذن دائما يوجد قتل اولي كبير يتبعه ظهور مستوى ثابت من عدد الخلايا المقاومة ، وهذا يشير الى زيادة المثابرات في حالة الاغشية الحيوية ، في حين تكون أعدادها قليلة في المجتمعات العالقة او الهائمة والتي يمكن ان يقضى عليها من قبل الجهاز المناعي في الجسم وبذلك فهي لا تشكل مشكلة سريرية الا في حالة الأشخاص معلولي المناعة ، وانخفاض قابلية الجهاز المناعي على التهام الأعداد الباقية من الخلايا هي وراء تحديد MBC وهو تركيز المضاد الذي يؤدي الى تخفيض الاعداد بنسبة اكبر من او مساويا 99.9 % . اما في حالة الاغشية الحيوية والتي تكون بعيدة عن الجهاز المناعي فانها تكون السبب في عودة نمو الاحياء بعد انخفاض تركيز المضاد او عندما يتوقف العلاج او يقطع اعتمادا على غياب اعراض الإصابة المظهرية .

اضافة الى ان الخلايا المثابرة في الاغشية الحيوية تقوم بالتهام المضادات الحيوية المضافة ، كما ان الاغشية ربما لا تؤدي الى زيادة اعداد الخلايا المثابرة مقارنة بوجودها في النمو العالق للخلايا ولكن تبقى مقاومتها تنبع من بقاءها بعيدة عن الجهاز المناعي .

ان وجود الضروب المثابرة مهمة بالنسبة للبكتريا سواء عند نموها بشكل عالق او داخل الاغشية الحيوية وبقاء هذه الخلايا في الحالتين يؤدي الى :

1. حث استجابات الإجهاد او الكرب مثل حث استجابة الاستغاثة SOS واستجابة الصدمة الحرارية والإجهاد التاكسدي وغيرها (التي سيتم ذكرها لاحقا) .
2. الآلية الوراثية مثل ظهور طفرات مقاومة او اكتساب جينات غريبة تحمل عناصر المقاومة .

3. في حالات التغيرات المفاجئة والسريعة فان الوقت لا يسمح للتعبير وحث الاستجابات وبالتالي ستموت معظم الخلايا ولكن وجود المثابرات لا يحتاج الى وقت لتطوير المقاومة ويمكن ان تبقى حية عند حدوث تغيرات مفاجئة . كما ان وجود المثابرات يكون بمعدلات عالية مقارنة بحدوث الطفرات فهي تصل الى 10 – 10000 مرة اكثر من حدوث الطفرات .

حصول المقاومة للمضادات الحيوية التي أصبحت مشكلة سريرية ، والمثابرات وخاصة الموجودة في الاغشية الحيوية قد تكون مراحل وسطية مهمة لتتطور المقاومة .

علاقة الاغشية الحيوية بالامراض

يكون للاغشية الحيوية علاقة بالأمراض الناتجة عن الإصابات والتي تكون اكثر خطورة في الاشخاص معلولي المناعة والتي تتطور ببطيء محدثة اعراض بسيطة ولكنها تكون مستودع لإصابات خطيرة ويكون ذلك متعلقا بإحدى آليات الآتية :

- انفلات خلايا من تجمعات الاغشية الحيوية الموجودة على الادوات والوسائل الطبية مؤدية الى امراض مختلفة في اجهزة الجسم .
- انتاج السموم الداخلية .
- المقاومة للجهاز المناعي .
- تهيئة بيئة ملائمة لتكاثر الخلايا وحصول تبادل البلازميدات والعناصر الوراثية الاخرى .

ففي الحالة الاولى فان الخلايا يمكنها الانفلات من الاغشية نتيجة التكاثر والانقسام التي تحدث ببطيء ويمكن ان تهرب مجموعة من الخلايا ، فزيادة قوى القص والرج على الاغشية يؤدي الى تأكلها وانفلات الخلايا منها ، كما ان انتاج الخلايا للـ AHLs فهو بالاضافة الى انه يشارك في بناء الاغشية الحيوية الا انه يساعد ايضا في انفلات الخلايا ، والخلايا الهاربة يمكن ان تسبب اصابة جديدة او اصابة في مكان اخر .

وفي الحالة الثانية فان الخلايا السالبة لصبغة كرام الموجودة في الاغشية تنتج السموم الداخلية وتؤدي الى حث الاستجابة المناعية للمرضى .

ومقاومة الجهاز المناعي تعد احد جوانب الامراضية لوجود الاغشية الحيوية فمثلا الطبقة الخارجية المخاطية للبكتريا *Staph . epidermidis* تتداخل مع عملية الابتلاع من قبل الخلايا المبتلعة الكبيرة Macrophages وان Opsonic antibodies في حالة التحوصل الليفي تفشل في التوسط في عملية الابتلاع والتخلص من البكتريا المطمورة داخل الغشاء الحيوي . كما ان خلايا الاغشية الحيوية تكون مقاومة للقتل بمركبات الاوكسجين الفعالة المنتجة من قبل Polymorphonuclear leukocytes .

وفي داخل الاغشية الحيوية تتبادل الخلايا البلازميدات ومنها بلازميدات المقاومة ويساعد في عملية الاقتران القرب المكاني للمستعمرات الصغيرة الموجودة داخل الاغشية الحيوية والذي يكون أكثر من كون الخلايا نامية بشكل عالق . ففي البكتريا *Pseudomonas* وجد ان معدل الاقتران يكون 10^{-2} في الاغشية الحيوية اما في حالة النمو بشكل عالق فيكون معدل الاقتران 10^{-7} وهذا ما يفسر انتشار الاحياء المقاومة في المستشفيات . وحالات الاقتران هذه تحصل في الاغشية الموجودة في الفم .

اما في البيئة الموجودة فيها الخلايا داخل الاغشية فتكون مقاومة للمعادن الثقيلة مثل الفضة والنحاس وغيرها ، وتوجد العديد من الاحياء التي تغطي سطوح المعادن وهذه تستغل في العمليات البيئية المتعلقة بالمعادن الثقيلة وتعدينها (كما سيأتي ذكره لاحقا)

والأدوات الطبية المصنوعة من المعادن يمكن ان تغطي بالاغشية الحيوية ولذلك فالمحاولات جارية للتلاعب بنوعية المعادن وإنتاج أدوات وأنابيب ذات مواصفات خاصة لا تسمح بتكوين الاغشية الحيوية ، وذلك لان عمليات التعقيم والتنظيف أصبحت غير مجدية واخيرا تم التركيز على استعمال المواد القاتلة المؤكسدة والتنظيف الآلي . ويمكن ان تثمر هذه الجهود فيما اذا اقرنت بوسائل اخرى ومنها :

- منع تلوث الأدوات .
 - منع التصاق الخلايا الميكروبية الأول للأدوات .
 - ايجاد مواد تنفذ داخل الاغشية وتقتل الخلايا .
 - التخلص من الادوات الملوثة او الاعتماد على وسائل تستعمل لمرة واحدة .
- وقد استعملت وسائل اخرى منها استعمال الأمواج فوق الصوتية Ultrasonic ، واستعمال الانزيمات مثل استعمال Alginate lyase لتفكيك الالجيئات والسماح للمضادات بالنفوذ والوصول الى الخلايا الموجودة فيها .
- ومن الامكانيات الاخرى التي يمكن استغلالها استعمال AHLs الذي يشارك في بناء الاغشية الحيوية وكذلك انفلات الخلايا منها . وهو احد مكونات تحسس الزحام وذلك باحداث اضطراب في نظام تحسس الزحام . كما يمكن تشخيص الجينات العاملة لتخليق الاغشية خاصة في البداية ومنع انتساخها وبالتالي منع تكوين الاغشية أي التعرف على الاغشية الحيوية على المستوى الوراثي . ولذلك فعند ظهور الاصابات عصبية العلاج بالمضادات الحيوية وعصبية على دفاعات الجسم ، لابد من النظر الى الناحية الوراثية . وعند تطوير لقاحات للممرضات العصبية يجب استعمال النمط المظهري للخلايا الموجودة في الاغشية الحيوية واستعمالها عند تطوير مضادات حيوية جديدة .

ومن التراكيب الاخرى التي توجد فيها الخلايا هي التراكيب الصفائحية **Lamina** وهي تراكيب تحتوي صف من الخلايا ، والقديمة منها تحتوي على صفين او اكثر من الخلايا التي توجد بينها كميات كبيرة من المواد الرابطة وتكون الخلايا مرتبة بشكل عمودي . وهذه التراكيب لا تلتصق بالزجاج او او السطوح البلاستيكية وانما تستقر في قعر الدوارق او تطفو عندما تكون الدوارق مهزوزة .

اما الجيوب **Packets** فتكون على شكل تراكيب كروية تنظم داخلها الخلايا وتكون حاوية على المواد المائلة ويصل قطرها الى 10 خلية او اكثر وتكون مقاومة للتدمير الآلي او العوامل الكيماوية ولا تسمح بمرور المضادات الحيوية لتصل الى الخلايا ، وربما كانت هذه التراكيب مهمة لتأقلم الخلايا مع البيئات القاسية ، ويمكن استعمال الهندسة الوراثية لغرض تغيير التركيب التي تتجمع فيها الخلايا لاستعمالها في المفاعلات الحيوية التي يكون الجريان فيها سريع ، او التي يحدث فيها تذبذب كبير في الظروف مثل الحرارة والأرقام الهيدروجينية لتوفير وسائل تساعد في زيادة إنتاجية التصنيع الحيوية .

العوامل المؤثرة على الأحياء المجهرية

تعرض الاحياء المجهرية للعديد من العوامل التي تهدف القضاء عليها ، والبعض يمكن ان تتطبع عليه وهذا ما سيتناوله الفصل الخاص بدراسة الاجهادات او الكروب **Stresses** . اما المناقشة التالية فهي حول العوامل المؤثرة التي تكون الحاجة ماسة اليها في الحالات الصحية او حالات استعمال مزارع نقية لعمليات الانتاج التي تحتاج الى تعقيم صارم . ونظرا لاختلاف الاحياء فيما بينها فقد اختلفت الاهداف التي تعمل عليها المواد القاتلة .

المواد القاتلة **Biocides**

تشمل عدة مجاميع من المركبات وتختلف عن المضادات الحيوية بأن لها اكثر من هدف في الخلية الحية ، في حين ان المضادات الحيوية تكون لها أهداف محددة . وتشمل المضادات الميكروبية مجموعة من المواد الحافظة ، او قاتلات البكتريا وقاتلات الفطريات والمواد التي تقضي على الفيروسات واخرى تقضي على الابواغ ، ومنها ما يقضي على الطحالب والابتدائيات ، فبعض الطحالب تكون تراكيب الحصىرة **Mat** في المياه العذبة وبرك السباحة وابراج التبريد لذلك كانت السيطرة عليها ضرورية ، اضافة الى ذلك فبعض الطحالب تسبب التسمم الغذائي ولذا فان البحث عن مواد قاتلة لها **Algaecides** وغيرها بعيدا عن المجال العلاجي ومنع الإصابات ضرورية لجوانب الحياة الاخرى . وتوجد اختلافات كبيرة بين تراكيب ومكونات الخلايا الميكروبية كما موضح في الجدول الآتي (جدول 6) .

جدول 6 : تركيب الطبقات الخارجية لأحياء مختلفة التي يمكن استهدافها

الامثلة	التركيب الخارجية	الاحياء المجهرية
المكورات العنقودية	الجدار الخلوي / الببتييدوكلايكان	مكورات موجبة لصبغة كرام
<i>Ps, aeruginosa, E. coli</i>	الاعشية الخارجية / الدهون الفوسفاتية LPS	بكتريا سالبة لصبغة كرام
<i>Mb. tuberuclosis</i>	الجدار الخلوي / Mycolate arabinogalactan	بكتريا السل
<i>Bacillus spp</i>	أغلفة البوغ الخارجي / أواصر S-S المقاومة للقلوية أغلفة البوغ الداخلية / الببتييدات الحامضية القشرة / الببتييدوكلايكان الخاص بالبوغ	البكتريا المكونة للابواغ
<i>Muor rouxii</i> <i>Asp. niger</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>C. albicans</i>	الجدار الخلوي / الكايتين ، Chitosan الجدار الخلوي / الكايتين والكلوكان الجدار الخلوي / الكلوكان والمانان	الخمائر والفطريات
<i>Cryptosporodium parvum</i>	اغلب الاشكال المتكيسة السميكة	الابتدائيات المعوية
<i>Acanthamoeba castellani</i>	الاعشية السميكة المتضاعفة الاكياس الحاوية على السليلوز	ابتدائيات اخر
الطحالب الخضراء Chlorophyta الطحالب البنية Phaeophyta الطحالب الحمراء Rhodophyta	الجدار الخلوي / السليلوز والسكريات المكوثة الاخرى ومكونات الجدار الاخرى	الطحالب

وهناك عدة عوامل تؤثر في فعالية القاتلات الحيوية :

- التركيز المستعمل .
- مدة التعرض للمادة .
- الحرارة .
- الرقم الهيدروجيني .
- وجود المواد العضوية الملوثة .

• نوع الميكروب المستهدف .

وبعض القاتلات يمكن ان تؤثر على أكثر من نوع من الكائنات المجهرية ففي هذه الحالة تكون من الصعوبة تحديد الاسباب والأهداف مقارنة بالمضادات الحيوية . ولكن معرفة آلية التعطيل والمقاومة لها تعطي فكرة عن آلية التخصص في التأثير . ويكون تأثير القاتلات معتمدا على التركيز بشكل اكبر وتكون الاختلافات في التأثير كبيرة بحيث يصعب استخلاص الاستنتاجات وذلك لان الاختلافات موجودة حتى في المجموعة الواحدة نفسها مثل بكتريا موجبة او سالبة لصبغة كرام او في Mycobacteria ، اضافة الى ذلك فان الاختلافات توجد في افراد النوع الواحد كما في حالة الابواغ والخلايا الخضرية وكذلك اثناء الإنبات او النمو الخارجي للبوغ والخلية الخضرية المتكاملة والفتية . وتؤثر الأوساط الغذائية او البيئات على التراكيب الخلوية مما يؤثر في استجابتها للمضادات الميكروبية وحتى المضادات الحيوية ومثل هذا التداخل يحصل حتى في المضادات الحيوية فمثلا المضادات التي تؤثر على رايبوزومات البكتريا 70S وتنشط تخليق البروتينات فانها يمكن ان تؤثر على رايبوزومات الماييتوكوندريا والبلاستيدات في الخلايا حقيقية النواة وكذلك الحال مع المضادات التي تتداخل مع تخليق DNA وبعض المسارات الايضية .

تأثير القاتلات الحيوية

تبين مما ذكر اعلاه ان القاتلات تكون ذات انتخابية واطنة وتبدأ فعالية تأثيرها بالامتزاز على الخلايا وقبطنها فهي تتداخل مع التراكيب السطحية للخلايا الكاملة بأنماط مختلفة اعتمادا على التراكيب السطحية ، فقد تظهر الاحياء المجهرية نمط امتزاز متشابه . وفي حالة القاتلات وبعض المضادات الحيوية يجب ان تعبر الطبقات الخارجية لتصل الاهداف داخل الخلية .

وتدخل المواد بطريقة الانتشار المنفعل Passive diffusion في المكورات العنقودية ولكن توجد طرق اخرى في الاحياء الاخرى . ففي البكتريا السالبة لصبغة كرام فان دخول المواد عبر الغشاء الخارجي يعتمد على تركيبها الكيماوي ، فالمواد المحبة للماء تدخل عبر القنوات Porins وهو طريق مكون من بروتينات محبة للماء (الممر الداخلي) ، اما المضادات مثل البيبتيدات المتعددة الكارهة للماء فتدخل عبر الممرات الكارهة للماء . واطرافها فمثلا البيبتيدات الكبيرة مثل Vancomycin لا يمكن ان تدخل بسهولة الى البكتريا السالبة لصبغة كرام ويكون مستوى دخولها حتى اقل من دخول المضادات الكارهة للماء مثل Fusidic acid والاثرومايسين والريفامبيسين والنوفوبايسون وبعض المواد التي هي عوامل موجبة الشحنة مثل (CHx) Chlorohexidine ومركبات الامونيوم الرباعية وبعض المضادات الحيوية ذات البيبتيدات المتعددة فتدخل الخلايا ولكن بعد تدمير الغشاء الخارجي وهذا يعني

ان الطبقات الخارجية لها دورا كبيرا في التأثير على مدى فعالية المضادات الميكروبية على الاحياء المجهرية .

وفي الخميرة *S. cerevisiae* حقيقية النواة تكون ذات جدار سميك يحوي على ثقبوت تتحكم بدخول بعض المواد مثل CHx الى داخل الخلايا التي تحوي جدرانها على ثقبوت صغيرة جدا فلا تسمح بدخول الجزيئات اكبر من 700 . ومن الدراسات المقارنة يمكن استنتاج ان البكتريا الموجبة لصبغة كرام هي اكثر عرضة من البكتريا السالبة لصبغة كرام والفطريات .

وتتأثر الطحالب بتراكيز قليلة من مركبات الامونيوم الرباعية وذلك لعدم وجود حواجز لمنع قبط هذه المواد ويكون التأثير كبيرا نظرا لكون المركبات قليلة الوزن الجزيئي وحررة الانتشار، ولكن خلايا الطحالب لا تسمح بدخول مركبات او جزيئات كبيرة . ولذلك فان الطحالب الملوثة للتجمعات المائية يمكن السيطرة عليها باستعمال مركبات الامونيوم الرباعية والكلور وبعض مركبات النحاس المحورة بتراكيز تشبه المستعملة للسيطرة على البكتريا .

ومن جهة ثانية فان الابواغ بصورة عامة تكون أكثر مقاومة من الخلايا الخضرية فمثلا في البكتريا *B. subtilis* تكون الخلايا الخضرية أكثر تأثرا بالكلور من الابواغ المتكاملة ، اما الابواغ التي تخلو من الأغلفة Coats تكون أكثر قبطا لبعض المواد مثل اليود وذلك يعني ان أغلفة البوغ تعمل حواجزا امام انتقال المواد .

الأهداف التي تعمل عليها المضادات الميكروبية : بالرغم من اختلاف الاحياء المجهرية من النواحي التركيبية والفسلجية ودرجة التعقيد ولكن توجد أهداف عامة يمكن ان تهاجم من قبل القاتلات الحيوية ومنها الموضحة في الجدول (7) .

ومثل هذه الاهداف التي توجد في الخلايا الخضرية للأنواع المختلفة واغلبها فحصت في البكتريا ولكن يمكن تعميمها ولكن بشيء من التحفظ .

الالديهيدات Ahdehydes

تكون بعضها مهمة كمركبات نكهة مثل الاستالديهيد في اللبن الذي تنتجه بوائد اللبن المستعملة ، له تأثير قاتل على الاحياء التي يمكن ان تلوث المنتج او الحليب المعد للتصنيع ، وبذلك يمكن ان تحمي المنتج وتزيد من مدة صلاحيته ، وبعض هذه المركبات تستعمل في عمليات التعقيم والسيطرة على الاحياء ومنها كلوترالديهيد (GTA) Glutaraldehyde وتعمل المادة على الخلايا الخضرية ، وآلية عملها تكوين اتصالات عرضية بين المجاميع الامينية في البروتينات خاصة ثمالات اللايسين الموجودة على سطح الخلايا مؤديا الى تلازن الخلايا مثل البكتريا والخمائر وبذا تترسب وتركد الى الأسفل . وفي الفطريات يكون الكايتين Chitin هو الأكثر عرضة لتكوين الاتصالات

العرضية وهو لا يؤثر على المواد الوراثية لايواغها ولكنه يفقدها القابلية على الإنبات . ويؤثر بشكل كبير على مجموعة بكتريا السل نظرا لطبيعته المحبة للدهون .

جدول 7 : الاهداف العامة المستهدفة من قبل القاتلات الحيوية

المادة	المكورات	بكتريا السل	البكتريا السالبة لصبغة كرام	الايواغ	الفطريات	الابتدائيات
CHx*	الاعشبية الخلوية	الاعشبية الخلوية	الاعشبية الخلوية (الداخلية)	الاعشبية	غشاء البلازما	غشاء البلازما
QACs	الاعشبية الخلوية	الاعشبية الخلوية	الاعشبية الخلوية (الداخلية)	الاعشبية	غشاء البلازما	غشاء البلازما
GTA	التداخل مع مجاميع الامين في البروتينات	التداخل مع مجاميع الامين في البروتينات	التداخل مع مجاميع الامين في البروتينات	الغاء الانبات	التداخل مع مجاميع الامين في البروتينات	-
OPA	التداخل مع مجاميع الامين في البروتينات	التداخل مع مجاميع الامين في البروتينات	التداخل مع مجاميع الامين في البروتينات	الغاء الانبات	التداخل مع مجاميع الامين في البروتينات	-
الفينولات	الاعشبية الخلوية	الاعشبية الخلوية	الاعشبية الخلوية (الداخلية)	الاعشبية	الاعشبية الخلوية	-
CRAs	- تغيير المجاميع الثايولية - الاعشبية الخلوية - تخليق DNA		- الاعشبية الخلوية (الداخلية) - تغيير المجاميع الثايولية - تخليق DNA	- الاعشبية الداخلية - القشرة		-

- غير معروف التأثير

* يراجع المتن حول الاختصارات .

ونظرا لقابلية GTA على تكوين الاتصالات العرضية لذلك يستعمل كمثبت للنماذج المعدة للفحص بالمجهر الالكتروني مثل فيروسات شلل الأطفال Polioviruses لانه يتفاعل مع بروتينات القفيصة .

اما المركب الاخر من هذه المجموعة Orthophalataldehyde (OPA) وهو من الالديهيدات ثنائية الحلقة ويقوم ايضا بعمل اتصالات عرضية ولكن بشكل اقل من GTA . اما معاملة الايواغ ب OPA يجعلها غير قادرة على الانبات ولا يمكن شفائها فيما بعد .

القاتلات الحيوية موجبة الشحنة

ومنهما مركبات الامونيوم الرباعية (QACs) و CHx وتعمل على تدمير الاغشية الخلوية في العديد من الاحياء المجهرية ومنها البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والخمائر وكذلك الاطوار الخضرية (Trophozoite) والاشكال المتكيسة من الابتدائيات Protozoa . والمعاملة بالـ CHx تؤدي الى فقدان ايون البوتاسيوم K^+ من الخمائر ، ويؤثر بشكل كبير على عملية التبرعم للخميرة *Candida albicans* ويؤدي ايضا على فقدان مكونات الساييتوبلازم .

ونظرا لتأثيره على الاغشية الخلوية لأحياء مختلفة وبشكل مختلف فقد تكون له اهداف متشابه مثل الدهون الفوسفاتية ، وذلك لان كل من CHx ومركبات الامونيوم الرباعية ترتبط الى الدهون الفوسفاتية ، ومركبات الامونيوم الرباعية تعمل بالآلية نفسها في الطحالب عند استعمالها بتركيز واطنة ، اما تأثيره في مجموعة بكتريا السل فيكون موقفاً *Mycobacteriostatic* وليس قاتلاً *Mycobactericidal* مما يشير الى احداث ضرر في الاغشية الخلوية وان كانت هناك بعض مركبات الامونيوم الرباعية تظهر التأثير القاتل لهذه البكتريا .

اما تأثير مجموعة المركبات على الابواغ ، فان اضافة CHx يكون مؤثراً في المراحل الاولى من عملية التبروغ مؤدية الى منع إكمال عملية التبروغ في *B. subtilis* وذلك بالتأثير على الاغشية الخلوية في المراحل الاولى من التبروغ . اما في الابواغ الناضجة فان كل من قشرة البوغ والاعلفة الخارجية تعرقل عمليات دخوله . ومن المركبات الاخرى في هذه المجموعة هي *Polymeric biguanides* التي تؤثر على الاغشية الخلوية (الداخلية) في *E. coli* مؤدية الى فصل الدهون وكذلك تكوين الدهون الفوسفاتية الحامضية في الغشاء الخلوي . ويعتقد ان الآلية نفسها تعمل في الطحالب ولذلك يستعمل في السيطرة على نمو الطحالب في برك السباحة .

ومن الجدير بالذكر ان أعضاء المجموعة الاخرى المذكورة اعلاه وهي مركبات الامونيوم العامة وكذلك CHx لا تؤدي الى فصل الدهون ، وانما يمكن ان تؤدي الى تغيير الحوامض الدهنية في الاغشية كما يحصل عند معاملة البكتريا *Ps. aeruginosa* .

الهالوجينات Halogenes

تضم مجموعة من المركبات ، وتظهر الاحياء المجهرية استجابات مختلفة والمستعمل منها الكلور واليود .

الكلور : يؤثر على الاحياء المجهرية المختلفة وفعاليتها تتأثر بعدد من العوامل منها التراكيز المستعملة ، ودرجة الحرارة والأرقام الهيدروجينية ومدة التعرض للمركب والكلور الجاهز الذي ينتج من المركبات المستعملة *Hypochlorites* ، ويعد المقياس لقابلية المركبات على الأكسدة والتي يعبر عنها بالكمية المكافئة من عنصر الكلور والمركب الاكثر فعالية هو *Hypochlorous acid*

(HOCl) ويكون له عدة اهداف لمهاجمتها فهو يؤثر على الاغشية الخلوية والمجاميع الامينية في البروتينات ويستعمل الكلور وخاصة HOCl في السيطرة على الفيروسات ، وتحتاج الفيروسات تراكيز اعلى من البكتيريا خاصة عند احتواء الفيروسات على البروتينات أي عند وجود القفصة ، ولكن يعتقد ان تأثيراته الاولى تكون من :

1. الأكسدة القوية لمجاميع الثايول الى كبريتيدات ثنائية Disulfides .
 2. له تأثير مدمر لعمليات تخليق DNA ويؤدي الى تكوين مشتقات حاوية على الكلور للقواعد النتروجينية في النيوكليوتيدات ومثل هذه قد تكون عامة بالنسبة للاحياء المجهرية ولكن ليست للابواغ التي لا تتعرض مادتها الوراثية للتلف .
- ومن مركبات الكلور الاخرى هو ثنائي اوكسيد الكلور وبعض مشتقاته ، والذي يكون فعالا تجاه البكتيريا والفطريات والابتدائيات والطحالب . وهدفه الجزيئي الدقيق غير محدد ، بصورة عامة يؤدي الى تثبيط تخليق البروتينات وتدمير الاغشية الخلوية

اليود وحاملات اليود

المحاليل المائية والكحولية لليود مع KI تعد مركبات قاتلة للميكروبات ، اذ يكون لها تأثير مميت سريع للبكتيريا وابواغها والفطريات والخمائر والفيروسات .

اما حاملات اليود Iodophors فهي معقدات حاملة لليود من المواد التي أذيب فيها اليود ومنها المواد المقللة للشد السطحي Surface active agents ، ويكون عامل التركيز مهما جداً في اظهار فعاليتها فكلما خففت المادة زاد تأثيرها القاتل .

واليود يتداخل مع مجاميع الثايولية في الانزيمات والبروتينات والتي يعتقد انها السبب في قتل الميكروبات والابواغ . ويؤدي اليود الى تغيرات مظهرية في الفيروسات مثل فيروس شلل الاطفال نتيجة لتأثيره على بروتينات القفصية وليس على المادة النووية . ونظرا لشيوع مجاميع الثايول (SH-) في البروتينات لذلك يعتقد ان اليود يؤكسد هذه المجاميع في الحامض الاميني السستئين Cysteine ، ويتداخل اليود ايضا مع مجاميع الفينول الموجودة في الحامض الاميني التايروسين ومجموعة Imidazol في الحامض الاميني الهستيدين اضافة الى تداخله مع الدهون وخاصة الدهون الفوسفاتية ، لذلك يعتقد انها وراء تأثيره القاتل للفيروس الحاوي على الغلاف الدهني الخارجي .

مولدات البيروكسيد Peroxygens

وتشمل مجموعة من المواد ومن اهمها بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 والاوزون O_3 وحامض

Peracetic acid (CH_3COOOH) .

ومن المعروف ان بيروكسيد الهيدروجين مؤكسد قوي ويكون تأثيره ناجما عن تكوينه لجذور الهيدروكسيل الفعالة $OH^\cdot$ التي تؤكسد المجاميع الثايولية في الانزيمات والبروتينات . كما ان لها

تأثيرات اخرى فهو يؤدي الى تفكك وحدات الرايبوزوم 70S الى وحداتها الفرعية كما انها تؤدي الى تغيرات على سطوح الخلايا إضافة الى فلق العمود الفقري للـ DNA .

اما عند معاملة الابواغ ببيروكسيد الهيدروجين فانها تبقى محتفظة بالحواجز النضوحية لذلك لا تحصل فيها اضرار كبيرة للاغشية الداخلية للبوغ ولكن في بعض الاحيان فان المعاملة تؤدي الى جعل الابواغ حساسة للحرارة وحدث اضرار فيها .

واضافة الى ما ذكر فان للبيروكسيد اهدافا في الاغشية الخلوية وهي الحوامض الدهنية غير المشبعة Polyunsaturated fatty acids والتي توجد بنسب ضئيلة في الابواغ . اضافة الى ذلك فان البيروكسيد يؤثر على الاطوار الخضرية والإشكال المتكيسة في الابتدائيات .

الاوزون

يقع ضمن مجموعة المؤكسدات القوية ويكون قاتلا قويا للبكتريا وابواغها والفطريات . ولكن الفطريات والخمائر اقل حساسية من البكتريا . ويؤثر على الاشكال المتكيسة من الابتدائيات . والية تأثيره تعتمد على تفاعله مع مجاميع الثايول في الانزيمات والبروتينات ، وكذلك يقوم بتحويل القواعد البيورينية والبيريميينية في الحوامض النووية لذا فله اكثر من هدف في التأثير مما أدى الى وسع تأثيره على الاحياء المختلفة .

اما حامض Peracetic acid (PAA) هو اكثر المركبات المعطية للاوكسجين ، يكون قاتلا للبكتريا وابواغها وكذلك الفطريات والخمائر ولكن بدرجات متفاوتة . وعمليات الاختزال التي تحدث بواسطة العناصر الانتقالية تجعل الابواغ حساسة جدا للمركب . والجذور الحرة التي يولدها تؤثر على مجاميع الثايول في الانزيمات والبروتينات وتؤكسدها ، وتعد أهدافه يوسع مدى الاحياء التي يؤثر فيها .

الفينولات

مواد تستعمل كمواد حافظة و مطهرات . ومعاملة الاحياء المجهرية بها يؤدي الى نضح مواد الخلية وذلك لتدمير الاغشية الخلوية ، اضافة الى تأثيره المخثر داخل الخلايا عند استعمال تراكيز عالية ، وتكون الخمائر والفطريات اقل تأثراً من البكتريا .

وعند التراكيز الواطئة تعمل المركبات كـ Uncoupling agent في الخلايا الحساسة . اما الابواغ فتكون ذات مقاومة حتى عند استعمال التراكيز العالية ولكن عملية الإنبات تكون حساسة لتراكيز واطنة ، ويمكن ان يؤثر على مجموعة بكتريا السل وذلك بالتأثير في أغشيتها الخلوية .

(Triclosan) Phenylether

احد مشتقات الفينول يكون مضادا ميكروبيا واسع المدى في توقيف الاحياء المجهرية . التراكيز القليلة تكون موقفة لنمو البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وكذلك مجموعة بكتريا السل ، ولكن عند التراكيز العالية يكون تأثيره قاتلا ولكن هناك بعض السلالات من بكتريا *Ps. aeruginosa* تكون مقاومة بشكل طبيعي له .

المركب يؤثر على الاغشية الخلوية ، اضافة الى انه يؤدي الى ايقاف عمليات تخليق الدهون في بعض خطواتها وعندما يكون بتركيز قاتلة فانه يؤدي الى نضوح ايونات البوتاسيوم . ويلاحظ انه عندما يمتز على الاغشية الخلوية وتكسيره لها تزداد كميات الممتزة مما يشير الى ظهور مواقع اخرى للامتزاز .

الحوامض العضوية والاسترات

هناك بعض الحوامض التي تستعمل في الحفظ خاصة الأغذية مثل حامض البنزويك والسوربيك وهذه تكون عوامل فعالة ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام وكذلك الخمائر والفطريات ، كما انها تمنع إنبات الابواغ ولكن لا تقتلها . ويعتمد تأثيرها على الرقم الهيدروجيني عند الاستعمال فتكون الفعالية عند رقم هيدروجيني حامضي وتكمن الفعالية في الجزء غير المفكك من جزئية الحامض وان كان الجزء السالب يساهم في بعض الفعالية . وتكون التأثيرات على الاغشية الخلوية وخاصة مكونات pmf ومنها ΔpH ولذلك تتأثر عمليات نقل المواد وتكوين مركبات الطاقة .

ومن الاسترات المستعملة هي استر المثيل واستر البروبيل واستر البيوتيل وتكون بصورة عامة موقفات للنمو وليست قاتلات للبكتريا والفطريات . والتراكيز العالية منها تؤدي الى نضوح المكونات الخلوية الداخلية . اما التراكيز الواطئة فتؤثر بشكل متخصص اذ تمنع تكوين الفرق بالرقم الهيدروجيني (ΔpH) عبر الغشاء الخلوي . لذلك تؤثر على عمليات نقل المواد وغيرها من الفعاليات المعتمدة على توليد القوة الدافعة للبروتون pmf .

ايونات المعادن

سيتم مناقشة الموضوع بشكل اوسع عند مناقشة علاقة التقنية الحيوية الميكروبية بالبيئة ولكن لا بأس من ذكر بعض الحقائق عن علاقة هذه الايونات بالاحياء المجهرية . فايونات الزئبق Hg^{++} والفضة Ag^+ تكون قاتلة للاحياء المجهرية وذلك بتداخلها القوي مع مجاميع الثايول في الانزيمات والبروتينات الخلوية ولكن قد يكون هذا قابلا للرجوع ويعتمد تأثيرها على عدد من العوامل :

- التركيز المستعمل .
- مدة التلامس مع الخلايا .

ويمكن ان تلغى التفاعلات باضافة المركبات الحاوية على الثايول . واطافة الى التأثيرات اعلاه فان ايون ألزئبيك يمكن ان يتفاعل مع رايبوزومات الخلية . كما ان مركبات الزئبق العضوية تمنع النمو الخارجي للابواغ في حين ان الاملاح اللاعضوية تؤثر على عملية الإنبات .

اما فعاليات ايون الفضة فهو يمكن ان يؤدي الى تغيير تركيب الغشاء الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *Ps. aeuroginosa* التي تكون حساسة جدا لايون الفضة . ولا تؤثر الفضة على الابواغ ولكن تؤثر على DNA العاثيات . واملاح الفضة وبعض المعادن الثقيلة الاخرى تؤثر على مجموعة من انزيمات الفطريات وذلك بالارتباط الى المجاميع الفعالة للانزيمات . وتتأثر بعض الخمائر بشكل كبير جدا باملاح الفضة مثل النترات وتترسب الفضة فيها على شكل حبيبات في الفجوات وكذلك في الجدار الخلوي .

العوامل المؤلفة Alkylating agents

ومنها اوكسيد الاثيلين و β - propiolactone وغيرها ، وتؤثر تحت ظروف خاصة ويكون التركيز من العوامل المهمة . وتنشط البكتريا والابواغ والفيروسات والفطريات ربما بنمط متشابه . وآلية عملها تكون بارتباطها بعدد من المجاميع مثل المجاميع الامينية والكاربوكسيلية والثايولية في الانزيمات والبروتينات . اضافة الى ذلك فان اوكسيد الاثيلين يتداخل مع نتروجين الكوانين (N- 7 guanine) في DNA .

الكحولات

ينتج الكحول من بعض الاحياء المجهرية مثل انتاج الكحول الايثلي من خميرة الخبز *S. cerevisiae* على نطاق تجاري ويمكن ان يؤثر على الخلايا المنتجة ويمكن معالجته ببعض التحويرات الى حد ما (كما سيأتي ذكره) والعديد من الكحولات لها تأثير مضاد للميكروبات ، فهي قاتلات سريعة للبكتريا ومنها البكتريا الصامدة للأحماض مثل مجموعة بكتريا السل ، اما الابواغ فلا تتأثر حتى بالتراكيز العالية .

الكحول الايثلي والبروبيلي تعد من مدمرات الاغشية الخلوية ، اذ تحدث اضطراب فيها بعد اختراقها للطبقة الهيدروكاربونية وهي الطبقة الوسطى من الغشاء . ويؤثر الكحول الايثلي ايضا على اهداف اخرى منها عمليات تخليق DNA و RNA والبروتينات والبيبتيدوكلايكان وهي تأثيرات تعد ثانوية بعد تدمير الاغشية الخلوية . كما انه يؤثر وينشط الانزيمات العاملة في دورة تحليل السكر Glycolysis وكذلك العاملة في تخليق الدهون . ونظرا لتأثيره على الاغشية الخلوية فانه يؤدي الى اضطراب في قبط المواد من خارج الخلايا .

ويؤثر الكحول على نضوحية المواد الخلوية في خميرة *S. cerevisiae* المذكورة اعلاه ، وعندما تكون الخلايا متحملة للكحول فان ذلك يعود الى تغير تركيب الدهون الغشائية وميوعة الاغشية مما يؤدي الى منع نضوح المواد الخلوية الى الخارج .

(PEA) Phenyl ethanol و (POE) Phenoxyethanol

مركبات اخرى مشابه تؤدي الى تدمير الاغشية الخلوية ، ولكن عند تراتيز واطئة تكون لها تأثيرات خاصة . فمثلا POE عند تراكيز واطئة يكون له تأثير Uncoupling agent ويؤدي الى نقل البروتونات في *E. coli* .

اما PEA فهو يمنع نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام ولكنه لا يؤثر في *Pseudomonas* مثل *Ps. fluorescens* , *Ps. aeruginosa* وكذلك بعض الانواع التابعة لمجموعة بكتريا السل . اما البكتريا الموجبة فتكون اقل تحسسا مثل البكتريا *Staph . aureus* ولكن بعض مشتقاته الكارهة للماء تظهر فعالية كبيرة ضد البكتريا الاخيرة .

وكل من PEA و POE تظهر تثبيطا لتخليق DNA وتؤدي الى جعل الخلايا بشكل خيوط . وتستخدم في الحصول على مزارع متزامنة Synchronous cultures ، اذ ان هذه المركبات لا تمنع دورات تضاعف DNA التي بدأت في البكتريا قبل الاضافة وإنما تمنع بدء دورات جديدة ، ولذلك تستخدم في رسم الخرائط الكروموسومية للبكتريا .

المضادات الحيوية

مواد ايض ثانوي تنتج من الاحياء لتؤثر في احياء اخرى . وبما انها مواد ايض ثانوي فان إنتاجها يكون مرتبطا بانخفاض معدلات النمو . وتوجد الآلاف منها التي تنتج في البيئة وتساعد الخلايا المنتجة في المنافسة مع الاحياء الاخرى خاصة السريعة النمو . ولها أهداف عديدة ومعروفة في الخلايا خاصة البكتيرية التي تعمل عليها . وتستخدم عدة مؤشرات لتصنيفها منها الاهداف التي تهاجمها ، او التركيب الكيماوي او الاحياء المنتجة او غيرها . وفيما يلي تقسيم المضادات الحيوية وفق الهدف الذي تهاجمه في الخلية مع بعض الملاحظات عليها :

اولا : المضادات المؤثرة في الطبقات الخارجية للبكتريا :

1 – المؤثرة على الجدران الخلوية

- مركبات اللاكتام β - lactam antibiotics وتؤثر بشكل رئيس على الجدار الخلوي وبشكل ادق على مركب البيبتدوكلايكان ومنها

١ – البنسيلينات الطبيعية وتشمل Penicillin V , Penicillin G

ب – البنسلينات شبه التركيبية والمضاهيات وتشمل

1 - البنسلينات المقاومة للانزيمات الحالة للبنسلينات (β -lactamases) ومنها
Dicloxacillin , Flucloxacillin , Methicillin , Nafcillin , Oxacillin ,
Cloxacillin

2 - البنسلينات ذات المدى الواسع أي التي حورت لتشمل عددا اكبر من الاحياء المستهدفة
ومنها . Bacapicillin , Ampicillin , Amoxicillin , Aminocillin

3 – البنسلينات المضادة للزوائف Antipseudomonal ومنها :

Ticarcillin , Mezlocillin , Piperacillin , Carbencillin , Azlocillin

4 – المضاهيات ومنها

Tazobactam

ج – المركبات المشابه للبنسلينات ومنها

1 – Carbapenems مثل Imipene , Meropenem

2 – Monbactam مثل Aztreonam

• السيفالوسبورينات و Cephamycins والمضادات التي لها علاقة بهذه المجموعة

1 – السيفالوسبورينات وقد انتج عدة اجيال منها

1 – الجيل الاول وهي اول السيفالوسبورينات التي انتجت ومنها

Cefadroxil , Cefazolin , Cephalexin , Cephalothin , Cephapirin ,
Cephadrine

2 – مضادات الجيل الثاني وتشمل

Cefaclor , Cefamandole , Cefonicid , Ceforanid

3 – مضادات الجيل الثالث وتشمل

Cefixime , Cefoperazone , Cefotaxime , Cefpodoxime , Ceftazidime ,
Ceftriaxone

4 – الجيل الرابع وتشمل

Cefepime , Cefpirome

ب – مضادات Cephamycins وتشمل

Cefmetazole , Cefotetan , Cefoxitin

ج – المضادات ذات العلاقة بالسيفالوسبورينات ومنها Loracarbef , Moxalactam

• المضادات البيبتيدية

1 – المؤثرة على الجدران الخلوية

ا – البيبتيدات العادية مثل Bacitracin

ب – البيبتيدات السكرية مثل Teicoplanin , Vancomycin

ج – مضاهيات الحوامض الامينية Cycloserine

2 – المؤثرة على الاغشية الخلوية

وتشمل مضادات بيبتيدية مثل Polymyxin B , Polymyxin E

ثانيا : المضادات المثبطة لعمليات تخليق البروتينات

1 – المضادات المؤثرة على وحدة الرايبوزوم الكبيرة 50S ومنها

• Chloramphenicol

• Macrolides مثل Clarithromycin , Dirithromycin , Erythromycin

Troleanandomycin Azithromycin ,

• Lincosamides مثل Clindamycin و Lincomycin

2 – المضادات المؤثرة على الوحدة الرايبوزومية الصغيرة 30S ومنها

• Aminoglycosides مثل Amikacin , Gentamycin , Kanamycin

Netilmicin , Tobramycin , Streptomycin , Spectinomycin

• Tetracyclines ومنها Chlorotetracycline , Demeclocycline

Deoxycycline Minocycline , Oxytetracycline , Tetracycline

3 – مجاميع اخرى مثل Mupirocin تؤثر على تخليق البروتينات ايضا .

ثالثا – المضادات المؤثرة على تخليق وتركيب الحوامض النووية ومنها

• Rifamycins مثل Rifampin , Rifabutin

• Nalidixic acid

• Novobiocin

• Metronidazole

• Clofazimine

رابعا : مضادات الايض Antimetabolite antibiotics

• Sulfonamides وتشمل Sulfadiazine , Sulfacytine , Sulfamerazine

Sulfamethizole , Sulfamethoxazole , Sulfasalazine , Sulfisoxazole

• Trimethoprim

• Aminosalicylate

• Dapsone

• Ethionamide

• Ethambutol

خامسا : توجد مجاميع اخرى لا يمكن ان تنسب للمجاميع اعلاه ومنها

. Pyrazinamide , Nitrofurantoin , Mrthenamine

المقاومة للمضادات الميكروبية

نظرا لكثرة العوامل القاتلة للاحياء المجهرية والتي يجب ان تعيش فقد طورت العديد من الآليات ضد المواد المستعملة ، وأصبحت بعض السلالات مقاومة بشكل كبير وأرقت العاملين في المجال الصحي بالنسبة للأحياء الممرضة ، وازداد الطلب لإيجاد مضادات ومواد فعالة ضد المضر منها .
وقد درست آليات المقاومة في البكتريا بالتفصيل ثم بدرجة اقل في الفطريات والابتدائيات وهناك آليات عامة موضحة في الجدول (8) .

جدول 8: الآليات العامة لمقاومة القاتلات الحيوية

طبيعة المقاومة	الاحياء المجهرية	آلية المقاومة
تقليل نضوحية الخلايا	المكورات العنقودية	زيادة سمك الجدران الخلوية
	بكتريا سالبة لصبغة كرام	وجود الاغشية الخارجية
	مجموعة بكتريا السل	وجود الغلاف الخارجي الشمعي
	الابواغ البكتيرية	وجود اغلفة البوغ الخارجية والداخلية
	الفطريات	الجدران الخلوية
	الإشكال المتكيسة للابتدائيات	تقليل قبط المواد القاتلة
الطفرات	البكتريا الموجبة لصبغة كرام	Enoyl تحوير انزيم reductase وغيرها
	بكتريا سالبة لصبغة كرام	Enoyl تحوير انزيم reductase وغيرها
افراط انتاج الاهداف	البكتريا الموجبة لصبغة كرام	Enoyl زيادة انزيم reductase وانزيمات اخرى
	بكتريا سالبة لصبغة كرام	Enoyl زيادة انزيم reductase وانزيمات اخرى
تفكيك المواد القاتلة	البكتريا	زيادة العديد من الانزيمات والتأثير معتمد على التركيز

دفع المواد القاتلة	العنقوديات ، بكتريا سالبة لصبغة كرام	طرد CHx , QACs
	الفطريات ، الخمائر	طرد الحوامض العضوية والمواد الحافظة

فالخلايا يمكن ان تواجه ضرر المواد بحث حالات التمايز مثل تكوين الابواغ او الاكياس ، او
حث اليات اخرى منها

● **الآلية الاولى :** تقليل وصول المواد المضادة سواء المضادات الحيوية او غيرها الى الأهداف التي
تعمل عليها ، ففي الحالة الطبيعية تكون البكتريا السالبة لصبغة كرام اقل تحسسا للمواد المضادة من
البكتريا الموجبة لصبغة كرام نظرا لوجود الغشاء الخارجي فيها والذي يحد من دخول المواد الى
الخلايا . وكذلك تكون أغلفة البوغ حاجزا نضوحيا أمام نفاذ المضادات الى الداخل .

وتشغل مجموعة بكتريا السل موقعا متوسطا بين الابواغ المقاومة والبكتريا الاخرى ، والمقاومة
المتوسطة التي تظهرها البكتريا تعود الى ان جدرانها الخلوية تكون غنية بالدهون والشموع الكارهة
للماء وتحد من دخول المواد الى الخلايا .

وفي الخمائر يمكن ان يمنع دخول المواد المضادة نتيجة حدوث طفرات في الجدران تؤدي الى
تقليل نضوحية الاغشية ، اذ تتغير الستيرولات مما يؤدي الى قلة ارتباطها ببعض المواد التي تستهدف
هذه التراكيب مثل Nystatin الذي هو من مجموعة المضادات متعددة الأواصر المزدوجة
(Polyenes) .

اما في الابتدائيات فان عملية التمايز والتي تحول الخلايا الخضرية الى أشكال متكيسة محاطة
بطبقات خارجية تحول دون وصول المواد المضادة الى داخل الخلايا .

● **الآلية الثانية :** تعتمد الخلايا الى تغير موقع الهدف ويكون ذلك مجديا جدا في حالة المضادات
الحوية محددة الأهداف وهي الصفة التي تتميز بها المضادات الحيوية عن غيرها من المواد المضادة
واطنة الانتخابية ، ولكن هذه الآلية يمكن ان تستعملها في مواجه انواع مختلفة من المواد المضادة ،
وفي النتيجة تؤدي الى زيادة التركيز المثبط الأدنى MICs وذلك اما بتغير الهدف فيصبح مثلا
بروتين مستهدف غير قادرا على الارتباط بجزيئات المواد المضادة او الزيادة من الجزيئات المستهدفة
بكميات كبيرة بحيث تضحي الخلايا بعدد منها . ويلاحظ ان الكحولات تستهدف دهون الاغشية في
الخمائر فتقوم الاخيرة بتغيير تراكيب الدهون بحيث تحافظ على ميوعة الاغشية عند حد ملائم ولكن
تقل حساسيتها للكحول وغيره من المواد .

● **استعمال آلية الطرد Efflux الى الخارج** ، وتكون هذه من الآليات المهمة في البكتريا عند مقاومتها للمضادات الحيوية ويمكن ان تستعمل مع المواد المضادة الاخرى ، اذ وجد ان العديد من المضخات توجد في الاغشية الخلوية لدفق المواد الى الخارج . واغلبها تكون ذات علاقة بالبلازميدات فمثلا في البكتريا *Salmonella* تطرد ايونات الفضة الى الخارج وذلك بإيجاد المضخات وهي بروتينات توجد في الفسحة المحيطة Periplasmic silver – specific binding proteins (SiIE) اضافة الى مضخات مساعدة لها علاقة بتحليل ATP (P- type ATPase) وهي SiIP واخرى معتمدة على جهد الغشاء الكهربائي التي تقايض ايون الفضة مع البروتون مثل (SiL CPA) الفطريات والخمائر يمكن ان تستعمل آليات الطرد للتخلص من المواد الضارة ، وفي الخمائر على وجه الخصوص توجد مضخات للتخلص من الحوامض العضوية التي تستعمل كمواد حافظة وهذه المضخات تستحث بالمواد الحافظة .

● **الآلية الاخرى** والتي يعتقد انها اهم الآليات هي تكوين الاغشية الحيوية ، وقد مر انفا ان اكثر المقاومات تظهر في الاغشية الخلوية سواء للمضادات الحيوية او المواد القاتلة الاخرى وذلك لان الاغشية الحيوية تساعد في :

- تقليل وصول المواد الى الخلايا الموجودة ضمنها .
- التداخل والتفاعل بين المواد القاتلة ومواد الاغشية الحيوية .
- تحويل البيئة الموضعية التي تؤدي الى قلة المواد الغذائية والاكسجين وتصبح الخلايا في حالة صوم والتي تكون عادة مرافقة لزيادة المقاومة للعوامل الخارجية .
- إنتاج انزيمات مفككة للمواد داخل الاغشية الحيوية وتكون فعالة جدا عندما تكون التراكيز واطئة جدا وهو ما يحصل داخل الاغشية الحيوية اذ لا يمكن ان تزداد تراكيز المواد القاتلة .
- اجراء عمليات تبادل وراثي بين الاحياء داخل الاغشية مما يساعد في اكتساب الاحياء الحساسة لعناصر المقاومة من الاحياء الاخرى .
- حصول ظاهرة تحسس الزحام التي تؤدي الى تغير نمط الفعاليات الحيوية وربما تقليل مستوياتها وتكون اقل عرضة لتأثير الماد القاتلة .
- إمكانية حصول الطفرات والتكيف وزيادة نسبة الخلايا المثابرة داخل الاغشية الحيوية اضافة الى ذلك فانه في الاغشية الحيوية تكون مجتمعات متباينة أي تحوي العديد من الاحياء مثل البكتريا والخمائر والابتدائيات وغيرها ويمكن ان يوفر هذا التباين بعض الحماية للاحياء المستهدفة . اما الطحالب فهي تكون الحصىرة التي تكون مكافئة للاغشية الحيوية لذلك تحتاج الى تراكيز عالية من المواد القاتلة وبشكل مستمر لمنع التلوث بها .

● تثبيط المضادات ، فالبنسيلينات فقدت فعاليتها في عدد كبير من الاحياء نتيجة لانتاج الخلايا لإنزيمات β - lactamases الذي يحلل أصرة β - lactam ويفقد المضاد تأثيره ، وتحوي الاحياء العديد من هذه الانزيمات ، كما ان السلالة الواحدة قد تحوي على اشكال مختلفة من هذه الانزيمات . وتنتج الاحياء انزيمات اخرى لتفكيك المضادات الحيوية .

إضافة الى ان المواد القاتلة يمكن ان تثبط دون الحاجة الى الانزيمات فمثلا ايونات ألزئبيك تثبط في حالة وجود مركبات الثايول مثل Thioglycolic acid .

● حث التمايز ولعل من أهمها تكوين الابواغ لتصبح الخلايا مقاومة وتحافظ على نوعها وتثبت عند ملائمة الظروف ، فكما مر ذكره انه في المراحل الاخيرة من تكوين البوغ يصبح اقل حساسية للمواد القاتلة وهذه يعود جزءا منها الى تكون الأغلفة والقشرة وغيرها التي تقلل من نضوحية المواد ، إضافة الى ذلك فان الابواغ تحوي على البروتينات التي تكون مسئولة عن الحساسية ومنها بروتينات حامضية صغيرة ذائبة Small acid – soluble proteins (SASPs) توجد في لب البوغ وهي على نوعين :

● α , β - type وهي بروتينات ترتبط بـ DNA وتخلق في الساعة الثالثة من عملية التبوغ (ملاحظة شكل 47) .

● γ - type وهي تخلق ايضا في الفترة نفسها ولكن لا ترتبط بأي من الجزيئات الكبيرة المكونة للخلية .

ولذلك تكون الطفرات التي تنقصها هذه البروتينات α - β حساسة للعوامل التي تؤثر على الابواغ مثل بيروكسيد الهيدروجين والالديهيدرات وهذا يشير الى ان هذه البروتينات وتشبع DNA بها يؤدي الى الحماية من مهاجمة جذور الهيدروكسيل .

وفي الدقائق الاولى من الإنبات وعند بدء فعاليات انزيمات البوغ بالعمل يقوم الانزيم GPR (Germination endoprotease) بتفكيك البروتينات الحامضية ويصبح البوغ حساسا للعوامل الخارجية ، كما ان لب البوغ يبدأ بامتصاص الماء في هذه المرحلة وتزداد في المراحل التي بعدها ويمكن ان تشارك في حساسية البوغ للمواد القاتلة التي كانت قليلة ربما بشكل جزئي في حالة الجفاف التي كان فيها البوغ .

وفي الابتدائيات وعند تعرضها للظروف القاسية تكون الأكياس والتركيب المؤثر في هذه الحالة السليلوز في غلاف الكيس لأنه يكون بمثابة حاجز فيزيائي تجاه حساسيتها وتأثرها بالمواد وهي لا تعود الى كون الاحياء المتكيسة في حالة سبات من الناحية الايضية .

وفي الخمائر التي تكون ثنائية الشكل مثل *C. albicans* فان الاشكال الخيطية التي تتكون في المراحل المبكرة لتكوين الاغشية الحيوية في هذه الخميرة تكون أكثر تأثراً بالمواد القاتلة مثل CHX وبعد اكتمال تكون الاغشية الحيوية تصبح مقاومة .

مما سبق ذكره يلاحظ وجود اختلافات كبيرة في حساسية الاحياء منها ما يشمل عملية الامتزاز وقبض المواد الى داخل الخلية وهذا ناتجاً من عدم التشابه في التركيب الكيماوي والخطوط العريضة لتركيب الطبقات الخارجية للخلايا التي تعد الاساس في تأثير المواد ما عدا المواد التي تؤثر على الطبقات نفسها مثل تأثير البنسيلينات في الجدار الخلوي للخلايا البكتيرية . اضافة الى وجود اختلافات ربما تكون بسيطة ولكنها تؤثر وتنعكس على ألفة الموقع المستهدف ، اضافة الى الاختلاف في توفر كميات من مواقع الاهداف .

كما ان بعض الخلايا تحوي على بعض الحاميات لتراكيبها مثل وجود SASPs لحماية DNA من الضرر في البوغ ، وتشارك الاستجابة للاجهادات في إضفاء نوع من المقاومة كما هو الحال في وجود استجابة الاستغاثة SOS ، واستحداث مضخات دفع خارجي للمواد . ولكن مع هذه الاختلافات فان بعض الاحياء الميكروبية مثل الخمائر وبعض الفطريات لها شبه قريب مع اللبائن ويمكن ان تستعمل عند دراستها بدقة كوسائل لمعرفة الآليات العاملة ضد الأورام .

موت الخلايا

تموت الخلايا عند تعرضها للمواد القاتلة وفشل محاولتها لتجنب تأثيرها ، وكذلك تموت الخلايا تحت ظروف اخرى لا علاقة لها بوجود المواد القاتلة مثل الزحام او حدوث ضرر في موادها الوراثية لا يمكن اصلاحه ولا يمكن توريثه الى احياء جديدة . كما ان الخلايا حقيقية النواة تموت بشكل طبيعي بعد عدد محدد من الانقسامات التي تؤدي الى موت الخلايا قسراً او طواعية . وعملية الموت عملية معقدة وتشترك فيها عدة جينات وعوامل ولا يمكن ان تؤدي الى موت كل الخلايا وذلك للحفاظ على النوع .

موت الخلايا بدائية النواة : في اغلب الأحيان يكون موت الخلايا بدائية النواة والمتمثلة بالبكتريا عملية مرتبة ومبرمجة ضمن ظاهرة موت الخلايا المبرمج Programmed cell death والذي يشابه ظاهرة الاستماتة Apoptosis في الخلايا حقيقية النواة ، ويلعب الموت المبرمج دوراً مهماً على مستوى حياة الخلية الواحدة وعلى مستوى حياة المجموع ومنها :

- تحلل الخلية الام بعد عملية التبوغ .
- تحلل الخلايا الخضرية عند تكوين الأجسام الثمرية في Myxobacteria اطلاق DNA في المكورات المسبحية التي تتحلل ذاتياً وتستعمل موادها الوراثية للتحويل في بيئتها الطبيعية .

● تخليص المجتمعات من الخلايا المصابة وخاصة عند الإصابة بالعائيات للحد من انتشار الإصابة .

● إمكانية توفير المواد الغذائية للخلايا من موت خلايا أخرى عند حصول المجاعات .
ومن الملاحظ ان الموت المبرمج للخلايا البكتيرية ترافقه عملية التحلل الذاتي والتي تعني الهضم الذاتي للجدران الخلوية بواسطة Peptidoglycan hydrolases والتي يسمى بعضها المحللات الذاتية Autolysins ، ومن المعروف ان عمليات تفكيك البيبتيدوكلايكان تكون ضرورية اثناء بناء الجدران الخلوية وبذلك تكون بعض المحللات الذاتية وفعاليتها هي جزء من فعاليات النمو الطبيعي .
ومن الجدير بالذكر ان هناك انواعا من الموت تحصل للخلايا ولكن ليس بالضرورة ان تكون مرتبطة بالتحلل الذاتي .

ومن المعروف (وكما ذكر سابقا) فان الخلايا البكتيرية في الطبيعة تعيش وتموت في مجتمعات معقدة ولذلك فهي تشابه الاحياء متعددة الخلايا وضمن هذه المجتمعات تتغير فعاليتها الحيوية مثلا الاستجابة لافراز الفرمونات عند الزحام للتخفيف عن التعبير عن جينات ملائمة للحماية ، او عند وجود مركبات الاوكسجين الفعالة Reactive oxygen species (ROS) التي تحت تجمع خلايا *E. coli* وهذا التصرف يؤدي الى حماية الخلايا ، اضافة الى ان البكتيريا توجد ضمن نظام محاك بدقة وهي الاغشية الحيوية ، كل هذه الأوضاع يمكن ان تجعل الموت المبرمج للخلايا هو فائدة للمجتمع الذي توجد فيه . فمثلا عند تعرض الخلايا لعوامل تدمير مثل المواد السامة ، فان الخلايا ستعطي موادها الغذائية للخلايا المجاورة بدلا من سحب الاغذية من الخلايا الاخرى في محاولات لا جدوى منها في اصلاح نفسها اضافة الى ان الموت المبرمج للخلايا ذات DNA المتضرر سيؤدي الى خفض الطفرات الى معدلات واطنة .

ولكن وأمام هذه الفوائد للموت المبرمج فان المجموع لابد انه يحافظ على جزء صغير من الخلايا لغرض استمرار النوع . فمثلا عند انتشار مادة قاتلة للخلايا مثل المضادات الحيوية او غيرها فهي يمكن ان تقضي على كل الخلايا ان كان تركيزها عاليا ، ولكن هذا غير ما يمثلته الواقع اذ تظهر هناك خلايا مثابرة وهذه ليست طفرات وذلك :

1- انها تكون حساسة للمادة القاتلة للخلايا الطبيعية .

2 - الخلايا الناتجة منها تكون حساسة مثل الخلايا الطبيعية .

ولكن هذه الخلايا المثابرة يكون الموت المبرمج قد تعطل فيها وهي المسؤولة عن بقاء النوع البكتيري ، وتعد المثابرات ذات أهمية خاصة لصفة البقاء غير الطبيعية في الاغشية الحيوية ، ويكون معدل ظهور المثابرات في بكتيريا العنقوديات 10^{-6} - عند حضنها لمدة طويلة مع تراكيز قاتلة من المواد الكيميائية او المضادات الحيوية . لذلك فان وجود المثابرات تعني الاختيار بالنسبة للخلايا اما الموت او

الحياة بالنسبة للمجموع البكتيري ، وذلك لان معظم الخلايا تموت . وظاهرة وجود الخلايا المثابرة توجد في العديد من الانواع البكتيرية خاصة التي تتعرض الى عوامل قاتلة .

وفي الخلايا يتم تنظيم مسالة بقاء جزء من المجتمع حيا ، أي عملية ظهور الخلايا المثابرة وراثيا وفي *E. coli* توجد جينات تؤثر في نشو الخلايا المثابرة وهي *hip* (High persistence) والتغيير في هذا الموضع يمكن ان يؤدي الى معدل بقاء 1000 مرة مقارنة بالنمط الطبيعي ضد مجاعة الثايمين ، وتكون مقاومة لعدد من المضادات التي تستهدف بقاء DNA ومكائنه مثل DNA gyrase و DNA topoisomerase وكذلك تحمي الخلايا التي حصلت فيها طفرات في أنظمة إنتاج بروتينات الصدمة الحرارية Hsps من القتل بدرجات حرارية عالية .

ان الطفرات التي تحصل في المواقع *hip* يمكن ان تزيد من اعداد المثابرات 100 % في حالة مقاومة الحرارة وهذا يشير الى ان هذه الخلايا هي ليست خلايا سابتة ولا تمثل مرحلة ركود للخلايا اثناء دورة الخلية . ان معدل وجود الخلايا المثابرة يعتمد على وجود مستوى معين لعدد من الجزيئات المنظمة ، وتشترك ظاهرة الموت المبرمج مع مسارات خلوية اخرى مثل مسارات اصلاح DNA وكذلك مسارات تخليق بروتينات الصدمة الحرارية التي يمكن ان تغلق مسار الموت المبرمج . ومن الجدير بالذكر ان الجينات المسؤولة عن الموت المبرمج تجمع عادة في اوبرون واحد يشكل برنامجا ملائما لتحديد مصير الخلية . فمثلا في البكتريا *St. pneumoniae* فان الجين المسؤول عن تحلل الخلايا *lytA* يقع في الاوبرون الذي يضم *recA* المسؤول عن عملية التأشب المتجانس مع DNA القادم الى الخلايا ، وكل من *lytA* و *recA* يتم حثهم بتحسس الزحام الذي يؤدي الى تجمع الفرمونات البيبتيدية عند ارتفاع كثافة الخلايا .

ان المجموع البكتيري يعاني من موت اعداد كبيرة ليس فقط عند التعرض لظروف خارجية ، ولكن يمكن ان يستحث الموت المبرمج عند وصول المزروع الى طور الاستقرار ودخول طور الموت ، وفي *E. coli* يبقى حوالي 1 % من الخلايا حيا ويمكن ان تبقى لعدة ايام ، والخلايا في هذه المرحلة يحصل لها تحول كامل وتظهر فيها طفرات سريعة النمو في الايام 4 – 5 ايام بعد الدخول الى طور الاستقرار واستمرار حضانها يؤدي الى تجمع الطفرات فيها وتسمى هذه الطفرات مغتمة الفرص (GASP) Growth advantage stationary phase mutants ، اذ تحصل طفرات ترافقها تغيرات كبيرة مثل نقصان فعالية وكمية الكاتيليز الذي استحث في طور الاستقرار ، وغياب الانزيم يؤدي الى ظهور Mutators (المارة الذكر) مما يؤدي الى زيادة الطفرات الإضافية وطغيان هذه الطفرات سريعة النمو يؤدي الى موت المجموع وهي طفرات أنانية Egoists وهي من المخاطر على المجموع البكتيري الذي يعاني افراده من الموت المبرمج تحت الظروف القاسية وكي يتغلب المجموع البكتيري على مثل هذه الطفرات الأنانية يجري عمليات الإصلاح ويقلل من معدل حدوثها ،

اضافة الى ان مثل هذه الطفرات السريعة النمو والتي يمكن ان تتغلب وتطغى سوف تكون حاوية على مسارات موت نشطة ولذلك تكون معرضة للقتل . والحقيقة ان هذه الطفرات هي التي تشكل الخطر على المجتمع البكتيري وليس الجوع والتنافس ، ان المجاميع البكتيرية تتصرف بشكل جماعي للتخلص من الخلايا الطافرة ويلغي نشوئها في المجموع البكتيري ، او يؤخره على الاقل . والحصيلة ان الخلايا في طور الاستقرار تصبح متحملة للعديد من العوامل القاتلة من المضادات الحيوية وغيرها من المواد والذي يمكن ان يحاكي وضعها في البيئة عند وجودها مع احياء منتجة للمضادات الحيوية او غيرها من المواد .

وتقوم المجتمعات البكتيرية بعمليات تنظيم اخرى معتمدة على تعداد الخلايا في الوحدة الحجمية ، فعندما يصبح تعداد الخلايا عاليا بحيث يشكل خطرا على المجموع وربما غزوها من قبل الطفرات الأتانية المذكورة اعلاه فإنها تفعل آلية تحسس الزحام لتؤدي الى تحلل الخلايا وهذه الآلية تمنع عملية الانتحار (Suicide) في الخلايا ، فمثلا عند وصول تعداد الخلايا الى 10^8 يحصل فيها اختزال عددي بالتحلل الذاتي ولكن بمعدل طفرات واطئ جدا 10^{-7} / خلية / جيل وذلك بتنشيط Proofreading DNA repair وهذا يعني ان المجموع البكتيري يدخل طور الاستقرار وهو يكاد يخلو من الطفرات مغتتمة الفرص ، كما ان عملية التحلل الكبير يساعد في تبادل DNA الذي يكون بمثابة وظيفة ثانوية لعملية التحلل الذاتي ويؤدي الى بناء حاجز أمام حدوث عمليات الانتحار .

الجينات القاتلة الخاصة

وتشارك بعض الجينات في موت الخلايا نتيجة لوجود بعض البلازميدات التي تحمل جينات خاصة لانتاج السموم واخرى مضادة للسم وذلك كآلية للحفاظ على البلازميد واهم الأمثلة عليها وجود البلازميد F في *E. coli* . فالبلازميد يحوي على جين *ccd B* الذي يؤدي الى موت الخلايا بتأثيره على الانزيم DNA gyrase اما الجين *ccdA* الواقع في الاوبرون نفسه فهو يشفر لمضاد السم . والبروتين *ccdA* يتحلل بالبروتيز *lon* ولذلك فالخلايا البنوية اذا لم تستلم نسخة متكاملة من البلازميد فان الخلايا ستقتل بتأثير السم *ccdB* . وتوجد جينات مشابهة على كروموسوم الخلية . كما ان بعض العاثيات الأولية يمكن ان تقود الخلايا الى الانتحار ، اذ ان العاثي الاولي الموجود في الكروموسوم يمكن ان يعبر عن الجينات السامة لقتل الخلايا عند دخول عاثي اخر الى الخلية ، اي انها تمثل عملية تنافس للجزيئات DNA المتطفل مستخدمين الخلية المضيفة ساحة للتنافس .

اما الموت المبرمج في الاركيا فلا يعرف عنه الا القليل ، وتشير الدراسات الى وجود انواع من الجينات الخاصة Toxin – antitoxin العاملة في مسار الانتحار .

موت الخلايا حقيقية النواة

تموت الخلايا حقيقية النواة في الاحياء الراقية مثل الحيوانات او الاحياء المجهرية حقيقية النواة وذلك لأغراض منها :

• التخلص من الخلايا في اثناء عمليات التطور .

• التخلص من الخلايا المعطوبة .

ويحصل موت الخلايا ضمن ظاهرة الاستماتة ، ومن العوامل المؤدية للاستماتة

☀ تحول الخلايا السرطاني .

☀ الإصابات الميكروبية .

☀ وجود العوامل المميتة مثل الحرارة ، المطفرات ، المؤكسدات ، السموم الكيماوية وغيرها .

وحدوث ضرر للخلايا يتم التحسس به بواسطة مستلمات تؤدي الى تنشيط مسارات نقل اشارات

الاستماتة التي تلتقي عند Caspase proteases .

والاستماتة هي موت الخلية المبرمج اذ تقوم الخلايا بتدمير نفسها وهي غير عملية النخر

Necrosis التي تتضمن قتل الخلايا من الخارج بفعل المواد الكيماوية او السموم وتؤدي الى انفجار

الخلايا مطلقة مكوناتها الى الخارج . اما الخلايا المستميتة فتتكشف ويتم ابتلاعها من قبل الخلايا

الابتلاعية Phagocytes ، وعند ترحيل موادها النووية على الهلام يظهر سلم الاجسام النووية

Nucleosomal ladder نظرا لتحطم DNA الى قطع صغيرة .

تنظم الاستماتة بإشارات وجينات معينة والطفرات في هذه الجينات تكون مهمة في اظهار

الامراض ، وفي الخلايا الحيوانية يعمل الجين *bcl-2* في غلق مسار الاستماتة ، ولذلك فان بعض

الخلايا السرطانية تنتج كميات كبيرة منه وتصبح مقاومة لاشارات الجسم التي تحفز موت الخلايا . اما

الجين *bax* فهو يعد من محفزات الاستماتة الفعالة ، ولذلك يعد جين مثبطا للاورام وعند حصول

طفرات فيه ينمو الورم لان مسار الاستماتة يكون قد توقف ، واحد اساليب معالجة السرطانات هو جعل

الخلايا قادرة على تدمير نفسها مرة ثانية .

الموت المبرمج في الخمائر : هناك تشابه في الموت المبرمج في خلايا الاحياء المجهرية حقيقية النواة

وحيدات الخلايا وحالة الاستماتة في الاحياء متعددة الخلايا . تموت خميرة *S. cerevisiae* عند

تعرضها لجرع مميتة من بيروكسيد الهيدروجين بشكل مشابه للخلايا في الاحياء متعددة الخلايا والتي

تشمل :

☀ تكاثف الكروماتين عند الاغشية الخلوية .

☀ زيادة نضوحية الاغشية الخلوية .

☀ تجزؤ DNA .

وعند معالجة خلايا الخميرة بمركب Cyclohexidine الذي يمنع تخليق البروتينات يؤدي الى حماية الخلايا من تاثير البيروكسيد المميت ويمنع ظهور صفات الاستماتة وهو مشابه لتاثير الكلورومفينيكول في البكتريا اذ ان منع تخليق البروتين يؤدي الى حماية الخلايا من تاثير البنسيلين . ويعتقد انه في خلايا الخميرة تستخدم استماتة التضحية Altruistic apoptosis الذي يؤدي الى التخلص من الخلايا المتضررة والتي عند استمرارها ستكون في حالة تنافس مع الخلايا السليمة على المواد الغذائية .

وتختلف خلايا الخمائر عن الخلايا الحيوانية بعدم احتوائها على بروتينات خاصة بالاستماتة ففي الخلايا الحيوانية توجد بروتينات قبل الاستماتة Proapoptotic proteins مثل Ced-4 , Bak التي تسبب موت الخلايا فانها تؤدي الى ظهور الصفات الشكلية للاستماتة عند التعبير عنها في الخمائر ، كما ان موت الخميرة *S. cerevisiae* ببيروكسيد الهيدروجين يمكن إحباطه بالبروتين Bcl-2 من الانسان ، اذ ان Bcl-2 يثبط مركبات الأوكسجين الفعالة ROS والمركبات الاخيرة تعد من المواد الحاثية والمحفزة للمركبات الوسطية التي تعطي الاشارات العاملة في مسار الاستماتة في الاحياء متعددة الخلايا ويمكن ان تلعب دورا مشابها في خلايا الخمائر . والخمائر طورت آليات إيجاد الخلايا المثابرة وكذلك آليات لجعل معدل الطفرات المغتمة الفرص التي تجعل مجموع خلايا الخميرة تحت الخطر في حدود واطئة جدا .

ومن جهة ثانية فان حدوث الطفرات في الخميرة *S. cerevisiae* يؤدي الى حدوث ضرر في عملية الفسفرة التاكسدية الخاصة بانتاج الطاقة في الماييتوكوندرية وتكون بمعدل 1 % من الخلايا النامية على السكريات ، وهذه الطفرات تكون مميتة للخلايا ، في حين ان الطفرات في كروموسومات الخلايا يكون مستواها اوطأ وتعد عملية الموت المبرمج للخمائر وسيلة فعالة للتخلص من الخلايا الهرمة ، اذ ان الخلايا بعد حصول عملية التبرعم من 24 – 31 مرة تصبح غير قادرة على التكاثر وهو ما يعرف بمحدودية هايفلك Hayflic limit . والجينات المسؤولة عن اطلاق مظاهر الشيخوخة قد تؤدي الى زيادة او نقصان الانقسامات ، ولكن هذه تعتمد على ان خلايا الخمائر تكون مزودة ببرنامج للموت من خلال وجود ساعة جزيئية حيوية تسيطر على تجمع عوامل الشيخوخة التي تسود في الخلايا القديمة ولذلك تتعرض الخلايا القديمة لعملية الموت المبرمج كي يتم منع ظهور الطفرات الانانية او مغتمة الفرص التي تكون خطرة على مجتمع الخلايا . وربما يكون موت الخلايا الهرمة ناتجا من تجمع الأخطاء فيها .

الآبتدائيات : وهي الاخرى تسعى للتخلص من الخلايا غير الصالحة فمثلا في *Tetrahymena* يتم التخلص من الخلايا القديمة بشكل مشابه لعملية الاستماتة في الخلايا الحيوانية ، اذ يحدث تكثف وتجزء DNA وقد وجد ان انزيم الكوثر RNAP يلعب دورا مهما في الموت المبرمج للخلايا .

ومن العودة الى علاقة الاحياء مع بعضها والتي يفترض ان البكتريا هي أجداد للمايكوبكتيريا الموجودة في حقيقيات النواة ولكن يلاحظ في الوقت الحاضر وجود اختلافات جوهرية بين البكتريا والمايكوبكتيريا ربما كانت ناتجة عن طول الإقامة في الخلايا حقيقية النواة والذي نتج عنه اختلافات في مسارات عديدة ومنها الاستماتة في حقيقية النواة والموت المبرمج في البكتريا . ففي المايكوبكتيريا تقوم ROS بتنشيط وفتح قنوات ناضحة في الأغشية وتكون بشكل مؤقت Permeability transition pores (PTP) في الغشاء الداخلي للمايكوبكتيريا التي تؤدي الى انتفاخها وانفجارها وإطلاق محتوياتها الى السايوبلازم ومنها الانزيمات الداخلية لها ، وبعض الانزيمات المنطلقة تحفز الانزيمات الهاضمة Procaspases والتي تحفز العامل Aif-1 الذي يذهب مباشرة الى النواة ويحفز عملية تجزئة DNA . اما البروتينات المضادة للاستماتة Anti-apoptotic مثل Bax و Proapoptotic مثل Bcl-2 وهي بروتينات مايكوبكتيرية فانها تحور بفعالية PTP وعند انطلاق بروتينات الاستماتة تدمر المايكوبكتيريا ومثل هذا غير موجود في البكتريا التي تمتلك عدة قنوات دائمة في أغشيتها والتي تساهم عند حصول تغيير في الضغط التناظفي ، اذ تفتح وتخرج المواد الذائبة وتريح الخلايا من الضغط التناظفي .

ولذلك يعتقد ان القنوات الموجودة في أغشية البكتريا لها دور في عملية الموت المبرمج ، وعند البحث في مكتبات الجينومات Genome libraries وجد ان العديد من بروتينات الاستماتة في الخلايا حقيقية النواة مشابه لما موجود في بدائية النواة ، ولكن دون وجود معلومات وظيفية تجريبية لا يمكن الجزم بمشاركة بروتينات الاستماتة هذه في الموت المبرمج في البكتريا .

ومما تقدم يظهر ان دراسة الموت المبرمج للخلايا تحفز إعادة النظر في العديد من الامور المتعلقة بحياة البكتريا مثل آلية القتل بالمضادات ومعدل الطفرات والموت والبقاء عند طور الاستقرار وطبيعة الخلايا المثابرة وضرورتها للحفاظ على النوع وكذلك طبيعة الحياة في الأغشية الحيوية .

كما ان معرفة آليات نقل إشارات الموت تكون وسيلة مشجعة لتطوير أدوية تنشط مسارات الموت المبرمج والتخلص من الممرضات بالمضادات الحيوية خاصة في الخلايا بطيئة النمو والخلايا في الأغشية الحيوية التي تجعل الخلايا متحملة وتولد المثابرات وتجعل الاصابات بها لا تستجيب للمعالجة بالمضادات الميكروبية التي هي قيد الاستعمال . وهذه المشاكل تشكل تحديا لعمليات التقنية الحيوية ومحركها الأساسي وهو الهندسة الوراثية في المستقبل .

ايض الإجهاد Stress metabolism

الصفحة	الموضوع
198	الإجهاد
202	استجابة الخلايا للاجهادات
203	شبكة العمل في الاستجابة للإجهاد
204	مراحل الاستجابة للإجهاد
204	استلام الإشارات
206	مظاهر الاستجابة للاجهادات
208	الوصيفات Chaperones
220	التنفيذيات Osmolytes
223	تأثير الاجهادات على فسلفة الخلايا وتنظيمها
229	تأثير الإجهاد على نقل البلازميدات الاقترانية
230	تلاشي الحواجز الوراثية تحت ظروف الإجهاد
231	دراسة لبعض أنواع الاجهادات
231	الاستجابة لإجهاد المجاعة
233	الإجهاد التاكسدي
246	تداخل إجهاد الأكسدة مع اجهادات أخرى
247	الدفاعات في الخمائر وحقيقيات النواة ضد اجهاد الاكسدة
249	الاركية والاستجابة للاجهادات
250	الاجهاد الحراري
252	اجهاد الاشعاع
254	الاجهادات في الخمائر
255	الوصيفات وبروتينات الصدمة الحرارية
260	مسارات نقل الإشارات في الخمائر
261	استجابة الخمائر للضغط التنافذي
267	مسارات أخرى للـ MAPK
273	تأثير الاجهادات الاخرى على الخمائر
273	الحرارة
275	إجهاد المواد المطفرة
275	إجهاد المعادن الثقيلة
276	تأثير الاجهادات في الخمائر المنشطرة
280	الاجهادات في خلايا حقيقيات النواة
	الراقية
285	التوجهات المستقبلية لدراسة الاجهادات المختلفة

ايض الاجهاد Stress metabolism

لا يمكن للحياء ان تعيش وهي بهذا الكم الهائل من الأعداد تحت ظروف ملائمة لكل منها ، فالبيئة تتنوع والاحياء منتشرة في كل انواع البيئات وهذا يعني انها تعيش تحت الاجهادات والكروب ، وعيشها في مثل هذه الظروف يعني انها تطبعت وتأقلمت لهذه الظروف و عليه يمكن تعريف الاجهاد او الكرب بالاتي :

الاجهاد Stress

هو أي انحراف عن الظروف المثلى التي تؤدي الى تقليل معدل نمو الاحياء . وتقسم الاحياء من حيث تجاوبها مع الاجهادات الى Eury- tolerant أي واسعة التحمل سواء لجرع الاجهاد الواحد او انواع الاجهادات التي تسلط عليها ، والمجموعة الثانية Steno- tolerant وهي ضيقة التحمل بالنسبة للجرع او نوع الاجهادات التي تواجهها . واثناء عمليات التطور اختلفت الاحياء فيما بينها وحصل انفراج بينها من الناحية التركيبية والوظيفية ، مثلما ذكر سابقا ، ووجدت احياء بدائية النواة واخرى حقيقية النواة وتغيرت تبعا لذلك العديد من الاجهزة والوظائف مثلا نظام استلام الاشارات في البكتريا البدائية مكون من تركيب ثنائي المكونات Tow – component system في حين اصبح مكونا من ثلاثة اجزاء في الاحياء الأكثر رقيا ، وفي الأخيرة تشعب وتميز بشكل كبير صعودا الى الإنسان اذ تشكل جينات الاستجابة للاجهادات حوالي 18 % ، والباقي متعلقة بالوظائف الأصلية وان كانت لها مشاركة في الاستجابة للاجهادات .

وبما ان الاحياء مرت بحالات تطور منذ القدم لذلك يختلف مكنونها البروتيني في حالة الاجهاد Stress proteome اعتمادا على البيئات التي شغلها ، فالاحياء واسعة التحمل (Eury) تمثل الاحياء القديمة وهي التي لها حدود واسعة وعالية من التحمل تجاه التغيرات البيئية . في حين ان الاحياء ضيقة التحمل (Steno) هي التي شغلت البيئات الثابتة نوعا ما والتي تكون قابليتها قد نشأت من حدوث الطفرات او تطبعت جيناتها للعمل تحت ظروف معينة ، وهذا يعني انها تعرضت لعمليات انتخاب طبيعي قللت من استجابتها للاجهادات المختلفة ، وأحسن مثال هو فقدان Hsp70 (بروتين الصدمة الحرارية) من بعض انواع الاركيا . كما انه في الوقت نفسه فان الاحتمالات حول نشوء جينات جديدة تكون قد وجدت للاستجابة لظروف الاجهاد مما ادى الى تشجيع التخصص وتحسين ترتيب الجينومات ، ومثل هذه العمليات ربما زودت الاحياء ذات التحمل الضيق بميزات مثل زيادة ملائمتها للبيئات الثابتة وزادت من قابليتها على التنافس . فمثلا في الفقريات وخاصة اللبائن فان عددا كبيرا من جينات الاستجابة عملت في نقل الاشارات التي لها علاقة بالاستجابة المناعية لتعطي الاسس البروتينية الضرورية للطبيعة المعقدة للجهاز المناعي عندما اصبحت خلاياها في بيئات مستقرة وثابتة نوعا ما .

ان الاجهاد المسلط على الخلايا والذي يعرف على انه تهديد مدمر للجزيئات الحيوية الكبيرة ، يكون جوهر الاستجابة له هو حماية الخلايا وبالأخص جزيئاتها الحيوية الكبيرة . ففي المراحل الاولى من التعرض لاي اجهاد او ظروف بيئية غير ملائمة فانه يؤدي الى اضطراب التوازن الخلوي ، ولذلك تكون الاستجابات بشكل رئيس لحماية وسلامة DNA ثم البروتينات ثم الجزيئات الاخرى التي تليها بالأهمية ، ويمكن تقسيم الاجهادات على ضوء هذه (بالنسبة للاحياء الراقية)

- اجهادات أساسية ومنها الاجهاد التاكسدي ، وقلة الأوكسجين و Ischemia (الاسكيمية وهي فقر دم موضعي نتيجة عدم تدفق الدم في الشرايين) .
- اجهادات ثانوية مثل الاجهاد الحراري واجهاد المعادن الثقيلة واجهاد الاشعاع المؤين وغيرها . ومعظم هذه العوامل تؤدي الى اضرار في DNA في كل الاحياء لذا لابد من ان الاستجابة توجه لحماية DNA ثم البروتينات ثم الدهون في الاغشية ثم حمضية جزيئات RNA المختلفة . وتؤدي الاستجابة الخلوية الى التطبع لزيادة ثباتية الجزيئات الى حدها الأعلى في الحماية والقيام بعمليات الاصلاح في حالة حدوث الضرر . وكل هذه تكون عابرة ولكن ثمنها يكون قلة قابلية الخلايا على أداء وظائفها الطبيعية وما يتبعها من انخفاض معدلات النمو وغيرها من التأثيرات ، وذلك لاستنزاف الطاقة الايضية وتقليل المرونة التوزيعية Conformational flexibility للجزيئات لان قلة المرونة هذه تؤدي الى إبطاء معدلات التفاعلات الإنزيمية خاصة عندما تكون في المواقع الفعالة ، كما انها تحد من تفاعلات جزيئات اخرى غير الإنزيمات .

وبعد التطور أصبح مكون الاجهاد ألبروتيني مهما ليس لأداء الحماية للخلايا وإبقائها حية في حالة صحية جدا وانما يعمل في الوظائف العادية للخلايا ، فمثلا بروتينات الصدمة الحرارية مثل Hsp70 يعمل في نضج البروتينات في الشبكة الاندوبلازمية في الخلايا حقيقية النواة وكذلك يفعل في الاحياء بدائية النواة . ومن الامثلة الاخرى مكونات نظام الاصلاح MMR التي تشارك في تصحيح انواع مختلفة من الضرر الذي يصيب DNA اضافة الى مشاركتها في فعاليات التصحيح Proofreading اثناء عمليات تضاعف DNA الطبيعية .

ان الآليات الجزيئية لعمل الاجهادات وتدميرها للـ DNA والبروتينات تحدث تحت العديد من الاجهادات مثل وجود المعادن الثقيلة ، الأشعة المؤينة ، وجود المواد السامة للجينات Chemical genotoxic ، والاجهاد التنافذي والميكانيكي وغيره ويتوسط في اغلبها الجذور الحرة وتغير حالة الأكسدة والاختزال داخل الخلية . ولذلك فالاجزاء المهمة لآليات تحسس الاجهادات العامة يمكن ان تشمل :

- تحسس التدمير الحاصل للجزيئات الحيوية المهمة .
- تسجيل حالة الأكسدة والاختزال داخل الخلية والتي تعد دليلا واضحا على تعرض الاحياء للاجهاد

ومن الضروري فهم الاجهادات البيئية التي تؤدي الى حث مجموعة من الاستجابات التطبيعية الثانوية اضافة الى حث استجابة الإجهادات الخلوية الثابتة ، وتختلف الاستجابة الطبيعية عن الاستجابة للاجهاد الخلوية ببعض الجوانب :

- تكون بطيئة نوعا ما في بدئها .
 - توجه لاستعادة التوازن الخلوي الذي اضطرب نتيجة تأثير انواع خاصة من الاجهادات البيئية .
- ويحدث التوازن الخلوي التطبيعي عمليا عندما تتعرض الخلايا السليمة وتبقى حية (أي في بداية التعرض) وقبل بدء استجابة الاجهاد الخلوي .

ثبات الاستجابة الخلوية

تعد استجابات الاجهاد الخلوية من الآليات المهمة في عدد من مجالات الطب وعلوم الحياة ولذلك درست بشكل كبير وكشف عن الآليات الجزيئية التي تقوم بها الخلايا تجاه الاجهاد وهي كثيرة جدا ويمكن تلخيص هذه الاستنتاجات ببعض النقاط :

- ان استجابات الاجهاد الخلوية هي تفاعلات تجاه تغيرات او تقلبات في المؤشرات خارج الخلايا والتي تؤدي الى ضرر في تركيب ووظيفة مكونات الخلية .
- تشارك مجموعة من البروتينات الثابتة في التفاعلات وهي جزء من مكون الاجهاد البروتيني ، وهي متشابهة في معظم الاحياء ولكن بعضها يعتمد على نوع الاجهاد .
- استجابات الخلايا لعدد من الاجهادات تكون متآزرة وبذا فان تعرض الخلايا لاحد انواع الاجهاد يؤدي الى حث استجابة عابرة او مؤقتة لأشكال اخرى من الاجهاد أي حصول تحمل متداخل Cross – tolerance .

- حصول الاستجابات السريعة او المؤقتة يكون ضروريا لغرض تسهيل عمليات تكيف اخرى متخصصة باجهاد معين ، وتستهدف الاستجابات السريعة اعادة التوازن الخلوي .

- الخلايا تستجيب لكل انواع الاجهادات بتحفيز حوالي 4 من الآليات الأساسية التي تستهدف تثبيت تركيب الجزيئات الحيوية المهمة ووظيفتها اثناء الظروف غير الطبيعية بالنسبة للخلايا ، وتحافظ في الوقت نفسه على الطاقة الايضية لغرض الوصول الى التوازن الخلوي .

وهذه الآليات تعد حجر الزاوية لاستجابة الخلايا للاجهادات وتشمل الآليات :

- التحكم بنقاط السيطرة Check points في الخلايا والتي تؤدي الى إيقاف نمو الخلايا ومنها نقطة سيطرة G1 وطور التخليق S (G1/S) وكذلك نقطة السيطرة الواقعة بين المرحلة G2 وطور الانقسام M (G2/M) .
- السيطرة على الترجمة .

■ حث الوصيفات الجزئية مثل بروتينات الصدمة الحرارية Hsps وغيرها وهذه تنشط عادة في اللبائن بواسطة الحث أو إجراء التحويلات بعد عمليات الترجمة مثل عملية فسفرة البروتين Hsp28 عن طريق p38 MPAK وهو مسار نقل للإشارات .

■ تحفيز آليات تثبت الحوامض النووية والكروماتين وإجراء عمليات التصحيح ، فمثلا في الخلايا حقيقية النواة يحصل تصحيح وتثبيت للكروماتين باستعمال مسار p53 الذي يحفز عند وجود ضرر في الحوامض النووية إضافة الى وجود مسالك أخرى .

■ إزالة بقايا الأجزاء المتضررة من الجزيئات الحيوية التي نتجت من تأثير العوامل المجهدة باستعمال مسار التدمير Ubiquitin / proteasome pathway .

والآليات المذكورة تتداخل وتعمل ضمن شبكة هدفها النهائي المحافظة على الخلايا وسلامتها تحت ظروف الاجهاد ، وهذا بطبيعة الحال لا يمكن ان يتم الا على حساب وظائف الخلايا الطبيعية وهذا يوضح حصول الاضطراب أثناء الاستجابة العابرة الانتقالية الى ان تستعيد الخلايا توازنها بالنسبة للمؤشرات التي اضطربت وتعود الى أداء وظائف مستقرة قد تكون مغايرة لما هو الحال عند عدم وجود عوامل الاجهاد . فمثلا حصول تطرف في الضغط التناظري Hypertonic stress فان هذا يؤدي الى عدم ثباتية البروتين و DNA ويؤدي في الوقت نفسه الى حث الاستجابة في الخلية والتي تشمل التحكم بنقاط السيطرة في دورة الخلية مما يؤدي الى ايقاف النمو ، زيادة المكونات العاملة في تصحيح DNA ، حث مسار التدمير ، حث تخليق الوصيفات الجزيئية . إضافة الى محاولات السيطرة على التوازن الخلوي باستجابة ثانوية بطيئة وتستمر الى ان تتغير الظروف وهي تنشط عدد من أنظمة النقل في الأغشية الخلوية وبعض الانزيمات لتجميع المذابات العضوية المتوافقة ، وفي حالة عدم جدوى الوسائل التي اتخذتها الخلية في الاستجابة تقود الخلايا الى الموت المبرمج .

ففي الاحياء متعددة الخلايا حقيقية النواة فان الموت المبرمج والاستماتة يمثلان نوعا من انواع الاستجابة للاجهادات والتي تحدث عندما يكون هناك ضررا كبيرا وعجزا في المحافظة على سلامة جينوم الخلايا . ولذلك فان هذه الآلية (الاستماتة) تجنب الكائن عدم ثباتية المكونات الوراثية وحدوث الاورام . والخلايا في هذه الحالة لابد من ان يكون لديها وسائل لتسجيل مدى شدة الاجهاد والضرر الذي يسببه . وأنظمة التسجيل يجب ان تكون جزءا أساسيا من الاستجابة للاجهادات الخلوية والتي قد تكون مكونة من بروتينات تعمل بشكل غير مستحث (Constitutive) في تصحيح DNA ومسارات تدمير البروتينات وكذاك تعمل في تنظيم حالات الأكسدة والاختزال في الخلية . وقد تم تحديد الجينات المسؤولة عن أنظمة التسجيل .

استجابة الخلايا للاجهادات

وهي تمثل تفاعل الخلايا تجاه الاجهادات او الاخطار التي تؤثر على جزيئاته الحيوية ، وتدميرها من الناحية الوراثية لذلك فإن الاستجابات تحمي الخلايا من التغيرات المفاجئة في الظروف او العوامل البيئية التي يمكن ان تتغير باستمرار . ويمكن ان تعرف على انها تفاعلات الخلايا لأي شكل من أشكال التدمير للجزيئات الحيوية الذي يزيد عن حد العتبة Threshold بغض النظر عن المسبب . والحقيقة ان كل الاحياء من البكتريا الى خلايا اللبائن تستجيب للمؤثرات الخارجية ثم تنتقل المؤثرات من سطوح الخلايا الى داخلها وفي النهاية تؤدي الى تغيير التعبير الجيني وفعاليات البروتينات .

قد تكون الاستجابة :

- o أصلية (Intrinsic) Constitutive وهذه تكون طبيعية ومعتمدة على مرحلة النمو في دورة الخلية او في نمو المجموع البكتري مثلا في طور الاستقرار ، ان هذه الاستجابة تكون دورية الحدوث في الخلية نظرا لتكرار مسبباتها .
- o استجابة مستحثة Inducible وهي التي تحدث عند تغيير الظروف المحيطة بالخلية وليست بالضرورة ان تحدث بتكرار معين .

انواع الاجهادات

هناك العديد من العوامل المحيطة بالخلايا او الموجودة داخل الخلايا التي يمكن ان يصيبها الانحراف وبالتالي الوصول الى حالة الاجهاد ومنها :

- ◆ التغير بدرجات الحرارة .
- ◆ التغير في الضغط التناظفي Osmotic pressure .
- ◆ التغير في الأرقام الهيدروجينية .
- ◆ وجود تراكيز عالية من المواد السامة او المعادن الثقيلة .
- ◆ نقص المواد الغذائية (المجاعة Starvation) .
- ◆ وجود المواد القاتلة مثل المضادات الحيوية والمواد الكيماوية .

وقد أطلق على هذه العوامل المجهادات Stressors ، وعند حصول تطرفا فيها تبدأ الخلايا بالاستجابة للاجهاد وتكون بمثابة زيادة لحدود التحمل للجزيئات الحيوية باستعمال مجموعة من الجينات الثابتة من ناحية التطور الوراثي التي تسلكها لاستعادة سلامة الخلايا تحت الظروف دون المثلى ، وتوالي عمل الجينات يكون محكوم بفاصل زمني ومصممة لاستعادة التوازن الخلوي .

أسباب دراسة تأثير الاجهادات

الحقيقة ان هناك أسباب كثيرة تدعو لدراسة هذه الظواهر ومنها :

♦ ان دراسة الاحياء ومنها الاحياء المجهرية لا يمكن ان تتم دائما تحت ظروف مثلى ، خاصة تلك التي يراد استعمالها في العمليات الإنتاجية ، اضافة الى ان بعض مواد ايض الاجهاد قد تكون هي المستهدفة من العملية الإنتاجية .

♦ تعد العوامل البيئية المجهددة هي الاساس في تطور الاحياء لذلك لابد من دراسة تأثير المجهدات للتوصل الى العلاقة التطورية للاحياء .

♦ توفر دراسة الاجهادات وسيلة مهمة لغرض التعامل مع الملوثات خاصة وان البيئة في تغير مستمر نتيجة فعاليات الانسان لذلك فان الدراسات تساعد في استعادة البيئة السليمة كما في معالجة التلوث الكيماوي او الإشعاعي .

♦ يمكن من دراسة تأثير الظروف المحيطة بالخلايا وتسجيل مؤشرات مثل نمط الحوامض الدهنية او تسجيل وجود البروتينات الوصيفة او الوصيفات Chaperones ان تستعمل كدلائل حيوية Bioindicators على تلوث البيئة عند عجز الوسائل الاخرى مثل الكيماوية عن كشفها .

♦ تكون دراستها مهمة للكشف عن بعض الأمراض التي تصيب الانسان كما سيأتي ذكره لاحقا

لذلك كان من الواجب تعلم وفهم اليات الاستجابة في الاحياء وكيفية ونوعية الاستجابة . وفي الغالب تكون الاستجابات ذات علاقة وثيقة بالتغيرات التي تحصل في الجزيئات المهمة مثل البروتينات و DNA والتي تكون حاضرة في الممالك الثلاثة للاحياء وهي الاركيا والبكتريا والخلايا حقيقية النواة . وقد اهتمت التوجهات الحديثة بهذه الاستجابات وتم وضع مخططات وقواعد معلوماتية (Databases) حول مكنون بروتينات الاجهاد Stress proteome وهي تمثل كل البروتينات المشتركة في العمليات عند التعرض للاجهاد ومنها البروتينات المشتركة في تمييز الاجهاد وتلك العاملة في الاستجابة اللاحقة والعاملة في الاصلاح والتي يمكن ان توجد في عمليات الحث والتغيرات التي تحصل لها بعد عمليات الترجمة ، وتداخل البروتينات مع بعضها او تداخل البروتينات مع DNA لتكون مرجعا للدراسات التي تجرى في هذا المجال .

شبكة العمل في الاستجابة للاجهاد

تعمل الخلية بشبكة محكمة من التفاعلات ضمن عملية الاستجابة وذلك يؤدي في الكثير من الاحيان الى تداخل مسارات الاستجابة لعوامل اجهاد مختلفة ، مثلاً الاستجابة لاجهاد معين يمكن ان يعمل بشكل متناسق مع عمليات اخرى مختلفة مثل التأثير على الحالة التغذوية والانقسام الخلوي والاختزالي في حقيقيات النواة او يؤثر على الاستجابة لاجهادات اخرى (كما سيأتي ذكره لاحقا) .

وعلى العموم يمكن وضع بعض الحقائق العامة :

❖ كل خلية تحوي على مسارات متعددة ، كل واحد منها يستجيب لإشارة معينة تقوم بنقلها كي تعطي الاستجابة الملائمة ، وان على الخلايا ان تمنع التواصل غير الملائم بين المسارات .

❖ الاشارات او مكوناتها يمكن ان تستعمل لاكثر من مسار في الخلية الواحدة لتعطي استجابات مختلفة وهذا يعني ان هناك تحويرا في فعالية عوامل الانتساخ ويكون ذلك بالارتباط ببروتينات مساعدة مختلفة .

❖ من الدراسة المقارنة للمسارات في الاحياء المختلفة ، لوحظ ان مسار الاستجابة لاجهاد معين يمكن ان يكون المسار نفسه عاملا في استجابة مختلفة في احياء اخرى ، وقد يكون هذا بسبب ان الاحياء يمكن ان تستعمل متحسسات Sensors مختلفة .

❖ في الاحياء المختلفة يمكن ان تستعمل ماكينة الاستجابة للإشارة نفسها ولكن مكونات الماكينة يمكن ان تستعمل بشكل مختلف .

❖ الاستجابات يمكن ان تحفز باشارات مختلفة ، وفي بعض الاحيان تكون عامة بالنسبة للخلايا حقيقية النواة خاصة الموجودة ضمن الاحياء متعددة الخلايا .

❖ تتم عمليات نقل الاشارات بتفاعلات الفسفرة بشكل رئيس في سلسلة من التفاعلات .

❖ هناك بعض المكونات الخاصة التي تشترك في مسارات مختلفة يمكن ان تستغل مآكنات الاستجابة لأغراض أخرى مثلا في الفطريات الخيطية تستعمل بعض مسارات الاستجابة لتنظيم نمو الهيافات ، وفي الخميرة تستغل لعمليات التزاوج .

مراحل الاستجابة للاجهاد

تحصل الاستجابة على مراحل وتكون عادة مختلفة بين الاحياء وكذلك مختلفة بالنسبة لمسيباتها لذلك ستذكر الخطوط العامة ، وتوضح عند كل حالة وكل كائن مجهري . ومن هذه الخطوات :

اولا استلام الإشارة : او التحسس بالعامل المجهد وتكون عادة عن طريق المستلمات ومنها مستلمات G- protein ، كاييزات التايروسين Receptor – tyrosine kinase و His- Asp. Phosphorylase sensor وغيرها ، اضافة الى ان بعض بروتينات الاغشية الخلوية الاساسية يمكن ان تستعمل في استلام الاشارات .

ثانيا تفعيل أنظمة ومسارات نقل الاشارات : وهذه تختلف بين الاحياء والحقيقة ان اكثرها اهمية هو MAP kinase pathway (Mitogen – activated protein kinase) وهو من

المسارات المهمة الثابتة تقريبا ويوجد في الاحياء قاطبة . ويقوم بنقل الاشارات من خارج الخلايا الى الداخل ويقوم بنقل الاشارات الهرمونية وعوامل النمو والساييتوكينات في الاحياء الراقية .

ويشارك MAPK في العديد من فعاليات الخلية مثل :

- ◆ نمو الخلايا وتكاثرها .
 - ◆ التغيرات الشكلية للأحياء Morphogenesis .
 - ◆ الاستجابة للاجهادات التي تتعرض لها الخلايا .
 - ◆ يساهم في السيطرة على أمراضية الاحياء مثل الخمائر والفطريات .
- وتسلسل تفاعلاته وفعاليتها موضحة في الشكل (48) .
- والنظام يتكون من ثلاث صفوف من كايينيزات البروتينات وهي :

I- MAP Kinase

II- MAP Kinase Kinase (MAPKK) or MEK

III-MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) or MEKK

ويعمل النظام بعملية الفسفرة فالمكون III يفسفر وينشط II على ثمانية السيرين والثريونين الواقعة عند النهاية الامينية للبروتين II . ويقوم المكون الثاني II بفسفرة المركب الأول الذي هو MAPK على ثمانية الثريونين وبعض الاحيان على السيرين والتي تكون موجودة قرب بعضها ولكنها مفصولة بحامض اميني واحد Thr / Ser - X - Tyr وهذا الموقع موجود في الجزء المسئول عن فعالية MAPK .

ان الفسفرة المزدوجة للثريونين والتايروسين تحفز انتقال بعض MAPK من الساييتوبلازم الى النواة وهناك يقوم بفسفرة بروتينات مستهدفة على الحوامض الامينية مثل السيرين ثم الثريونين ثم البرولين . اما الجزء المتبقي من MAPK المفسفر في الساييتوبلازم فإنه يتوسط في التأثير على العمليات التي تلي الترجمة (بعد الاستجابة) .

في مكونات النظام مثل MAPKKK يكون طرف البروتين الاميني مسئولا عن عملية التنظيم ، اما الطرف الكاربوكسيلي فيكون مسئولا عن الفعالية (أي عملية الفسفرة) والجزء الاميني يقوم بغلق الطرف الكاربوكسيلي عند عدم الحاجة الى فعاليته . وعملية الفسفرة الاولى للمكون MAPKKK تتم بواسطة كايينيزات البروتينات او من التداخل مع بروتينات اخرى والذي يكون في معظم الاحيان G - proteins ، اما في الحيوانات فتتم بواسطة مستلم كايينز التايروسين او باشتراك الاثنين معا .

وتتداخل المسارات التي يعمل بها MAPK عند نقل الاشارات خاصة في الاحياء حقيقية النواة سواء الراقية او البسيطة مثل خميرة الخبز . وهذا يؤدي الى خلق شبكة معقدة من مسارات

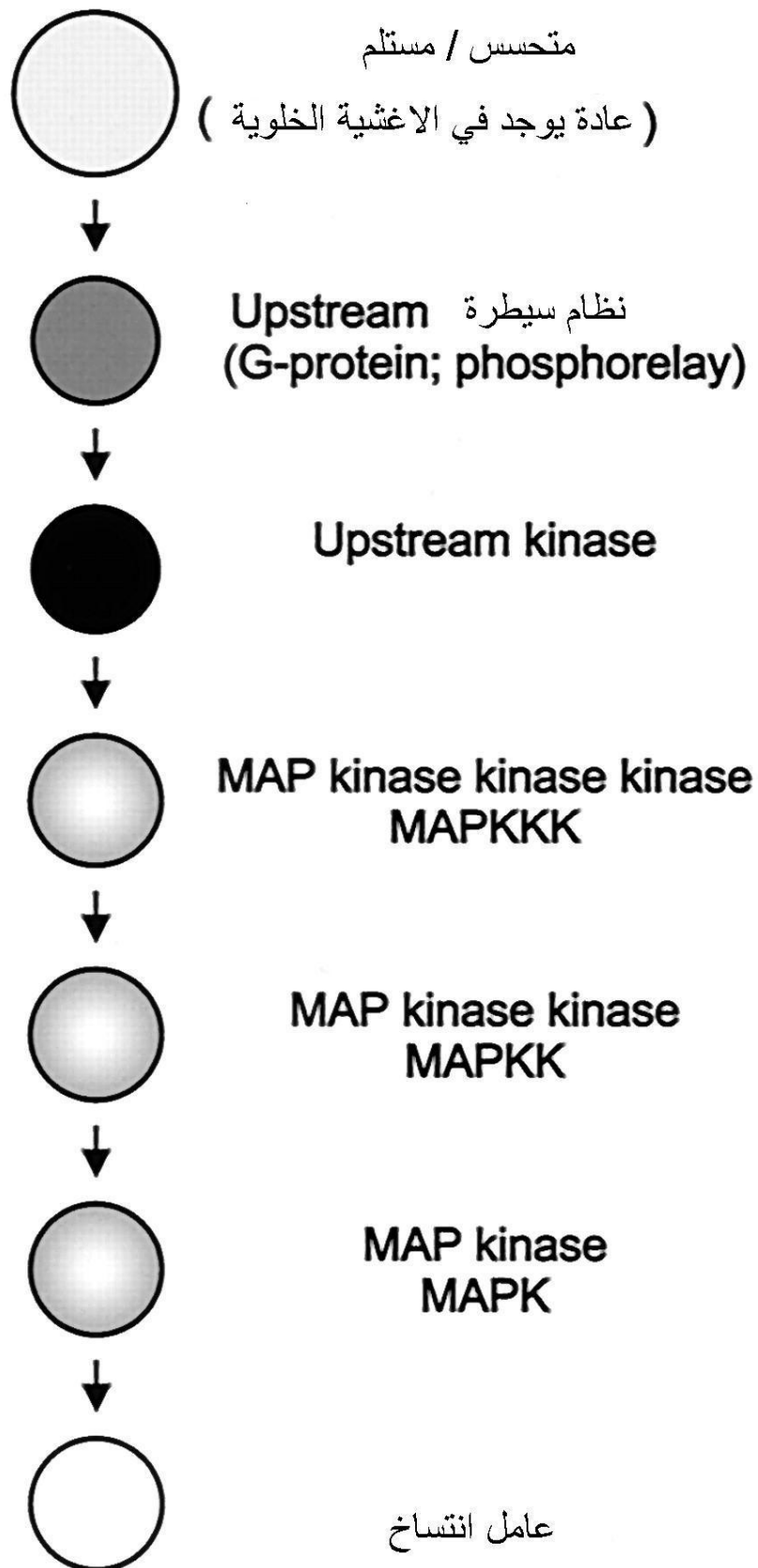
نقل الاشارات ، ولكن يعتقد ان التخصصية تأتي من الاعتماد على بروتينات اخرى هي بروتينات المنصة Scaffold proteins التي تصطف عليها البروتينات وكذلك بروتينات الإرساء Anchor proteins وهذه البروتينات قد تكون بروتينات معدة لغاية او وظيفة معينة او قد تكون جزءا من مكونات سلسلة فعاليات النظام MAPKinase cascades كما ان التخصصية يمكن ان تعتمد على طريقة طوي البروتينات العاملة في المسار .

ثالثا - تنفيذ الاستجابة : وهي تمثل المراحل الأخيرة من الاستجابة بعد ورود الاشارات الخاصة بها وهذه تختلف باختلاف الاحياء للرد على الإشارة الواحدة وتختلف باختلاف الاشارات الواردة في الكائن الواحد ولكنها تتصف بشكل عام :

- ◆ التعبير عن جينات كامنة او صامتة .
 - ◆ زيادة التعبير عن البروتينات الوصيفة لان العديد منها يكون أصلا موجود في الخلايا تحت الظروف الطبيعية .
 - ◆ حث بعض البروتينات الكابحة لتعطيل مسارات تصبح الخلايا ليست بحاجة لها تحت ظروف الاجهاد .
 - ◆ حث العديد من الاستجابات مثل استجابة الاستغاثة SOS وغيرها عند حصول ضرر في المادة الوراثية وحث العديد من انزيمات القطع لغرض تصحيح الضرر في DNA .
- ومن وسائل الدفاع تكوين التراكيب متعددة الخلايا مثل كون الخلايا تعيش في أغشية حيوية او جيوب او حبيبات (كما مر ذكره) فان هذه التراكيب تمثل الخط الدفاعي الاول ضد الاجهادات الميكانيكية والفيزيائية والكيميائية . ومن اهم مكونات الخلية التي تشارك في ايجاد التراكيب المذكورة هي الجدران الخلوية . والخلايا داخل الأغشية الحيوية وغيرها من التراكيب تكون اكثر مقاومة تجاه الاجهادات المختلفة مقارنة بالخلايا المفردة ، والمواد التي تتكون منها التجمعات توفر الحماية والعزل دون التأثير على نقل المواد الى الخلايا او خروج المتايضات منها ويعتقد ان هذه التراكيب نشأت من التغييرات المستمرة للحرارة او الأرقام الهيدروجينية او ظروف اخرى تحدث في النظام البيئي الذي تعيش فيه الخلايا التي كونتها .

مظاهر الاستجابة للاجهادات

- بعد حصول الاستجابة للاجهادات فان الخلايا عموما تعاني من :
- انخفاض معدلات النمو بدرجة كبيرة قد تصل الى الصفر .
 - إنتاج البروتينات الوصيفة وتعد اهم مظاهر الاستجابة .
 - إنتاج مواد حامية ضد الاجهاد المسلط على الخلايا مثل انتاج الكليسرول وغيره من المواد .



شكل 48: نظام نقل الاشارات MAPK

- استسلام الخلايا للموت المبرمج او الاستماتة عند عدم قابليتها لمواجهة الاجهاد وكونه اكبر من قابلية الاستجابة .
- وفيما يلي دراسة لبعض هذه المظاهر :

الوصيفات Chaperones

مجموعة كبيرة من البروتينات التي لا توجد بينها علاقة . تصنف الى عدة عوائل اعتمادا على الوزن الجزيئي . تقوم بوظائفها بشكل مستقل او بمعاونة الوصيفات المساعدة Cochaperones .

وظائف الوصيفات : تقوم هذه البروتينات بالعديد من الوظائف سواء تحت الظروف الطبيعية او تحت ظروف الاجهاد ومنها :

- تساعد في طوي البروتينات الجديدة بعد بزوغ البيبتيدات من الرايبوزومات ومثل هذه تكون موجودة في كافة أطوار حياة الخلية وتقوم بإعطاء البروتينات الجديدة التركيب الثانوي والثالثي بشكل صحيح بحيث يصبح البروتين الجديد فعال حيويًا ، وتساعد في إيصالها الى المواقع التي تحتاجها او تعمل فيها مثل نقلها الى المايتوكوندريا ، أي تكون فعاليتها بمثابة تحويلات بعد الترجمة .

- تقوم بتنشيط البروتينات غير المطوية وتمنع السطوح الكارهة للماء من التداخل او التجمع غير الملائم .

- تقوم بفك طويات البروتينات اثناء عمليات نقلها عبر الاغشية الخلوية .
- تقوم بتفكيك البروتينات التي لا يمكن تصحيحها وطويها بشكل سليم .
- تساعد في طوي بروتينات الوحدات الفرعية للإنزيمات ووضعها بشكل فعال .

صفات الوصيفات : هناك بعض الصفات الخاصة بالوصيفات

- بعض الوصيفات تكون غير متخصصة ولذلك يمكن ان تتداخل مع عدد كبير من سلاسل البيبتيدات المتعددة ، لكن توجد انواع متخصصة في عملها .
- ترتبط عادة بالـ ATP الذي يتحلل للحصول على الطاقة اثناء عمليات الطوي .
- تكون اساسية لعيوشية الخلايا ويزداد بعضها عند تعرض الخلايا للاجهادات .
- لا تتداخل مع البروتينات الطبيعية ، كما يمكن ان تشارك في تركيب البروتين الذي تساهم في طويه .

لذلك يلاحظ ان الخلايا تستعمل آليات مختلفة لغرض الوصول الى بروتينات كاملة فعالة عند الظروف الاعتيادية وكذلك مواجه الضرر الناتج من الاجهادات وذلك باستعمال الوصيفات . وان أي

اضطراب يصيب الآليات المتعلقة بتخليق وتنظيم الوصيفات يؤدي الى ظهور الهرم على الخلايا والأمراض .

والمعروف ان العديد من العوامل المجهدة تؤدي الى التأثير على الخلايا وبالتالي التأثير على البيئة الداخلية لها وتؤدي الى حصول ضرر في البروتينات والمواد النووية وكل هذا يؤدي الى تثبيط الجينات العاملة في إدامة الخلية تحت الظروف الطبيعية لتستحث مكانها جينات تشارك في حماية الخلايا ولذلك تزداد بروتينات الاجهاد ، وهذه الزيادة قد تكون بآليات أخرى غير زيادة عمليات انتساخ جين الاجهاد ومنها :

- ◆ زيادة ثباتية الوصيفات الموجودة تحت الظروف الطبيعية .
- ◆ زيادة ثباتية جزيئات mRNA الخاصة بالوصيفات الطبيعية .
- ◆ زيادة ترجمة mRNA الخاصة بالوصيفات .

وتتعرض البروتينات الممسوخة جزئيا الى التعديل والطوي من قبل الوصيفات وتطلق من التجمعات التي كونتها ، وعند عجز الوصيفات تتحول البروتينات الممسوخة الى شكل غير ذائب وتتجمع لانها تميل للالتصاق مع بعضها مؤدية الى تكوين الاجسام الاشتمالية (Inclusion bodies) وتطور هذه يكون شائعا في الحالات المرضية . ومن الواضح ان البروتينات الممسوخة لا يمكن ان تؤدي وظائفها ، فهي اما تنفذ وتعالج او يتم التخلص منها بواسطة التفكيك والتحليل في جسيم التحلل البروتيني Proteasome .

فالبروتينات منذ ترجمتها وبزوغها من الرايبوزومات وطويها ثم توجيهها الى مواقع عملها ، كل هذه المراحل من حياة البروتين تمثل أهداف ملائمة لتصميم الأدوية مثل إعطاء الوصيفات او استعمال جينات الوصيفات او غيرها من الإمكانات .

تصنيف الوصيفات : تصنف الوصيفات الى مجاميع وعوائل اعتمادا على وزنها الجزيئي الموضح بعضها في الجدول التالي (جدول 9) والتي درست في مجموعة الاركيا التي تعيش في معظم الاحيان تحت ظروف الاجهاد .

والبعض منها يسمى بروتينات الصدمة الحرارية Heat shock proteins نظرا لان اكتشاف البروتينات الاولى منها كان تحت الاجهاد الحراري ، وعليه فان ليست كل بروتينات الصدمة الحرارية هي وصيفات ، وتختلف تسميتها في الاحياء المختلفة ، ومنها :

- ◆ بروتينات الصدمة الحرارية الصغيرة : ويتراوح وزنها الجزيئي اقل من 35 كيلو دالتون ، ومنها البروتين Hsp 16.9 كيلو دالتون الموجود في الحنطة ، وكذلك Hsp17 الموجود في الطحالب والذي يشفر له Fluidity gene تحت الاجهاد الحراري ، وهي تحمي الخلايا ضد اجهادات مختلفة ومنها ما يمنع تجمع البروتينات في العدسات وتمنع ظهور حالة إعتام عدسة العين Cataract .

جدول : 9 تصنيف بروتينات الصدمة الحرارية وفق اوزانها الجزيئية ووجودها في مجموعة الاركيا

البروتين	الوزن الجزيئي (كيلو دالتون)	وجوده في الاركيا
اثقل من 100 كيلو دالتون	اكثر من 100	-
Hsp90	99 – 81	-
Hsp70 (Chaperones)	80 – 65	±
Hsp60 (Chaperonins)	64 – 55	+
Hsp40 (DnaJ)	54 – 35	+
بروتينات صغيرة sHsp	اقل من 35	+
بروتينات اخرى مثل البروتينات	اوزان مختلفة	+

- غير موجود في الاركيا
+ وجود في الاركيا
± موجود في بعضها

- ◆ بروتينات الصدمة الحرارية Hsp40 وتتراوح اوزانها الجزيئية 35 – 44 كيلو دالتون
- ◆ بروتينات الصدمة الحرارية Hsp60 ووزنها الجزيئي 55 – 64 كيلو دالتون وتقوم بعض الاحيان بفك الطوي لذا تسمى Unfolders ، ولكن وظيفتها الرئيسة طوي البروتينات وفي بكتريا *E. coli* يسمى GroEL وفي الخلايا حقيقية النواة يسمى Cpn60 ويقوم بفعالية تحليل ATP لغرض طوي البروتينات وفي الماييتوكوندريا يسمى Hsp60 .
- ◆ عائلة Hsp70 وتعد اهم الوصيفات وتعمل على فك الطيات ، كما انها تقوم ب تثبيت السلاسل المتطاولة ، تساعد في نقل البروتين عبر الاغشية الخلوية وتقوم بتنظيم الاستجابة للصدمة الحرارية وله وظيفة تحليل ATP (ATPase) وفي البكتريا يسمى Dank ، Bip ، وأوزانها الجزيئية تتراوح بين 65 – 80 كيلو دالتون .
- ◆ عائلة Hsp90 ويقوم بالارتباط بالبروتينات وتثبيتها Holder ، وتنظم مستلمات الستيرويدات وينظم فعالية كاييزات البروتينات . ولها قابلية تحليل ATP يتراوح وزنها الجزيئي بين 81 -99 كيلو دالتون .
- ◆ عائلة Hsp100 لها قابلية تحليل ATP ويسمى بعض الاحيان Clp له القابلية على فك البروتينات وتشارك في التحمل الحراري وتشمل العائلة بعض البروتينات مثل Hsluv الذي يسمى

Unfoldase الذي يرتبط بالبروتينز ، وبروتينات Hsp100 تنتمي الى عائلة اكبر هي AAA ATPase والتي تؤدي وظائف كثيرة تصب في عمليات فك الطيات والتشتيت Disassembly . وهناك عوامل اخرى تقوم بإنضاج البروتينات السكرية في الشبكة الاندوبلازمية والسيطرة على إنتاج بروتينات متكاملة وفعالة مثل Calnexin K Calreticulin وكذلك عامل تبادل النيوكليوتيدات Nucleotide exchange factor في *E. coli* ويعرف بعض الاحيان بالمتحسس الحراري Thermosensor .

ومن اهم العوائل المذكورة اعلاه

عائلة Hsp70 من المجاميع المهمة التي تنتشر في الخلايا بدائية النواة والخلايا حقيقية النواة سواء في الاحياء البسيطة او من الاحياء الراقية وتشمل :

1- الخلايا بدائية النواة وتكون منتشرة في الساييتوبلازم ومنها DanK ، GrpE ، وعوامل مساعدة تشارك في تثبيت السلاسل الببتيديّة المخلقة حديثا كما تحافظ على كفاءة الطوي وتساعد البروتينات التي تعاني من المسخ الحراري ، كما انها تسيطر على الاستجابة للصدمة الحرارية .

2- في الخلايا حقيقية النواة : تكون الوصيفات موزعة بين اجزاء الخلية ومنها :

ا - الموجودة في السائل الخلوي ومنها SSB1,SSA1 (موجود في الخمائر) ، Hsc/ hsp70 تساعد هذه في نقل البروتينات عبر اغشية العضيات ، والارتباط الى الببتيديّات الجديدة كما تساعد في تفكيك البروتينات الموجودة في السائل الخلوي .

ب - البروتينات الموجودة في الشبكة الاندوبلازمية مثل Bip/Grp78 و KAR2 ، وتعمل على نقل البروتينات في الشبكة الاندوبلازمية .

ج - المايكوكوندريا ويوجد فيها SSC1 الذي يساعد في نقل البروتينات الى داخل المايكوكوندريا .

د - البلاستيدات الخضراء CtHsp70 ويساعد في إقحام معقدات حصد الضوء في التراكيب الغشائية للـ Thylakoid .

عائلة Hsp60 وتسمى Chaperonins وتقسم الى عائلتين فرعية هي :

1 - مجموعة GroE ويوجد منها في الخلايا بدائية النواة GroES / GroEL وتشمل عامل الاستطالة وإنزيم الكثرة RNAP واخرى تعمل في طي البروتينات ، وتكون لازمة لعمليات تجميع العائيات ، اما في المايكوكوندريا فيوجد Hsp60 / 10 الذي يساهم في تجميع البروتينات الداخلة ، ويشابه الوصيف Cpn60 / 10 الموجود في البلاستيدات الخضراء .

2 - مجموعة Tcp-1 توجد في :

- المحلول الخلوي للاركييا ومنها TF55 والجسم الحراري Thermosome التي ترتبط

للبروتينات الممسوخة بالحرارة وتمنع تجمعها .

- في الخلايا حقيقية النواة يوجد منها 1-Tcp ، CCt وغيرها ، التي تقوم بطوي الاكتين و Tubulin وهي المكونات الأساسية للهيكل الخلوي . وتستطيع طوي Luciferase المستخلص من ذبابة النار خارج الأنظمة الحية .

والحقيقة انه توجد اعداد كبيرة من البروتينات الوصيفة ، وبما انها تعمل على تعديل العديد من الجزيئات الخلوية لذلك تسمى بعض الاحيان بالوصيفات او المعدلات الجزيئية Molecular chaperones .

طوي البروتينات

عمليات طوي البروتينات لا يمكن ان تتم بشكل تلقائي ، ولكن في بعض الاحيان يحصل طوي جزئي نتيجة لوجود معلومات في التوالي الاولي للبيتيد ، ولكن في وسط الساييتو بلازم الحاوي على العديد من المواد لا يمكن ان تطوى البروتينات بشكل صحيح الا بمساعدة الوصيفات وذلك لان الطوي الذاتي يكون عرضة للأخطاء خصوصا في وسط مزدحم ، والطوي غير الصحيح يؤدي الى تجمع البروتينات وفقدانها لوظيفتها وتقوم الوصيفات بذلك ، كما ان عمليات الطوي والتفكيك تكون متوازنة في الخلية . ومن الأنظمة التي تقوم بها Chaperonin system والنظام سواء في البكتريا او الاركيا او خلايا حقيقية النواة فهو بشكل عام يتكون من تركيب برميلي الشكل مكون من عدة حلقات ، النوع الاول في البكتريا يتكون من GroES الصغير وزنه الجزيئي 10 كيلو دالتون ، و GroEL الكبير 60 كيلو دالتون ، وهو نظام يوضع ضمن Hsp60 والجزء الصغير يعمل بمثابة غطاء للتركيب الذي تكونه حلقات GroEL . وما يقابله في الخلايا حقيقية النواة CCT من النوع II ويكون تركيبه يشبه النوع البكتري ولكن مع وجود اختلافات شكلية مظهرية ، وكذلك يختلفان في الوظيفة . GroEL يرتبط بعدد من البروتينات ولكن ليس بالضرورة ان يقوم بطوي كل البروتينات التي تدخل اليه . وكذلك يكون CCT انتقائي فهو يرتبط ويطوي البروتينات بنمط يعتمد على تحليل ATP للاكتين و Tubulin وربما بروتينات اخرى ، والاجهادات تؤدي عادة الى مسخ البروتينات جزئيا وقد درست ظاهرة الطوي في الخلايا حقيقية النواة وعضياتها وكذلك في *E. coli* وفيما يلي وصف موجز :

بعد تكون السلسلة الببتيديدية على الرايبوزوم والتي تكون قد مرت بخطوات الترجمة المعروفة (والتي تم شرحها) تبرز السلسلة وتكون بحاجة الى عملية نضج وتطور لتصبح بروتينات فعالة بشكل وتوزيع فراغي معين ، والسلاسل الناتئة تتداخل مع بروتينات وجزيئات ومنها ماكنة الوصيفات Chaperone machine و Chaperonin system لغرض طويها والذي يتم بعدة طرق :

1 - ماكنة الوصيفات وهي مكونة من Hsp70 (DnaK) و Hsp40(DnaJ) + GrpE تعمل بمسار بسيط يشمل الوصيفات التي تساعد في طوي السلاسل المتعددة الناتئة في السائل الخلوي دون مشاركة Chaperonin .

2- يقوم Chaperonin System المكون في البكتريا من GroEL و GroES وفي الخلايا حقيقية النواة TRic . ويتكون في البكتريا من 7 حلقات (GroEL) بشكل تركيب برميلي الذي تدخل اليه السلاسل المراد طويها الى الفراغ الوسطي للمعقد وتسمى مرحلة الاستقبال ويغلق عليها بواسطة GroES وتصيح داخل غرفة الطوي المغلقة (Closed folding chamber) ويكون داخله محبا للماء الذي يساعدها على الطوي الصحيح ، وتصيح البيئة الداخلية محبة للماء نتيجة تغيرات شكلية تعقب الارتباط بـ ATP وكذلك الغطاء GroES . لذلك فالسلاسل في الداخل لا تجد ما تتجمع معه وانما تقوم تحت هذه الظروف بالانطواء بشكل صحيح . وبعد ذلك يفتح الغطاء بمساعدة ATP وتخرج السلسلة المطوية بشكل صحيح الى السائل الخلوي ، واذا كان الطوي غير كاملا تعود السلسلة لتدخل فراغ GroEL والذي يكون مفتوحا لاستقبال سلاسل جديدة ، وتعاد دورة الطوي الى حين الوصول الى طوي صحيح ومتكامل .

3- او تطوى السلاسل باشتراك Chaperonins ومكائن الوصيفات وهو مسار معقد ، وفيه يقوم Chaperonin complex باستلام السلسلة وادخالها الى فراغه الداخلي ولكن لا تطوى بشكل كامل وانما يتم اكمالها بواسطة مكائن الوصيفات .

4 - الطريق الاخر استعمال بروتين Prefoldin و TRic ويحدث في السائل الخلوي للخلايا حقيقية النواة ويعتقد ان البروتين TRic يتعاون مع ماكنة الوصيفات . وفي الخلايا حقيقية النواة فان Chaperonin system يعمل في تعديل وطوي بروتينات قليلة وهي التي تدخل في الهيكل الخلوي مثل Actin , Tubulin . والآلية البديلة المقترحة ان السلاسل في السائل الخلوي تقاد بواسطة Prefoldin الذي يساعد في إيصالها الى معقدات TRic لغرض طويها .

ويلاحظ ان ليست كل البروتينات وبشكل مطلق تحتاج الى طوي خاصة بروتينات الخلايا بدائية النواة مثل البكتريا التي تكون بروتيناتها اقصر وابسط من بروتينات حقيقية النواة . فبعض بروتينات البكتريا المكونة من جزء واحد يقوم بالوظيفة والذي تكون فيه التواليات المسؤولة عن الوظيفة متجاورة او مفصولة بتواليات قليلة من الحوامض الامينية لا تحتاج الى عمليات طوي وتعديل معقدة لانها لا تميل بقوة الى الطوي غير الصحيح ، كما ان افتراض حصول خطأ في الطوي يكون قليل في البروتينات القصيرة البسيطة .

اما بروتينات الخلايا حقيقية النواة التي تكون طويلة ومتعددة الأجزاء ، والأجزاء قد تكون متجاورة او مفصولة بتواليات طويلة من الحوامض الامينية في التركيب الأولي ، لذلك فان حدوث أخطاء في الطوي تكون اكبر مما في بروتينات البكتريا . لذلك فان السلاسل الناتئة يجب ان تساعد بشكل سريع حتى اثناء عمليات التخليق خوفا من ان يلتف خيط الحوامض الامينية على بعضه او مع مكونات المحيط المباشر له ، وعليه كانت عمليات التعديل المرافقة للترجمة Cotranslational chaperoning إجبارية في الخلايا حقيقية النواة ، خاصة البروتينات المكونة من أجزاء متجاورة ، اما البروتينات التي فيها أجزاء وظيفية غير متجاورة فانها تحتاج المساعدة من قبل مكانن التعديل بعد انتهاء عملية الترجمة .

شبكة عمل الوصيفات في الصدمة الحرارية

تعمل الوصيفات ومساعداتها بشكل شبكة متكاملة متبادلة الأدوار وتكون عمليات طوي البروتينات ونقلها في حالة توازن وفق حاجة الخلايا ، كما تتداخل الوصيفات Hsp70 , Hsp90 مع الوصيفات المرافقة مثل عامل تبادل النيوكليوتيدات الذي يسهل تدوير ATP – ADP التي يحتاجها Hsp70 عندما يقوم بطوي البروتينات ، والبعض يتداخل مع الحوامض النووية .

ومشاركة الوصيفات ومساعداتها لا تقتصر على طوي السلاسل وإنما تقوم بتوجيه التالفة او التي لا يمكن انقاذها الى جسيم التحلل البروتيني لغرض تفكيكها ، وجسيم التحلل البروتيني Proteasome نظام يحوي الانزيمات المحللة للبروتينات في تجويف مركزي يتكون من تنضيد مجموعة من الوحدات البروتينية . ويقوم بهضم البروتينات داخل فراغه المركزي . ويشارك جسيم التحلل البروتيني في فسلفة الاحياء تحت ظروف الاجهاد .

ومن اوجه التوازن ما يلاحظ في *E. coli* فيما يخص GroE و DnaK . فالأول يقوم بخلق بيئة حامية يتم طوي البروتينات فيها ، اما DnaK فيقوم بالارتباط بالبروتينات غير المطوية او المطوية جزئيا وهو يتداخل مع عوامل قادمة Triggers factors العاملة في ترجمة البروتينات ، كما انه يتداخل مع بروتين ClpB وبروتينات صغيرة تتجمع بعد الصدمة الحرارية ، اضافة الى البروتينات الأخرى العاملة في الصدمة الحرارية .

واهم المحفزات والإشارات اللازمة لحث تخليق Hsps هو ارتفاع درجة الحرارة وكذلك وجود البروتينات غير المطوية داخل الخلايا ، وهذه الحالات يمكن ان تحس وتنقل بشكل مختلف في البكتريا المختلفة ، ومنها العامل سيكما 32 في الوحدة الفرعية للإنزيم RNAP في *E. coli* ، الذي يتم ترجمة بروتيناته بكفاءة وتحصل له عمليات تثبيت عابرة بعد الصدمة الحرارية ، اما في البكتريا *B. subtilis* فان الكابح HrcA يتم تحويله بتأثير ماكنة GroE .

فعاليات بروتينات الاجهاد الاخرى

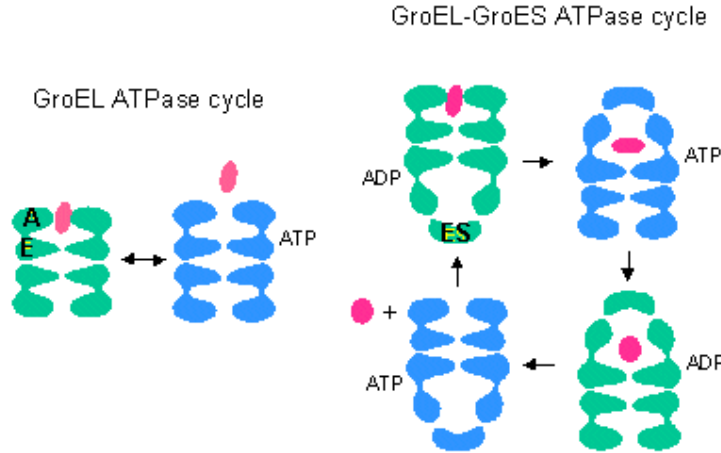
بروتينات الاجهاد لا تشارك فقط في حماية البروتينات وانما تساعد في تدمير البيبتيدات التي لم تعد الخلايا بحاجة اليها وذلك لان وجودها يعد خطرا على الخلايا ويمكن ان تؤدي الى الامراض ، كما ان بروتينات الاجهاد ليست كلها وصفات والعكس صحيح ، ومنها البروتينات مثلًا في *E. coli* يوجد *Lon* , *Hsluv* , *FtsH* , *DegP* , *ClpXp* , *ClpAp* , وغيرها تعمل على تفكيك البروتينات باستعمال جسيم التحلل البروتيني او بشكل ادق Ubiquitin – Proteasome system أي بعد ربطها بالمدمر Ubiquitin وتفكيكها بمساعدة الطاقة الناتجة من تحلل ATP ومنها أيضا نظام إصلاح DNA ومنظمات جسيم التحلل البروتيني ومنظمات دورة الخلية ، وبعضها يكون موجودا في كل الاحياء تقريبا ، ومن الوظائف الاخرى التي تؤديها :

- تنظم فعاليات كينزات الاجهاد مثل JNK .
- ترتبط الى بعض الإنزيمات لتحويل وتعديل فعاليتها .
- تشارك في مسارات نقل الإشارات .
- تشارك في عمليات معالجة mRNA .
- تقوم بعملية تخليقها .

ولذلك فان بروتينات الاجهاد تكون متعددة الوظائف فهي تعمل داخل الخلايا وكذلك داخل اجزاء الخلايا أي داخل العضيات وعليه فانها مختلطة وتتداخل مع انواع مختلفة من الجزيئات ، وهذه الوظائف المختلطة تشير الى اختلاف تركيبها . وقد وجدت في كل الاحياء التي فحصت وتزداد كمياتها تحت ظروف مختلفة مثل ارتفاع درجات الحرارة والاصابة بالفيروسات والاجهاد التاكسدي وغيره من الاجهادات التي سيمر ذكرها .

تنظيم فعاليات الوصفات

تكون فعاليات الوصفات منظمة بشكل صارم جدا وتقسم وفق اعتمادها على ATP الى **المجموعة الاولى** : تنظم بالارتباط وتحلل ATP وتسمى بـ Foldases وتحصل فيها دورة تحلل ATP الى ADP كما موضح في الشكل (49)



شكل 49 : تنظيم فعالية البروتينات الوصيفة

وهذه الدورة تؤدي الى اختلافات في الفة الارتباط بموادها الأساس من البروتينات ، فمثلا DnaK-ADP يكون ذات ألفة عالية للارتباط ، اما حالة DnaK – ATP فتكون ذات ألفة واطئة للارتباط ويكون تداخلها ضعيفا مع البروتينات غير المطوية . ويتم تحول الحالات بمساعدة الوصيفات المساعدة Cochaperones التي تساعد في تحليل ATP مثل عامل تبادل النيوكليوتيدات و GrpE , DnaJ في الخلايا بدائية النواة ، اما في الخلايا حقيقية النواة فيوجد عددا كبيرا منها والتي تتداخل مع Hsp70 مثل Hsp70 , Auxilin , BAG-1 ، وتكون استمرار الدورة ADP/ATP من الارتباط والانطلاق لمواد الأساس البروتينية ضرورية لعملية اعادة طوي البروتينات الى الشكل الطبيعي .

المجموعة الثانية : الوصيفات غير المعتمدة على ATP وتسمى بـ Holdases مثل Hsp33 الذي يعمل في إجهاد الأكسدة وبروتينات الصدمة الحرارية الصغيرة sHsps وهي ترتبط الى المركبات الوسطية من البروتينات المطوية وغير المطوية بتداخلات كارهة للماء ، ولكن لا تستطيع لوحدها طوي البروتينات الى الشكل الطبيعي . وقد وجد ان Holdases تقوم بتقديم ونقل موادها الأساس من البروتينات الى ما يقابلها من المجموعة الأولى من Foldases مثل DnaK system الذي يقوم بطوي البروتينات بشكل كامل وصحيح .

وتبادل الأدوار بين المجموعة الأولى والثانية يكون تحت سيطرة صارمة وبذلك يمنع تكوين بروتينات مطوية بشكل خاطئ . وتحت الظروف التي لا تسمح بطوي البروتينات تبقى الأخيرة غير المطوية مرتبطة بـ Holdases ، ان بقاء الانزيمات Holdases مرتبطة بالبروتينات غير المطوية الى حين زوال الاجهاد يشير الى أنها فعالة تحت ظروف الاجهاد فقط ولذلك تكون وظيفتها في الحماية ضرورية جدا عند الاجهاد مثل Hsp33 و Hsp16.9 وهذا يجنب الخلايا صرف الطاقة (ATP) عند عدم التعرض للاجهاد . وعند زوال الظروف المانعة تنقل الى Foldases لطويها .

وتنظم Holdases مثل حالة Foldases اذ تمر بدورات من الألفة العالية والواطئة لمواد الأساس التي تعمل عليها وفي هذه الحالة قد يكون الطرف المنظم هو حالة الأكسدة والاختزال في البيئة المحيطة كما في حالة Hsp33 و PDI (الذي ينظم أيضا بحالة الأكسدة والاختزال وهو من إنزيمات Oxidoreductases) ، او الحرارة في حالة sHsps .

وما ذكر يفيد ان الوصيفات يمكن ان تنظم ليس فقط على نطاق الانتساخ وانما تنظم على مستوى الوظيفة ، كما ان البعض منها ينظم بعد الترجمة فمثلا الحرارة تقوم بتنظيم فعاليات Hsp26 في الخميرة ، و Hsp16.9 في الحنطة وكذلك تنظم GrpE .

في الاحياء حقيقية النواة وخاصة الراقية منها فان اغلب عمليات الطوي تتم في الشبكة الاندو بلازمية التي تعد بيئة جيدة لطوي البروتينات لانها تحوي على اعداد كبيرة من الوصيفات التي لها علاقة بطوي البروتينات والسيطرة النوعية عليها . وتتكون مكانتها من مجموعة من الوصيفات الجزيئية مثل Hsp70 , Hsp60 و عامل تبادل النيوكليوتيدات وتحوي على مركب معقد من البيبتيدات المتعددة Chaperone –containing tailless complex polypeptide (Tc1-1) المكون من 8 وحدات فرعية ويسمى ايضا CCT ، اضافة الى احتوائها على Prefoldin المكون من وحدات فرعية وبروتينات الصدمة الحرارية الصغيرة والتي تكون متعددة الوحدات بأحجام مختلفة ، وتحوي على Chaperonin على شكل معقدات Cpn10 - Cpn60 الذي يسمى ايضا Hsp10 / Hsp60 (Chaperonin =Cpn) . والمعقد الاخير يوجد في المايكوتونديا والمكونات الاخرى توجد اما في السائل الخلوي او اجزاء الخلية الاخرى المحاطة بالأغشية وتنظم هذه المكونات بشكل دقيق .

وعند حصول طفرة في البروتين الوصيف ويصبح معطوب وراثيا فان هذا قد يشوه البروتين بعد الانتساخ والترجمة ويصبح العطب مكتسبا ، اما تأثيرها على وظيفة البروتين فيعتمد على الجزء المعطوب فقد تؤثر على الوظيفة وتؤدي الى الامراض ، والكلفة بالنسبة للخلية يعتمد على العمل الوظيفي الذي يقوم به البروتين المعطوب ، فبعض الوصيفات تؤدي مدى ضيق من الوظائف مثل فك وطوي البروتينات في حين ان البعض الآخر يؤدي مدى واسعا من الوظائف للسلاسل مثل طوي Tubulin يحتاج الى الوصيفات مع عدد من العوامل المساعدة مثل A , B , C , D , E اضافة الى وظائف مكونات اخرى ، وتظهر هذه بشكل كبير في الوصيفات غير المتخصصة التي تساهم في عدد من الفعاليات الخلوية .

الوصيفات والجوانب الصحية : عند عدم انتظام فعاليات الوصيفات فان البروتينات التي تقع تحت سيطرتها أي البروتينات الممسوخة تميل للاتصاق الواحدة للأخرى مؤدية الى تكوين الأجسام الاشتمالية وتطور هذه يكون شائعا في الحالات المرضية مثل أمراض Parkinson's , Huntington's , Alzheimer's وغيرها حتى عند غياب الاجهاد عن الخلايا .

وهذه الأمراض وغيرها تكون مرتبطة بالتحويلات التي تحصل بعد الترجمة لبروتينات الوصيفات والتي تصبح واضحة سريريا في مراحل متأخرة من العمر ، ولكنها قد تظهر بشكل اقل وضوحا من الناحية السريرية في الطفولة والكهولة وتتطور بتقدم العمر . واليات التحويل للبروتينات بعد الترجمة تكون مختلفة بالنسبة للبروتينات المختلفة ومنها أكسدة بعض الحوامض الامينية ، إزالة مجموعة الأمين من بعض الحوامض الامينية ، إضافة السكريات ، الفسفرة ، وعملية البتر وغيرها من العمليات التي تحصل للبروتينات والتي يمكن ان تشمل إزالة النهاية الكربوكسيلية او الامينية .

وأثناء الهرم وتقدم العمر فان هذه التحويلات تؤدي الى تدمير عدد كبير من البروتينات ومنها الوصيفات وبالتالي تؤدي الى إنتاج وصيفات غير مؤهلة وغير قادرة على تصحيح البروتينات المتضررة . وفي حالة الأمراض الناتجة عن الوصيفات المعولة تكون متغيرة من حيث التركيب ويمكن ان تقل او تزداد او تنتشر بشكل غير طبيعي في الأنسجة والخلايا ، كما ان الأمراض قد تنتج من رفع مستوى التنظيم (للوصيفات الطبيعية) او خفضه وذلك بالتأثير على الجينات المسؤولة عن تخليقها مثل حدوث طفرات او حدوث خلل في التحويلات بعد الترجمة .

ويمكن ان تتأثر عوامل الصدمة الحرارية (HSFs) Heat shock factors وهي بروتينات تقوم بتنظيم عمليات انتساخ جينات الوصيفات ، والتي قد تتعرض للطفرات او حصول تحويرات لبروتيناتها بعد الترجمة وكلاهما يمكن ان يؤدي الى تغييرات في الكمية او الوظيفة .

وحجز الوصيفات في الأجسام الاشتمالية في الطور السائل من أجزاء الخلية يؤدي بطبيعة الحال الى قتلها ، ويمكن ان توجد في سائل الجسم ووجد ان الحالة الاخيرة مرتبطة ببعض أورام الهرم ، كما ان الجسم يبدأ بتكوين أجسام مضادة تجاهها Antichaperone autoantibodies .

وقد درس كل من Hsp70 , Hsp90 بشكل مفصل ووجد ان كميته في أكباد الحيوانات الكبيرة في العمر اقل من حيث الكمية والوظيفة من الحيوانات الفتية ، كما ان خلايا الإنسان المأخوذة من الرئات والقلب و Melanocyte والاورومات الليفية Fibroblasts و Retinal cells والمزروعة تختلف الوصيفات فيها من حيث الكمية اعتمادا على العمر فكانت الكميات اكبر في الخلايا المأخوذة من أشخاص بعمر 27 – 44 سنة في حين كانت قليلة من الخلايا لأشخاص بعمر 78 – 92 سنة ، وقد انعكس ذلك على HSF-1 الذي يقل بزيادة هرم الخلايا .

وتتأثر الوصيفات أيضا بالعرق وليس العمر فقط فمثلا Hsp70 في مصل الصينيين يكون قليلا في أعمار مبكرة أي بعمر 30 - 40 مقارنة بالأعمار 25 - 30 سنة .

وعليه فان مستويات Hsp70 في المصل تعطي صورة عن الحالة الصحية خاصة عند كبار السن ، ويعتقد ان الوصيفات تنتقل الى المصل نتيجة لتدمير الأغشية الخلوية الذي يرافقه نزوح المواد

الخلوية وهذا يعني ان الإنسان ليس في صحة جيدة ، ولكن قد يكون وجود الوصيفات في المصل او سوائل الجسم ضروريا لدورها في الجسم .

وترتبط الوصيفات بأمراض متعددة إضافة الى ما ذكر علاه مثل أمراض الجهاز العصبي التحليلية و Myositis ، وإعتام عدسة العين واعتلال الشبكية Retinopathy وبعض السرطانات مثل von Hippel – Lindan diseases .

علاقة الوصيفات بالجهاز المناعي

تشارك الوصيفات في مراحل مختلفة من الاستجابة المناعية في الإنسان والحيوانات مثل بدء إنتاج Proinflammatory cytokines ، وكذلك التعرف على المستضد ومعالجته ، وتنشيط الخلايا المقدمة للمستضدات Antigen – presenting cells وتعديل البيبتيدات أثناء التقديم . فالوصيفات يمكن ان تعمل كعامل مساعد Adjuvant وذلك بارتباطها ببعض البيبتيدات الفيروسية او البكتيرية والبيبتيدات على الخلايا الورمية من خلال جزء معين من تركيبها وبذا يمكن ان تزيد الاستجابة المناعية .

وبروتين Hsp70 يشجع إنتاج الانترلوكينات IL-12 و $TNF - \alpha$ وكذلك يساعد في إنتاج اوكسيد النترينك ، والمشاركة تتم بواسطة النهاية الكربوكسيلية للوصيف المكونة من 10 حوامض امينية . وعند تعريض فئران التجارب للحرارة يزداد مستوى Hsp72 خارج الخلايا وقد يكون ذلك لتحضير الجهاز المناعي ضد البكتريا الممرضة وذلك لان كل من الخلايا الابتلاعية الكبيرة Macrophages وخلايا الطحال Splenocytes تحفز بـ Hsp72 ويؤدي ذلك الى زيادة اوكسيد النترينك و $TNF - \alpha$, IL-1B , IL-6 وهذا يشير الى ان Hsp72 يحفز إنتاج اوكسيد النترينك والاستجابة المناعية للمستضدات البكتيرية المستعملة ، وعندما يكون Hsp72 غير فعال فان الاستجابة المناعية للميكروبات تكون معلولة .

ومن جهة ثانية فان الوصيفات وبروتينات الصدمة الحرارية هي مواد مولدة للمناعة عندما يحصل تغير في تركيبها والذي يمكن ان يؤدي الى وجود المستضدات الذاتية والتي تحث استجابة مناعية ذاتية عند تعرضها للجهاز المناعي كما هو الحال عند الهرم . ففي حالة الهرم تخرج الوصيفات غير الطبيعية من الخلايا مؤدية الى تكوين أجسام مضادة ذاتية تجاه الوصيفات والتي تقوم بتدمير الأنسجة ، ويعتقد انها تساهم في نقص واضطراب الوظائف المرافقة للهرم . فمثلا الأجسام المضادة Anti – Hsp47 توجد في مصل الأشخاص الذين يعانون من Systemic lupus erythomatosus وغيرها من امراض المناعة الذاتية وهي غير موجودة في مصل الأشخاص اللذين لا يعانون من أمراض المناعة الذاتية . لذلك يمكن ان تستغل الوصيفات وتدرس بشكل مفصل لغرض استعمالها في استنباط الأدوية ضد بعض الامراض المستعصية .

التنافذيات Osmolytes

هنالك العديد من المواد اللابروتينية التي تلعب دورا مهما في حماية الخلايا ضد ظروف الاجهاد وبذلك هي تؤدي في النهاية أدوارا مشابهة لعمل الوصيفات . ومن ظروف الاجهاد المهمة زيادة الضغط التنافذي وارتفاع درجة الحرارة .

تغير الضغط التنافذي

يعد التطبع للضغوط التنافذية الخارجية وتنظيمها من الأساسيات لبقاء الخلايا حية ، وعادة يكون الضغط التنافذي داخل الخلايا أعلى من البيئة المحيطة مؤديا الى وجود الضغط الانتفاخي Turgor pressure والذي يكون ضروريا لعمليات النمو وانقسام الخلايا . وتغير الضغط التنافذي وازدياده خارج الخلايا يؤدي الى دفع الماء الى خارج الخلايا مؤديا الى الانكماش وحصول الجفاف ، اما عند انخفاض الضغط التنافذي خارج الخلايا يؤدي الى دخول الماء الى داخل الخلايا وانفجارها . ولذلك فان الخلايا طورت آليات عدة للتطبع مع تغيرات الضغط خارج الخلايا .

ويكون تغيير البيئة ناتجا عن تغيير التركيب الأيوني وزيادة الملوحة او وجود مواد اخرى مثل السكريات . وهذا يعني ان البيئات يمكن ان تتراوح من بيئات ذات ضغط تنافذي واطئ جدا كما في المياه العذبة الى بيئات يرتفع فيها الضغط التنافذي بشكل كبير كما في البحيرات المالحة وعادة يكون التطرف في احد العوامل مرافقا لتطرف في عوامل اخرى مثل زيادة الحموضة التي قد ترافقها ارتفاع بدرجات الحرارة .

ومن الآليات التي تستعملها الخلايا للتطبع أمام تطرف الضغط التنافذي :

- تراكم التنافذيات التي تساعد في طوي البروتينات الى شكلها الطبيعي .
- التمييز بين المذابات ففي بعض الاحيان تجمع الخلايا مركبات سالبة لمعادلة ايونات البوتاسيوم K^+ او تكون متعادلة وفق الطرف الذي تمر به .
- السيطرة على الدفع الخارجي للايونات .
- التغير في التعبير الجيني للعديد من البروتينات .
- تطوير الخلايا لأنزيماتها وجعلها مرنة لتلائم مع الظروف التي توجد فيها ، فمثلا في الخلايا حقيقية النواة فان الإنزيم Ribonuclease له قابلية عالية لامتصاص الماء بنسبة تصل الى 600 مول ماء / مول من البروتين ، ولكن عند وجود احدى التنافذيات مثل Sarcosine تنخفض القابلية الى 70 مول ماء / مول بروتين .

وتقوم الخلايا بتجميع بعض المواد لغرض مواجهة الضغط التنافذي ويطلق عليها المذابات المتوافقة Compatible solutes . وتقوم المذابات المتوافقة بمنع مسخ البروتينات ، اذ أن فك

انطواء البروتينات يؤدي الى زيادة المساحة السطحية للبروتينات ولذلك فان التنافذيات تقابل توسع سطح البروتين بواسطة زيادة التميؤ Hydration ، كما انها تزيد من تداخلات السلاسل الجانبية مما يؤدي الى زيادة ثباتية البروتين أي انها تزيد Chemical potential للبروتينات الممسوخة والتي تؤدي الى معاكسة الالتفاف العشوائي وإعادته الى التركيب المطوي الملائم ، وبذا فهي تزيد من كمية البروتينات المطوية تحت الظروف غير الملائمة .

وتعود قابلية المذابات المتوافقة او التنافذيات في اداء مهمتها المذكورة الى انها تؤدي الى حالة توازن بين سطوح الجزيئات الكبيرة والطور المائي وذلك بمقاومة التغيرات الكبيرة داخل الخلايا ، اذ انها تتجمع عند سطوح تلاقي الطور المائي وسطوح الجزيئات الكبيرة مثل البروتينات وغيرها من الجزيئات الخلوية

أنواع المواد المتراكمة : تختلف الاحياء في المواد التي تراكمها لمواجهة اجهاد التنافذ والأغلبية العظمى منها يتم نقلها من الوسط المحيط لأنه يوفر الطاقة للخلايا مقارنة بعمليات تخليقها . وتختلف المواد وفق المادة المسببة لزيادة الضغط ولكن اغلبها تتفق في انها تكون خاملة كي لا تؤثر على مكونات الخلية الداخلية وتغير من فعاليتها ومنها :

• **السكريات والكحولات المتعددة :** وفي هذه الحالة تجمع الخلايا السكريات ولكن بعد ان تحولها الى شكل خامل وذلك لان وجود السكريات بتركيز عالية يؤدي الى إضافة السكر الى عدد كبير من الجزيئات بطرق لا انزيمية وخاصة عندما تكون درجات الحرارة عالية ويؤدي ذلك الى تغير فسلجة الخلايا لذلك تقوم الخلايا بتحويل النهايات المختزلة للسكريات مثل تكوين التريهالوز و Glucosylglycerol او Glucosylglycerate او أي مادة اخرى لإخفاء فعالية السكريات . فمثلا Glucosylglycerol وهو من التنافذيات العضوية الذي يتجمع في البكتيريا المزرقة استجابة لزيادة الملوحة ، وتستعمله بكتيريا اخرى عند وجود طلائعه في الوسط الذي تنمو فيه . اما Glucosylglycerate وهو مركب سالب الشحنة مشابه للمركب Glucosylglycerol فتجمعه الاركيا خاصة المولدة للميثان ويمكن ان تكونه تحت ظروف اخرى مثل نقص النتروجين . ويمكن تجميع السكريات قليلة الوزن الجزيئي مثل السكروز والكلوكوز والتريهالوز .

التريهالوز : سكر ثنائي غير مختزل يوجد عادة في الاحياء التي تتعرض للجفاف مثل الخمائر والاركيا بتركيز قد تكون عالية جدا او واطئة ويلعب دورا أساسيا في الحفاظ على البروتينات وطوبها . وبعض الاركيا يمكن ان تخلق مشتقاته عند وجود الكلوكوز في الوسط الذي تنمو فيه باستعمال الانزيمات ، ومنها المركب 2-sulfotrehalose الذي له قابلية على درئ التنافذية العالية في الاركيا المحبة للملوحة والمحبة للقاعدية مثل *Natronococcus spp* ، *Natronobacterium spp* ،

والمركب يحوي على الكبريتات المرتبطة الى الذرة الثانية من الكربون لاحدى جزيئات الكلوكوز . ويوجد المركب كإحدى المذابات المتوافقة في احياء اخرى وهو سالب الشحنة وتستعمله الخلايا لمعادلة تراكيز ايون البوتاسيوم ، وهذه الظاهرة تكثر في الاركيا اذ ان المواد الموجودة في داخلها تكون أيونية بإضافة شحنة سالبة عليها مثل إضافة الفوسفات او الكبريتات او غيرها .

اما الكحولات المتعددة المستعملة فهي كثيرة مثل الكليسرول والمانيتول و Arabitol ولعل اهمها الكليسرول الذي يوجد في العديد من الخمائر والطحالب ، والاخيرة تستعمل للإنتاج التجاري مثل الطحلب *Dunaliella* لمواجهة التركيز الملحي العالي خارج الخلايا . اما الاركيا مثل *Archaeoglobus fulgidus* فتجمع الكليسرول على شكل فوسفات الكليسرول Diglycerol phosphate (DGP) كمذاب عضوي أساسي داخل الخلايا ويزداد تركيزه عند زيادة تركيز كلوريد الصوديوم وعند ارتفاع درجة الحرارة .

ويعد الاينوزيتول Inositol من المواد التي تتراكم عند ظروف الاجهاد فمثلا النباتات واللبائن تجمع myo-inositol بينما الاركيا تجمع الشكل المفسفر منه 1' - 1 - inositol - Di-myو يوجد في اركيا اخرى مثل *Methanococcus igneus* عند نموها بدرجة حرارة 85°م وكذلك يوجد في الاركيا *Pyrococcus furiosus*, *Thermotoga neapolitana* عند نموها بدرجات حرارية 98-101°م وهذا يشير الى ان المركب يعمل كمذاب متوافق وكحامي من الحرارة Thermoprotactant . وإضافة الى ذلك فان الاركيا من مجموعة Hyperthermophilic archaea تجمع المركب Cyclic diphosphoglycerol (CDPG) وهذه المركبات تثبت بعض البروتينات خارج الأنظمة الحية وتجعلها مقاومة للحرارة المرتفعة ، لذلك يعتقد ان هذه المركبات مهمة في التحمل الحراري وتساعد الاحياء في النمو تحت ظروف الاجهاد ويتوقع ان الانزيمات المسؤولة عن تخليقها تكون نشطة تحت ظروف ارتفاع الحرارة ربما بسبب وجود ظاهرة المقاومة الأصلية Built-in thermoresistance feature وهذه البروتينات يمكن ان تعد من بروتينات الاجهاد وليس من الوصيفات اذ ان تحت مثل هذه الدرجة الحرارية لم يسجل وجود الوصيفات العامة .

الحوامض الامينية ومشتقاتها

اغلب الحوامض الامينية المتجمعة كمذابات متوافقة هي من النوع β مثل الكلوتامين واللايسين وهذه تستعمل في الاركيا المولدة للميثان عند زيادة تركيز كلوريد الصوديوم خارج الخلايا وتعتمد نوعية المشتق الأميني وزيادة تركيزه على تركيز الملح خارج الخلايا . والحوامض الامينية β تذوب بشكل كبير ولا تمثل من قبل الخلايا ويكون معدل انقلابها بطيء جدا لذلك تعد من المذابات المتوافقة الحقيقية ومن امثلتها β - alanine .

وتجمع الخلايا الحوامض الامينية من نوع α وخاصة التي تكون هجينة او امفوتيرية متذبذبة مثل البرولين كموا واقية من التنافذ Osmoprotactants . ويدخل البرولين الى الخلايا بواسطة أنظمة نقل خاصة تحت بواسطة البرولين وهي ProP, ProU التي تكون معتمدة على الصوديوم . ومن التنافذات الامفوتيرية المماثلة الاخرى مشتقات المركبات الحلقية مثل Ectoine الذي يخلق داخل الخلايا المتحملة للملوحة متباينة التغذية عند ارتفاع الملوحة وهذا يوفر لها الحماية كما هو الحال مع البرولين ولا يوجد في الاركيا .

وتستعمل كل من البكتريا والاركيا الكلوتامات لدرئ تأثير ارتفاع الضغط التنافذي إضافة الى استعمالها كمعط لمجموعة الأمين لتخليق الحوامض الامينية ، وهي اما ان تنقل الى الخلايا من الوسط المحيط او تخلق داخل الخلايا . وتستعمل الخلايا الكلايسين او مشتقاته كمذابات متوافقة مثل ثلاثي مثيل الكلايسين (GB) Betain وهو مركب منتشر في الطبيعة وتستعمله البكتريا لموازنة الضغط التنافذي ويستعمل ايضا في الحيوانات والنباتات كما انه يوجد في معظم افراد الاركيا ، والمجموعة الاخيرة يمكن ان تقبضه من البيئة المحيطة بشكل فعال اذ تقوم بتخليق ناقلات خاصة له وعملية نقله يمكن ان تتلشى عند وجود حاملات البروتونات Protonophores او حاملات الايونات Ionophores . وذلك لان عملية تخليقه في الاركيا نادرة وعند تخليقه في بعض الاحيان فتنم من أكسدة الكولين الخارجي عن طريق تكوين المركب الوسطي GB aldehyde ، او عن طريق مثيلة الكلايسين .

وتجمع الخلايا مشتقات امينية مثل اوكسيد ثلاثي الامين ومركب -
Taurine و β dimethylsulfoniopropionate و γ - aminobutyrate .

تنافذيات اخرى

وتقوم خلايا الاحياء بتجميع مواد اخرى لحماية بروتيناتها غير التي ذكرت اعلاه قد تكون مشحونة لمعادلة ايون البوتاسيوم ومنها متعددات الامين العضوية ، وقد تكون هذه المركبات حلقية او غير حلقية .

تأثير الاجهاد على فسلجة الخلايا وتنظيمها

مما تقدم يتبين انه في البيئات الطبيعية يختلف نمط حياة الاحياء المجهرية اذ تتعرض الخلايا الى اطوار طويلة من المجاعات والاجهادات الاخرى والتي يمكن ان تتخللها فرص النمو التي تكون سريعة بشكل كبير .

وتتصف البيئات العامة مثل التربة او البيئة البحرية وترسباتها والمياه العذبة عادة بكونها بيئات فقيرة بالمواد الغذائية ، واغلب البكتريا تغير من فسلجتها لزيادة فرص بقائها وعيشها بواسطة الاستجابة للمجاعة (والتي سيفرد موضوع خاص بها) ، تتداخل استجابة المجاعة مع استجابات اخرى

. تقوم الخلايا بتحسس نقص المواد الغذائية بعناصر خاصة على الكروموسوم وهي Starvation stress response (SSR) يتحكم فيها SSR stimulon اذ تقوم جياته بتميز وتعديل انسياب وتدفق مواد الايض واللاعب الرئيسي في هذه العمليات هو العامل سكيما (δ -S) ويكون مسئولا عن حث المقاومة العامة لكل انواع الاجهادات التي تواجه الاحياء ، ويشفر للعامل بواسطة الجين *rpoS* وتكون تحت سيطرة هذا الجين اكثر من 50 جين ، وهو يعمل كمنفذ موجب Positive effector ولكنه في بعض الاحيان له تأثير سلبي على بعض الجينات . في *E. coli* يؤدي تخليق وتجمع العامل سكيما S الى التأثير على عمليات الانتساخ وتكوين المعقد الإنزيمي الخاصة بالعملية ، ولذلك يؤثر على عملية الترجمة وتحلل بعض البروتينات .

وهناك بعض النقاط التي يجب أخذها بنظر الاعتبار :

- السيطرة على الانتساخ يقوم بها المنظم *rpoS* بواسطة ppGpp والفوسفات المتعددة كمنظمات موجبة و CRA-cAMP كمنظم سلبي .
- للـ δ -S فعاليات يمكن ان تحور بواسطة التريهالوز والكلوتامات بحيث يؤثر على ارتباط معقد انزيم الانتساخ بالممهدات .
- السيطرة على الترجمة وفيها يقوم mRNA للـ *rpoS* بالسيطرة بواسطة تداخلات لعدة عوامل تؤثر على ثباتية التركيب الثانوي في منطقة ارتباط mRNA مع الرايبوزوم ويلعب δ -S الدور الرئيس فيها .

ارتباط δ -S بظروف الاجهاد العامة

تقوم بروتينات الاجهاد في حالات الاجهاد بإنقاذ البروتينات من عدم الطوي الصحيح للجزيئات الكبيرة منها ، وتحث هذه البروتينات في حالة الاستجابة المجاعة SSR عند نقص النتروجين والفسفور وكذلك الظروف الاخرى مثل تطرف الرقم الهيدروجيني وزيادة الضغط التناظري وغيرها . والتعبير عن استجابة المجاعة يعطي مقاومة للعديد من الظروف التي يمكن ان تشمل اجهاد الأكسدة المتمثل بوجود بيروكسيد الهيدروجين وكذلك وجود المضادات الحيوية ، ولذا فهي تزيد من ضراوة الخلايا اذ وجد ان كل من δ -S والمعقد CRA-cAMP هي من ضروريات ضراوة البكتريا *Salmonella* وإضافة الى مكانة δ -S البيئية ومسؤوليته عن تحسس الزحام ، فهو يمكن ان يضفي المقاومة في المجتمعات الميكروبية من خلال مسؤوليته عن حث تطهير الاجهاد الذي يستحث بوجود العوامل المجهدة Stress induced mutagenesis والذي يساعد في تطبيع الخلايا غير النامية والجائعة للنمو والتكاثر في البيئات غير الملائمة والذي يمثل تطهير تطبيعي Adaptive mutagenesis ، ففي الحالات الطبيعية يكون معدل الطفرات مسيطر عليه على مستوى الخلية وعلى مستوى المجموع الميكروبي والذي يساعد في المسالك التطبيعية التي تسلكها الخلايا ، فمثلا

البكتيريا في البيئات التي تتغير بسرعة ، يتم اختيار بعض الخلايا التي لها القابلية على إظهار التطفير الفائق Hypermutability ، وهذه الخلايا بعد مرورها بحالة فسلجية انتقالية تقبع فيها تحت ظروف الاجهاد تتحول الى حالة التطفر الفائق ويكون ذلك نتيجة حصول تغيرات في جينات اصلاح DNA المسؤولة عن المحافظة على سلامة وتضاعف DNA . وفي هذه الحالة يمكن ان تظهر حالتين في مجموعتين من الخلايا العالية التطفر ، الاولى هي الثابتة والتي يمكن ان تتوارث Heritable mutators ، والثانية التي تكون مؤقتة وعابرة Transient mutators وتنتج من تشجيع الظروف البيئية المحيطة التي تشجع الانظمة المولدة للأخطاء في DNA (Error - prone DNAPs) وتقليل فعاليات انظمة الاصلاح .

وعند حصول الاجهاد او المجاعة تسلك الخلايا طرق مختلفة وتتميز الى مجموعتين :

- الأغلبية العظمى من الخلايا غير النامية تبقى هاجعة وتكتسب المقاومة التي تساعد على البقاء حية ، ولذلك تكون الأغلبية العظمى في حالة انتظار لتحسن الظروف .
- الأقلية من الخلايا تدخل طريق الخطر وهو التطفر الفائق وتكون طفرات متعددة ، اغلبها مميتة والقليل منها مفيد ، وتردد الخلايا فائقة التطفر يعتمد على الظروف التي تعيشها الخلايا ففي مزارع مختبرية لـ *E. coli* يكون ترددها 10^{-5} ومعدل تحول الخلايا من غير القابلة للتطفير الى مطفرة Mutator بنسبة $10 \times 5 \times 10^{-6}$ / خلية / جيل وهذا يعتمد على الصفة المستعملة للدراسة والتحديد .

اما في الطبيعة فمثلا *E. coli* و *Sal. enterica* المرضية فيكون حصول Mutator بحدود 9 % في *E. coli* وحوالي 12 % في السالمونيلا وهذا يعني زيادة التردد بحوالي اكثر من 50 مرة عن الحالة الطبيعية ، وفي *Ps. aeruginosa* تصل النسبة الى 37 % عند المصابين بمرض التحوصل الليفى .

آلية حث التطفير بالاجهاد

ان معدل حدوث التطفر الفائق يمكن أن يحدث بـ :

- زيادة معدل الأخطاء في أنزيمات الكوثره وأخطاء هذه الأنزيمات موجودة في الحالة الطبيعية ويمكن أن تحدث عند وجود خطأ أو بدون وجود خطأ في القالب التي تعمل عليها ولكن معدل أخطائها يمكن ان يزداد بوجود الاجهادات .
- إلغاء دقة الآليات التي تحافظ على سلامة الجينوم مثل فعالية Proof-reading والتصحيحات التي يقوم بها نظام MMR (Mismatch correction) فالإلغاء فعالية MMR تؤدي الى حدوث حالات التطفر الفائق في الخلايا بمعدل حوالي 78 % .

• يساعد SOS في التطهير التطبيعي وذلك لان الطفرات التطبيعية يتم تنظيمها ببعض مكونات SOS regulon الذي كما هو معروف انه يستحث بأضرار DNA او توقف عمليات التضاعف ، فعند نمو الاحياء مثلاً مستعمرة على وسط غذائي صلب غني يتوقف نموها ، وهذا التوقف يمكن ان يحدث استجابة الاستغاثة ببروتينات غير RecA وهي التي تساعد في حدوث الطفرات التطبيعية ولكن سيطرته قد تكون سلبية او ايجابية .

ومن المعروف ان الأخطاء و حدوث الطفرات يمكن ان يزداد عند حصول استجابة الاستغاثة ، وهذه الأخطاء تحصل على الكروموسومات او البلازميدات الاقترانية على وجه الخصوص . ويؤدي (كما ذكر سابقا) الى تطور الاحياء وتطبعها مع الظروف المحيطة . ولذلك وتحت ظروف الاجهاد يمكن ملاحظة الاتي :

• تنشيط بعض الجينات الكروموسومية بالاجهاد مثل جزء من جينات الاستغاثة ، جينات تخليق بروتينات الصدمة الحرارية مثل Hsp70 وكذلك جينات الدفاع المضادة Anti restriction defense (ard) التي توجد عادة على البلازميد الاقتراني .

• تقلل او تخفض فعالية بعض الجينات مثل تلك العاملة في نظام MMR والجينات العاملة في نظام القطع والتحويل R/M .

الجينات المسيطرة على التطهير التطبيعي

يعني التطهير التطبيعي نشؤ مدى واسع من الطفرات في جينوم جزء من المجموع الكلي من الخلايا غير المنقسمة (وهي كما ذكر اعلاه أقلية تعاني من حالة التطهير الفائق) وهذه تعكس آلية محدثة تؤدي الى حصول تغيرات وراثية في أوقات الاجهاد وعدم ملائمة الظروف . والجينات التي تعمل في هذه الحالة هي :

♦ جينات *recABCD* , *ruvABC* , *recG* وتعمل معها اليات التأشب المتجانس وأنظمة اصلاح الكسور المزدوجة للأشرطة ، والبعض من هذه الجينات يستحث عند تشغيل استجابة الاستغاثة .

♦ جينات *dinB* (Pol IV) وهوانزيم كثرية كثير الأخطاء (Mutator) والذي يكون جزءا من استجابة الاستغاثة وفعاليته لا تعتمد على وظائف *mutS*, *uvrA* , *umuDC*, *recA* , *polA* , *polB* والفعالية التطهيرية له تؤدي الى إضافة قاعدة واحدة او حذف وتكون نسبة أخطاء الحذف ضعف نسبة أخطاء الإضافة .

♦ بعض جينات MMR تثبط بشكل وقتي في طور الاستقرار وتحت الاجهادات بواسطة δ -S وعوامل اخرى . فنقص نظام MMR يؤدي في العادة الى حصول طفرات

إزاحة الإطار Frame – shift ، ففي *E. coli* التي ينقصها *mutS* تكون 90 % من الطفرات هي طفرات إزاحة والقليل هي طفرات إحلال Substitution mutants . وهذا يعني ان التطفير التطبيعي يكون نتيجة لعدة أحداث متداخلة تحصل وهي :

- تأشب متكرر .
- تضاعف مطفر أي ينتج الطفرات (Mutagenic replication) .
- عمليات تصحيح ضعيفة او قد لا تكون موجودة .

معدل التطفير ألتطبيعي

ان معدل حدوث مثل هذا التطفير يكون واطناً تحت الظروف العادية وعند استعمال خلايا ذات ميزات خاصة يمكن ان توضح هذا التطفير مثل استعمال *E. coli* (lac^-) ويصل المعدل 10^{-9} / خلية / جيل ولكن عند وضعها في وسط فيه لاكتوز فان معدل حدوث التطبع يزداد الى 10^{-9} / ساعة ، وهذا يعني تحت ظروف الاجهاد يزداد معدل حدوثها الى حدود كبيرة ، كما ان المعدل يزداد وينشط عند قيام الخلايا بوظائف الاقتران وليس عملية الاقتران مثل استعمال إنزيم الثلم Nikase لتهيئة أشرطة البلازميد للنقل دون حدوث عملية الانتقال .

ويلاحظ ان هناك علاقة بين التطفير ألتطبيعي أي وجود خلايا ذات قابلية عالية على التطفر ووجود المضادات الحيوية ، فكائن واحد يمكن ان يؤدي الى سلالات مختلفة من Mutators وهذه الخلايا الناشئة يمكن ان تتغلب على الاحياء الأخرى في الأماكن التي تدخل فيها مثل الأمعاء او غيرها ، ووجد ان الخلايا غير الطبيعية يمكن ان تزيد بنسبة 800 ضعف ، ومن الواضح ان حصول الخلايا ذات القابلية العالية على إنتاج الطفرات تكون مفيدة في بداية التطبع وتختفي فاندتها بعد حصول التطبع وتصبح مؤذية للمجموع .

التطبع وتضخيمه

من المعروف ان التعقيد الوراثي يكون مرتبطاً بأحكام الى التطبع للظروف البيئية القابل للرجوع وكذلك لتطور الجينات ، ونشؤ وظائف جينية جديدة بعد تضاعف الجينات .

فتضاعف او تضخيم الجين (الذي يلاحظ تحت ظروف خاصة مثل في الاركيا التي تعيش في ظروف متطرفة وفي البكتريا *Deinococcus radiodurans* التي تقاوم جرعة هائلة من الإشعاع) يمكن ان ينشأ تلقائياً بسلسلة من عمليات التضاعف والتي تحصل إثناءها عمليات عبور غير متكافئة ، والمنطقة المضخمة او التي يتكرر وجودها على الكروموسوم سوف تبقى اذا كانت الخلايا بحاجة اليها تحت ظروف معينة ، اما اذا لم يوجد ضغط انتخابي يحافظ على بقاءها فإنها تتعزل وتزول بعد مدة ، وبصورة عامة فان عمليات التطبع العابرة او القصيرة الأمد تكون عملية تضخيم وتضاعف

الجين هي الطريقة الافضل اذ انها تكون أكثر مرونة و اقل خطورة من تغير الجينوم الدائمي حتى ولو بطفرة نقطية واحدة .

وتضاعف الجينات يتحفز بعملية التأشب المتجانس الذي يعمل على الأشرطة الجديدة المتضاعفة ، لذلك فان تنشيط استجابة الاستغاثة وتعطيل MMR يؤدي الى زيادة معدل نشؤ التضاعفات Tandem duplication فمثلا في الطفرات *E. coli* التي تعبر عن استجابة الاستغاثة باستمرار يحصل التضاعف بنسبة 10 مرات او اكثر .

اما تعطيل MMR فهو يؤدي الى تضاعف الجينات فمثلا تعطيل *mutL* , *mutS* والتي تعد منتجاتها بروتينات تميز تقوم بمنع عمليات التبادل ، وغياها يؤدي الى زيادة التضاعف . ونظام MMR يلعب دورا في إصلاح وحث التطفر وغيرها من الفعاليات وجيناته فيها موزائكية كبيرة من مختلف خطوط التطور أي ناتج من الانتقال الأفقي وخاصة *mutS* وهذه الموزائكية هي صفة مميزة لعملية التطور التطبعي التي تعمل في تحويل وتعديل معدل الطفرات والتأشب بواسطة اكتساب او فقدان وظيفته .

ان التضخم التطبعي يختفي بعد الرجوع الى الحالة الاعتيادية ومرور الخلايا بعدد من دورات النمو . وبصورة عامة ان حصول الطفرات التطبيعية وحصول حالة التطبع وتضخمها تعد طرق متوازية تؤدي الى حدوث تغاير وراثي مستحث يسمح بالتطور السريع تحت ظروف الاجهاد والهروب من حالة منع النمو .

ومن الأحداث الأخرى التي يمكن أن تؤثر بها الاجهادات :

زيادة عملية القفز بالاجهاد

كما ذكر آنفا انه تحت ظروف الاجهاد ينشط نظام استجابة الاستغاثة ويثبط MMR وهما الطريقتان الرئيسة المسؤولة عن ثباتية وتغاير المواد الوراثية . ومن جهة ثانية فان تنشيط نظام الاستغاثة وتخميند MMR يؤدي الى عملية قفز الجينات القافزة وذلك لان :

• استجابة الاستغاثة يمكن ان تحفز استئصال القافزات ، فمن المعروف مثلا ان تشجيع

E. coli يؤدي الى زيادة عملية قفز IS10 بحوالي 28 ضعف ومثل هذه الزيادة لم تلاحظ في الخلايا التي يكون فيها نظام الاستغاثة معطلا . فقفز IS10 يؤدي الى زيادة ملائمة الخلايا للبيئة المجهددة التي تحيطها وهذه تزداد عند تفعيل استجابة الاستغاثة . وعملية حث الاستئصال بالأشعة فوق البنفسجية للقافزات هي خاصة بالتطفير الذي يحصل بنظام الاستغاثة اذ تساعد في حذف المعلومات الموجودة في التواليات المحيطة بالـ IS المباشرة او المقلوبة مؤدية الى استئصاله .

• تعطيل MMR يؤدي أيضا الى زيادة عملية القفز ، فتعطيل الجينات مثل *uvrD* , *mutH* , *mutL* , *mutS* , *dam* في *E. coli* تؤدي الى استئصال القافز Tn10 بدقة من مكان ارتباطه ولوحظت هذه ايضا في البكتريا *Sal. typhimurium* ، وتزداد عملية الاستئصال بزيادة عدد الجينات المعطلة .

• وجود بروتين الصدمة الحرارية Hsp70 في *E. coli* يؤدي الى زيادة قفز Tn5 من الكروموسوم الى البلازميد الذي يستقر فيه ويمكن ان ينقله بعملية الاقتران الى خلايا اخرى .

تأثير الاجهادات على نقل البلازميدات الاقترانية

لا شك ان التنوع الوراثي للمجتمعات الميكروبية يتأثر بالبيئة واجهاداتها والنشاطات البشرية تؤثر على البيئة ويمكن ان تعجل من التغيرات الوراثية في الأنظمة البيئية . فتبادل الجينات ومن ورائها الانزيمات يمكن ان يحدث تحت ظروف بيئية واسعة الاختلاف بعيدا عن معدلات التطبع الطبيعية .

ومن المعروف ان الخلايا الموجودة ضمن مجتمعات يحصل تبادل للمعلومات الوراثية بشكل كبير خاصة اذا كانت تحت ظروف الاجهاد . ولذلك فاذا كانت الجينات المنقولة على البلازميدات او اقتنصها بالبلازميد من كروموسوم الخلية فان ذلك سيؤدي الى :

- حصول حالة التطفر الفائق في الخلايا التي استلمت الجين المنقول بواسطة البلازميد .
 - يمكن ان يدخل الجين الجديد او الغريب الى مجمع الجينات الطبيعية (وهذا ما يمكن ان يحصل في حالة استعمال الأحياء المهندسة وراثيا في البيئة التي سيتم مناقشتها فيما بعد) .
- ومن المعروف ايضا ان البلازميدات تمثل مكان مهم لعمليات التطور ، وفي حالات الاجهاد فان دخول البلازميدات الى الخلايا سيؤدي الى حالة تطفير مفرط للجين الداخل ، فقد وجد ان ادخال F' episome الى الخلايا يؤدي الى حدوث طفرات تطبع في الجينات البلازميدية بنسبة 100 مرة أكثر من الجينات الكروموسومية ، ولذلك فان الجينات المحمولة على البلازميدات تكون عالية التغير وحصول الطفرات فيها ، ومن جهة ثانية فان الجينات المحمولة على F' يمكن ان تتأشب مع الجينات المشابهة على الكروموسوم ، اما الجينات غير المتمثلة فيقوم البلازميد بإدماجها في كروموسوم الخلية ، وعليه فان العامل F' اذا اعتبر وسيلة للتطور فهذا يعني انه سيأخذ الجينات من الكروموسومات لتجري عليها عمليات التطفير وهي على العامل F' ثم يعود ليدخلها الى خلايا مضيفة جديدة .

وفي البيئات الغنية يكون انتقال البلازميدات أسرع وأكفاء وان كان يقل مع زيادة تركيز المواد الغذائية عن حدود معينة ، ويلاحظ انه في الخلايا التي هي في طور الاستقرار يقوم البلازميد F بطرد البلازميدات المشابهة بظاهرة تدعى الطرد السطحي Surface exclusion ، اذ يقوم بمنع دخول

زيادة من البلازميدات ، اما في الطور اللوغاريتمي فتكون الظاهرة اقل حدة ويسمح بنقل عدد من البلازميدات الى الخلايا التي هي ليست في حالة نمو . ولذا يمكن المحافظة على ثباتية البلازميدات بواسطة القافزات التي تعيد ترتيب الجينوم تحت ظروف المجاعة .

تلاشي الحواجز الوراثية تحت ظروف الاجهاد

ان الاجهادات تؤدي الى اختلاط الأنواع والسلالات والتي تكون مفيدة او ضارة في بعض الاحيان اعتمادا على التوجه الذي ستعمل فيه الأحياء .

ففي الخلايا الطبيعية تعد انظمة R/M الخط الدفاعي الأول أمام الجينات الغريبة ، فتتسبب فيها إنزيمات القطع الداخلية وتقوم بتقطيع البلازميدات وقطع DNA الغريبة ما لم تكون محورة بما فيه الكفاية للهروب من تأثير هذه الانزيمات .

ومن جهة ثانية تنتج بعض البلازميدات الاقترانية بروتينات تثبط هذه الانزيمات وتسمى Ard بواسطة الجينات *ardA* , *ardB* , *ardC* (المذكورة سابقا) ، وهي تثبط انزيمات النظام R/M التي تشفر لها بجينات كروموسومية ولكن البروتينات لا تثبط انزيمات القطع من الصنف الثاني والثالث التي يشفر لها بالبلازميدات . والبروتينات المضادة *ArdA* , *ArdB* المنتجة من قبل البلازميد pKM101 يمكن السيطرة عليها في المراحل الأولى من عملية التزاوج وكذلك بواسطة استجابة الاستغاثة ، اذ ان ممهدات هذه الجينات تحوي على SOS box الذي يرتبط بالبروتين الكابح LexA .

اما تحت ظروف الاجهاد فتخفف البكتيريا من فعالية R/M اذ يحصل تعطيل مؤقت خاصة بالصدمة الحرارية إضافة الى غيرها من الظروف ولذلك يلاحظ ان الخلايا المجهدة يزداد نمو العاثيات فيها الى $10^3 - 10^4$ (خاصة عند حصول استجابة الاستغاثة) وكذلك تزداد قابلية انتقال البلازميدات الى 4 أضعاف دون حصول تغير في موادها الوراثية ، وتخفيف فعالية R/M يكون عادة وقتي وأني . اما الخط الدفاعي الثاني فهو نظام MMR ويشكل حاجزا أمام انتقال جينات الكروموسوم بين الانواع ويحافظ على هويتها الوراثية ، اذ يمنع تأشب وتبادل قطع DNA التي تكون توالياتها بعيدة ، فبروتيناته *mutL* , *mutS* ترتبط الى المناطق غير المتماثلة من المزدوجات المتباينة Heteroduplexes المتكونة من أشرطة بعيدة الأصول ويمنع حدوث التأشب المتجانس ، وبما ان الاجهاد يؤدي الى تعطيل مؤقت للـ MMR فان ذلك يؤدي الى حدوث تبادل في الاشرطة والمواد النووية بين الأنواع .

ويمكن ان تزداد عملية انتقال الجينات وتبادلها بين الأنواع بزيادة استجابة الاستغاثة ، لذلك فان الاستجابة القوية التي تحدث في جزء من المزروع والتي تكون عادة محبطة من حيث فعالية MMR

فان التبادل يتخطى الحواجز كما في خلط مزارع من *E. coli* و *Sal. enterica* ووضعها تحت ظروف اجهاد .

الرجوع عن حالة التطفر الفائق والاجهاد

مما تقدم تبين ان الجينات المطفرة تنتشر بسرعة مؤدية الى زيادة معدل الطفرات سامحة للأحياء بالتطور السريع وكما ذكر ان اغلب الطفرات تكون مؤذية ، وذلك لان هذه الطفرات تكون قد نشأت في خلية حاوية على جين نظير مفيد ، ولكن في مجتمع لا جنسي مثل البكتريا يمكن للجين الطافر ان ينتقل بسرعة كبيرة . والتوقع النظري انه في البيئات سريعة التغير يكون التطور السريع بواسطة الجينات Mutator genes هو الأفضل على الرغم من مساوئه على مستوى الخلية الواحدة ، ولكنه يؤدي الى تلاؤم الفرد وبالتالي المجتمع للظروف غير الملائمة ، ولهذا فالخلايا تحاول الموازنة بعد انتهاء الإجهاد بين الإبقاء على الجينات الطافرة ، فالجينات التي تزيد من معدل الطفرات بـ 1000 مرة والتي تساعد في تطبع الخلايا بسرعة لا تبقى في الخلايا او تصحح ، اما الجينات التي تؤدي الى زيادة معدل الطفرات بحدود 10 – 100 مرة يمكن للمجموع الاحتفاظ بها . ومثلما ذكر أنفا انه بعد التطبع او رجوع الظروف البيئية الى الوضع الاعتيادي لا تعود هناك حاجة لوجود Mutators وذلك لان وجودها واستمرارها في إنتاج الطفرات يعد خطرا على المجموع .

ويمكن ان تعود الخلايا الى طبيعتها بطرق مختلفة :

- اذا كانت الحالة مؤقتة وغير قابلة للتوارث يكون باستعادة فعالية MMR الذي كان قد توقف مؤقتا بواسطة الاجهاد البيئي وتعود الخلايا الى طبيعتها بعودة النمو الطبيعي .
- اما اذا كانت حالة التطفر الفائق هي حالة موروثية وثابتة نوعا ما فيكون استبدال الجين المسبب للتطفر العالي بجين طبيعي بعملية التآشب وهي تكون محكومة بالصدفة والاحتمالية .

دراسة لبعض انواع الاجهادات

سيتم مناقشة بعض انواع الاجهادات التي تستجيب لها الخلايا بشكل عام ، اما الباقي من اجهادات والتي تكون متخصصة جدا فستترك الى المواضيع التي تعد عنوانا لها مثل معالجة الإشعاع وغيرها من العوامل ، كما ان العديد من الاستجابات تكون متداخلة بشكل كبير .

الاستجابة لاجهاد المجاعة Stringent response

تكاد تتفق استجابات الخلايا المختلفة للمجاعة SR في انها تؤدي الى تقليل معدل النمو الى حد واطئ جدا وقد يصل الى الصفر في بعض البيئات الفقيرة بالمواد الغذائية مثل بعض المناطق البحرية .

ويمكن لاستجابة المجاعة ان تحفز مكونات او مسارات عاملة تحت ظروف اجهاد اخرى مثل تداخلها مع الاجهاد التاكسدي وغيره .

فخلايا البكتريا في البيئات الفقيرة مثل البيئات البحرية او المياه الاخرى وعند تعرضها لشحة في المواد الغذائية يموت معظم أفراد المجتمع ، ولكن جزء من خلايا المجتمع تنقسم بسرعة مكونة البكتريا الصغيرة جدا *Ultramicrobacteria* ، فالبكتريا البحرية التي تكون في المناطق السطحية حيث توفر المواد الغذائية والأوكسجين تكون بحجم طبيعي ولكن في الطبقات السفلى توجد البكتريا الصغيرة جدا السابتة . وفي المزارع العادية فان ما يتبقى من المزارع يصل الى 0.3 % بعد دخول المزرعة حالة المجاعة لمدة 70 اسبوع . ويمكن ان تستحث استجابة المجاعة عند تعريض الخلايا للمواد القاتلة او المضادات الحيوية التي تؤدي الى خفض معدل النمو وتغير نمط التعبير الجيني ، فمثلا عند تعريض *E. coli* الى قلة المواد الغذائية او تعريضها لمواد قاتلة فان هذا يؤدي الى التغيرات المذكورة والتي تكون أساسية لبقاء الخلايا حية لمدة طويلة ، واغلب العمليات يتوسطها العامل سيكما ، وتعاني خلايا *E. coli* من الموت المبرمج للخلايا والذي يمثل آلية انتحار مبرمج ويبقى جزءا من المزروع بشكل خلايا مثابرة (التي مر ذكرها) وهي الخلايا التي أصيب فيها مسار الموت المبرمج بتلف وتستمر بالعيش باستعمال المواد الغذائية الآتية من تحلل الخلايا الميتة ، ومن هذا يظهر ان هناك علاقة وثيقة بين استجابة المجاعة والمقاومة للمواد المضادة وكذلك الاجهاد التنافذي .

وتتشابه البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والخمائر في آلية الاستجابة للجوع او المخصصة واغلبها يكون على مستوى الترجمة للحوامض الامينية ، فعند نقص الحوامض الامينية يصادف الرايبوزوم جزيئات من tRNA غير محملة بالحوامض الامينية تدخل الى الموقع A site على الرايبوزوم وعندها سيتوقف الرايبوزوم ويتحفز الجين *relA* الذي ينتج عامل المجاعة بروتين *relA* وهو - 3' GTP : ATP (*ppGpp synthetase*) الذي يقوم بفسفرة نيوكليوتيدات الكوانين لإعطاء *(p)ppGpp* و *(p)ppGpp* (*tetraphosphoguanosine - 3',5'*) ويرتبط عامل المجاعة الأخير *(p)ppGpp* او ما يسمى بالمنذرات *Alarmons* الى الانزيم RNAP ليوقف عمليات انتساخ الاوبرونات *rrn operons* الخاصة بتخليق rRNA وكذلك يوقف انتساخ جينات البروتينات الرايبوزومية ، وهذا التوقف يوفر للخلايا الطاقة المكلفة وطلائع المواد المستخدمة في تخليق الرايبوزومات في الوقت الذي أصبحت الرايبوزومات الموجودة أصلا قد تم الاستغناء عنها لأنه لا توجد حوامض الامينية .

والاجهاد التاكسدي يحدث تكوين *ppGpp* وكذلك التعرض للحرارة وهذا يعني ان مركبات الأوكسجين الفعالة يمكن ان تطلق عامل المجاعة .

ومن جهة ثانية وجد انه في البكتريا *B. subtilis* تكون استجابة المجاعة ضرورية لمقاومة المضادات الحيوية الذاتية التي تنتجها ، وما لم تخفف هذه الاستجابة فان الخلايا ستستمر في مقاومة المضادات ولا تعاني من التحلل ولكن ينخفض نموها الى معدلات واطئة جدا ، ويلاحظ في هذه البكتريا ان البروتين *relA* يحدث عملية التبروغ عند نقص المواد الغذائية ، ويعتقد ان الجين *SpoOA* وهو الجين الأول في عملية التبروغ يكون مسئولاً عن تكوين *ppApp* ، *(p)ppApp* .

والمقاومة للمضادات في الخلايا الجائعة يعتقد انها ناتجة من الألفة العالية لارتباط *(p)ppGpp* الى الرايبوزومات والتي يمكن ان تمنع تأثير المضادات المؤثرة عليها مثل *Aminoglycoside* ، كما ان تراكم هذه النيوكلو تيدات يؤدي الى تباطؤ وتكاسل الرايبوزومات وبذلك تكون قليلة التأثير .

الإجهاد التأكسدي : Oxidative stress :

يمكن ان يعرف على انه زيادة المواد المؤكسدة في الخلية وحولها ، والتي تؤدي الى أضرار في التراكيب الخلوية مثل تدمير DNA و RNA والبروتينات . ويكون في الاحياء الراقية سببا في العديد من الأمراض مثل *Rheumatoid arthritis* , *Inflammatory bowel disorders* وتصلب الشرايين والأمراض العصبية التحليلية وبعض انواع السرطان والهرم والالتهابات والسكري ويساعد في التعجيل من استماتة الخلايا ، كم انه يعد احد الأسباب المهمة للتطفر وتوليد الأورام . وفي البكتريا يؤثر او يمنع الانجذاب الكيماوي للمواد الغذائية وغيرها من الحالات التي هي ليست في صالح الخلية .

ويحصل الاجهاد التأكسدي عندما تكون درجته اكبر من دفاعات الانظمة الخلوية ، ويمكن ان تحصل الزيادة فيه عند التعرض لظروف بيئية او غذائية او حالة مرضية ، إضافة الى الأسباب الداخلية للخلايا .

مصادر المؤكسدة المسببة للإجهاد :

هناك عددا من المصادر التي تنتج مركبات الأوكسجين الفعالة ROS ، ونظرا لطبيعة تركيب جزيئة الأوكسجين ، فذرة الأوكسجين تحوي على زوج من الالكترونات غير المزدوجة في غلافها الخارجي وهو بشكله الجزيئي يكون خاملا ، ويمكن ان يكتسب عدد من الالكترونات وتكون جذوره هي الفعالة ، والأخيرة لها مصادر متعددة :

- المصادر الإنزيمية : تنتج كنواتج عرضية لعمليات الايض الهوائي ، ومصادر تفاعلات انزيمية مثل :

1 - عمليات الأكسدة بواسطة إنزيمات نزع الهيدروجين للـ NADH واللاكتات ومركبات

اخرى وهذه مهمة في توليد O_2^- في *E. coli* .

2 - تفاعلات الإنزيم الذائب في الخلية Glutathione reductase الذي يستعمل NADH مصدرا للإلكترونات .

3 - تفاعلات Cytochrome P450 اذ توجد منه بعض الانواع من البكتريا وكذلك يكون مصدرا مهما في أنسجة اللبائن وخاصة الكبد اذ يشكل 4 % من بروتينات الخلية الكلي .

• المصادر اللانزيمية : وهذه تنتج من عمليات أكسدة ذاتية لبعض مكونات الخلية وتؤدي الى إنتاج Superoxide (O_2^-) ومنها Ubiquinols, Catechols, Thiols, Flavins .

مركبات الأوكسجين الفعالة (ROS) Reactive oxygen species

هناك عددا من مركبات الاوكسجين التي تسبب الاجهاد التاكسدي ومنها :

Superoxide (O_2^-)

وينتج من الأكسدة الانزيمية لبعض المركبات الموجودة في الخلية - المذكورة اعلاه - فمركبات الكوينون المحبة للإلكترونات سواء كانت خلوية طبيعية مثل Ubiquinone او خارجية تختزل الى مركبات وسطية Semiquinones وتقوم الاخيرة باختزال الاوكسجين الجزيئي الى Superoxide (O_2^-) وانتاج Oxidized quinones, والاخيرة يمكن ان تعاني من عدة دورات من الأكسدة والاختزال . ويقوم الايون O_2^- باكسدة مجاميع الثايول والاسكوربات والتوكوفيرولات و Tocopherols و Catecholamines وكذلك يهاجم البروتينات الحاوية على عناقيد الحديد والكبريت $(Fe - S)_4$ ، وكذلك يتفاعل مع العناصر الانتقالية مثل ايونات الحديد والنحاس حتى عندما تكون في مركبات معقدة .

جذر $OH\cdot$

وتنتج من عدة مركبات عند امتصاص الضوء بطول موجي 365 نانومتر من قبل ثملالات التريبتوفان ، وكذلك في التحلل الإشعاعي Radiolysis للماء إضافة الى العديد من المركبات الفعالة الاخرى ، وتنتج ايضا من تفاعل بيروكسيد الهيدروجين مع الحديد المختزل .

وجذر الهيدروكسيل له تفاعلات مختلفة داخل الخلايا ، اذ انه يتفاعل مع أكثر من جزئية حيوية وذلك لان جهد الأكسدة والاختزال القياسي له عالي (2.3 فولت) مقارنة بالأوكسجين (0.8 فولت) ، لذلك فهو يؤكسد معظم الجزيئات والمركبات ما عدا الأوزون ، ولكن قابلية انتشاره قليلة وتصل عدد قليل من النانومترات لذلك فان تأثيره على الجزيئات الحيوية يعتمد على مكان وجوده ويكاد يكون موضعيا .

$^1O_2$

يمكن ان ينتج داخل الأنظمة الحية بتأثير بعض الانزيمات مثل تفكيك O_2^- ، وكذلك من تفكيك GS00 $\cdot$ (Peroxidized glutathione) وكذلك من تفاعلات المركبات المتحسسة للضوء مثل

الرايبوفلافين وصبغات الصفراء . وينتج خارج الأنظمة الحية من تفاعلات المثيلين الزرقاء المتحسسة Photosensitizer methylene blue مع الضوء المرئي . والمركب $^1O_2$ يتفاعل مع الحوامض الدهنية غير المشبعة وكذلك مع التوكوفيرولات لينتج Tocopherol radicals ، كما انه يتفاعل مع الهستيدين والتربتوفان . وهناك العديد من المركبات المتحسسة Sensitizers التي تنتج الاوكسجين الأحادي مطمورة في الاغشية الخلوية مما يؤدي الى زيادة قابلية المركب على بدأ عملية أكسدة الدهون Lipid peroxidation وأكثر التفاعلات التي يشارك فيها $^1O_2$ هو إضافته الى الأواصر المقترنة وتكون نواتج التفاعلات هي البيروكسيدات .

بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2

يتفاعل المركب مع الجزيئات العضوية (Keto acids) وكذلك يهاجم مجاميع الثايول في البروتينات وكذلك الكلوتاتايون المختزل . كما يهاجم الايونات المختزلة من النحاس (Cu^{+}) والحديد (Fe^{++}) لإنتاج جذور الهيدروكسيل $OH^{\cdot}$.

الاوزون O_3

ويعد من ملوثات الهواء العامة وينتج من عمليات التفاعل الضوئي لأكاسيد النتروجين مثل NO_2 والهيدروكربونات . ويتحلل الى $HOO^{\cdot}$, $HO^{\cdot}$ في الماء النقي ويتفاعل مع المركبات الحاوية على الأواصر المزدوجة Dienes والامينات ومجاميع الثايول مكونا البيروكسيدات الحلقية (Ozonides) . ويكون بيروكسيد الهيدروجين والالدهايدات او كلاهما معا عند تفاعله مع الحوامض الدهنية Polyunsaturated fatty acids . ويقوم بأكسدة مجاميع الثايول في البروتينات والمركبات ذات الوزن الجزيئي الواطئ .

وهناك بعض مركبات الأوكسجين التي يمكن ان تتفاعل مع ايون الحديدك مؤدية الى توليد مركبات مثل $Perferryl [2Fe^{+2}O_2]$ وهو مركب غير قادر على التفاعل مع الجزيئات الحيوية ولكنه يعاني العديد من التفاعلات تؤدي الى إنتاج Ferryl radical الذي يكون غنيا بالالكترونات ويمكن ان يؤدي الى أكسدة الدهون .

تأثيرات إجهاد الأكسدة :

يؤثر الإجهاد التاكسدي او إجهاد الأكسدة على العديد من مكونات الخلية ومنها :

♦ **التأثير على الأغشية الخلوية :** وهي من الأهداف التي تتأثر بشكل كبير بالإجهاد التاكسدي الذي يطول الدهون والبروتينات الموجودة فيها . ويكون تأثير الإجهاد على الدهون بخطوات منها :

البدء .

تضخيم المركبات الناتجة .

الانتهاء .

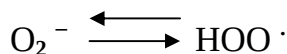
وتتكون اثناء هذه المراحل من الأكسدة المركبات O_3 ، $HO\cdot$ ، $HOO\cdot$ ، $^1O_2$ ، وجذور Perferryl . ومن المرجح ان تفاعلات أكسدة الدهون تبدأ بعد فصل الهيدروجين من الحامض الدهني غير المشبع لتكوين جذر الدهن $L\cdot$ (Lipid radical) ويستمر التفاعل عندما يهاجم الجذر الأخير حوامض دهنية غير مشبعة أخرى لانتزاع ذرة هيدروجين لتكوين مركب Fatty acid hydroperoxide (ROOH) والهيدروبيروكسيدات الناتجة ستعاني من :

❖ تكسر بواسطة الحرارة بوجود O_2 .

❖ اختزال بواسطة المعادن الانتقالية لتكوين بيروكسيد الدهن $LOO\cdot$ او Lipid alkoxy radical ($LO\cdot$) .

وكل من $LOO\cdot$ و $LO\cdot$ يمكن ان تبدأ دورة جديدة من أكسدة الدهون . كما ان من المحتمل ان NADH سوف يعطي إلكترون للهيدروبيروكسيدات لإنتاج جذر الدهن وماء . اما $LO\cdot$ يمكن ان يعاني انفلاق للأواصر $C - C$ لتكوين الديهايدات Unsaturated fatty acid aldehydes وجذور الالكيل ، وهذا يعني ان نواتج التحلل تكون اقصر من الحوامض الدهنية . اضافة الى تكوين Fatty acyl chains التي هي اقصر من الحوامض الدهنية ، ومنها الالكينات Alkanes و Epoxides والكتونات والديهايدات . وسلاسل الحوامض الدهنية عندما تقصر او تكتسب شحنة تتغير قابليتها على الدوران في الغشاء مما يؤدي الى جعل الغشاء أكثر ميوعة والذي بدوره يؤدي الى تخريب وحدة الغشاء التركيبية .

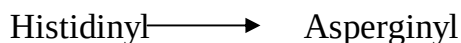
ان سلامة الوحدة التركيبية للغشاء تكون لازمة لنقل المواد الغذائية وفعالية F_1/F_0 ATPases والحركة وتؤثر في اضطراب التنافذية . وعند اضطراب وحدة الغشاء التركيبية سيؤدي الى هبوط تدرج البروتونات والفرق بالجهد الكهربائي عبر الأغشية ويحصل التفاعل



وعند الاضطراب يحصل انحراف نحو اليمين في هذا التوازن والذي يؤدي الى زيادة التدمير التاكسدي .

والخطر الآخر من أكسدة الدهون هو ان المركبات الوسطية والنهائية تكون مواد مطفرة ، اذ تتفاعل مع DNA مؤدية الى الكلة Alkylating القواعد النيتروجينية او تكوين روابط عرضية بين أشرطة DNA نفسها او بين الأشرطة المتقابلة ، كما ان المركبات الناتجة تتفاعل وتؤدي الى تثبيط البروتينات .

◊ **التأثير على بروتينات الخلايا** : تتفاعل جذور الاوكسجين مع البروتينات مؤدية الى عملية Carbonylation للحوامض الامينية مثل البرولين والارجينين وكذلك تحول بعض المركبات الى مركبات اخرى مثل



اما الحوامض الامينية الحاوية على الكبريت مثل الميثايونين والسستينين فتتأكسد مجاميع الكبريت ويتكون Methionine sulfoxide وتكوين أواصر ثنائية الكبريتيد في حالة السستينين . وهذه التغيرات تؤدي الى تغير الانزيمات والتي عادة تثبط ويمكن ان تقود التغيرات الى تفكيكها . كما ان هناك بعض الانزيمات الحاوية على عناقيد الكبريت والحديد $(\text{Fe} - \text{S})_4$ والتي تكون اهدافا لعوامل الاكسدة ، اضافة الى ان بعض البروتينات اللانزيمية يمكن ان تتأثر مثل بروتينات الوحدات الرايبوزومية الكبيرة مثل L12 وغيره . والتأثيرات تؤدي الى عدم ثباتية البروتينات للحرارة مؤدية الى فك طوبها وتكتلها ولذلك يكون الاجهاد التاكسدي محفزا لإنتاج بروتينات الصدمة الحرارية .

◊ **التأثير على المواد الوراثية** : تؤثر جذور الاوكسجين على المواد الوراثية بشكل مباشر او غير مباشر :

- **التأثيرات المباشرة** : تقوم الجذور بمهاجمة كل مكونات DNA مؤدية الى انتاج العديد من المركبات مثل فصل القواعد الموجودة في الأشرطة وإنتاج اليوريا و - 8 Hydroxy methyl urea , hydroxyguanine Thymine و مركبات مفتوحة الحلقة ومركبات حلقة مشبعة وغيرها .

فجذور الهيدروكسيل $\text{HO}^\bullet$ تهاجم الجزء السكري في DNA مؤدية الى تجزئة السكر وإنتاج كسور في الشريط . اما الثايمين فيمكن ان تضاف له مجموعة الهيدروكسيل ليكون - 5 hydroxyl methyl uracil او يتفكك بالأكسدة لينتج Thymine glycol واليوريا . اما الكوانوزين فيمكن ان يتعرض للأكسدة الضوئية ليعطي المركب - 8 hydroxyguanosine .

- **التأثيرات غير المباشرة** : تحدث بواسطة المركبات الوسطية وهي الجذور العضوية الناتجة من أكسدة الدهون ويمكن ان تهاجم البيورينات مؤدية الى تفكيكها . او يضاف الجذر الحر للحامض الدهني الى القاعدة البيورينية مكونا Bulk adduct . كما ان بعض المركبات مثل Linoleic acid hydroperoxide يؤدي الى فلق أشرطة DNA في المناطق المجاورة للكواندين .

وبيروكسيدات الدهون الناتجة من أكسدة الدهون يمكن ان تتحلل الى مركبات غير جذرية ثابتة تحوي العديد من مجاميع الأوكسجين الفعالة مثل , Alkanes , Epoxides , Alkenes ومجاميع البيروكسي والالديهيدات ومجاميع الهيدروكسي والكاربوكسي ، البعض منها يتفاعل مع DNA مؤدية الى ألكلة القواعد او تكوين ارتباطات عرضية داخل الشريط الواحد او بين الأشرطة .

وعمليات كسر الأشرطة يمكن ان تؤدي الى غلق عمليات التضاعف وربما موت الخلايا ، في حين ان الإصابات الأخرى التي لا توقف عمليات التضاعف قد لا تكون مميتة ولكن تؤدي الى التطفير فمثلا Thymine glycol يؤدي الى إيقاف التضاعف ولكنه يتحلل الى مركبات أخرى مثل اليوريا و Formyl pyruvyl urea وغيرها من المركبات الأخرى . اما بيروكسيد الهيدروجين فيسبب كسر الأشرطة وعند كسر شريط واحد يقوم بحث استجابة الاستغاثة SOS .

مواجهة الإجهاد التأكسدي :

تستجيب الخلايا للإجهاد التأكسدي بطريقتين

- التأثير المانع وهو منع التدمير الذي يمكن ان يحصل من الاجهاد التأكسدي او التقليل من التفاعلات المدمرة مثل أكسدة الدهون وبذلك يعد نظام دفاعي وقائي Prophylactic defense system .
 - التأثير الإصلاحى ويشمل إصلاح عطوب الاجهاد الناتجة من الجزيئات التي تعبر الحد الاول .
- وتوجد بعض الانزيمات يمكن ان تعمل في الحالتين مثل Alky hydroxyperoxide reductase .

ونظرا لإمكانية شيوع الاجهاد التأكسدي وضرره الكبير على الخلايا فقد طورت الخلايا أنظمة مختلفة لمواجهة التدمير التأكسدي ، ولو ان بعض الأضرار لا تكون مميتة ولكنها في جميع الأحوال تكون مهددة للطاقة وذلك لان الجزيئات المدمرة اما ان تصلح او تفكك وتستبدل وفي الحالتين يكون هناك هدرا للطاقة ، فمثلا تعريض *E. coli* الى جرعة مميتة من بيروكسيد الهيدروجين يؤدي الى جعل 40 % من البروتينات الخلوية مستحثة تحت هذا الاجهاد . لذلك تواجه الخلايا هذه الأوضاع بعدة طرق فمثلا في البكتريا هناك عددا من الجينات العامة ومنها على سبيل المثال لا الحصر *apaH* (AppppN) و *KsgA* ، ويشفر لمثيلة rRNA (rRNA methylase 16S) و *xthA* (Exonuclease III) و *dam* (DNA adenine) و *gyr* (DNA gyrase) و *topA* (DNA topoisomerase) .

(Topoisomerase I) اضافة الى وجود جينات اخرى غير معروفة الوظيفة ولكن إعطابها يؤدي الى جعل الخلايا حساسة للإجهاد التأكسدي .

ومثل هذه الدفاعات موجودة في احياء تمتد من الاحياء المجهرية الى اللبائن والإنسان ومواجهة الخلايا تسفر اما عن انتاج إنزيمات تعمل في مجال الاكسدة والاختزال او إنتاج جزيئات صغيرة للمساعدة او عوامل انتساخ تساعد في انتساخ البروتينات اللازمة مثل الوصيفات . ومن جهة ثانية توجد بعض البروتينات لا تتأثر بجذور الاوكسجين وتعمل هذه في تنظيم البروتينات المستعملة لدرئ تأثير الأكسدة .

دفاع الخلايا ضد أكسدة دهونها

تدافع الخلايا بطرق بسيطة او معقدة ضد أكسدة الدهون . فدرجة أكسدة الحوامض الدهنية تتناسب مع عدد الأواصر غير المشبعة $C=C$. فالبكتريا عادة تحوي على حوامض دهنية أحادية التشبع Monosaturated fatty acids ولكن مع هذا فهي ليست محصنة ضد خطر أكسدة دهونها المدمر ، فخلايا *E. coli* النامية على حامض الاولييك الذي يحوي على اصرة غير مشبعة واحدة تكون حساسة للقتل بالأكسدة مقارنة بالخلايا النامية على حوامض دهنية مشبعة .

ومن العوامل الاخرى التي تزيد من الحوامض الدهنية غير المشبعة تعرض الخلايا لتراكيز عالية من الكحول ، وتستطيع الخلايا إصلاح التدمير خاصة عندما تكون العوامل المؤكسدة بتركيز واطنة ، وتقوم الانظمة المسؤولة عن المعالجة باختزالها وتكون عمليات الاصلاح مستحثة .

اصلاح البروتينات

عمليات إصلاح البروتينات تكون محددة وتكاد تقتصر على اختزال الجسور الكبريتيدية المزدوجة ومعالجة Methionine sulfoxide الناتج ، وتتم عمليات الإصلاح باستعمال مركبات Thioredoxin وانزيم Thioredoxin reductase الذي يعمل في مسار يعتمد على $NADH$. وفي بعض البكتريا مثل *E. coli* توجد بعض البروتينات التي تقوم بتفكيك البروتينات المؤكسدة بشكل غير معتمد على ATP ولا يشبه التفكيك الحاصل بواسطة البروتيز Lon الموجود في استجابات اخرى مثل الاستجابة الحرارية .

وهذه العمليات تمنع تراكم البروتينات المتضررة في الخلية وربما تؤدي الى إعادة دورة تخليق الحوامض الامينية .

مشاركة المركبات الخاصة في مواجهة التدمير التأكسدي : في الخلايا المتعرضة للاجهاد التأكسدي تتجمع بعض المواد كأحد الآليات المساعدة في رفع الضرر عن الخلايا ومنها :

• تجمع نيوكلوتيدات غير طبيعية مثل $AppppN$ و $AppppN$ في الخلايا المجهدة نتيجة

لعدم نشاط الانزيم Dinucleotide tetraphosphate hydrolase الذي يشفر له بالجين

apaH وهذه ليست منذرات لبدء الاجهاد لأنها تحدث بعد تخليق بروتينات الصدمة الحرارية . كما ان الجين المسئول عن انزيم تفكيكها محمول على البلازميد $apaH^+$ فعند وجوده لا تخلق هذه النيوكليوتيدات ، ولكن يعتقد ان وجودها يحور الاستجابة الحرارية والتأكسدية ربما بتأثيرها على البروتين DnaK وتستطيع هذه النيوكليوتيدات الارتباط بعدد من البروتينات مثل GroEL وغيرها .

• ومن التفاعلات اللانزيمية ايضا ان الخلايا تكون بعض المركبات المضادة للأكسدة مثل الكلوتاثايون (GSH) ، Menaquinone ، Ubiquinone ، Glutaredoxin ، Thioredoxin والاخير يمكن ان يعوض نقص GSH .

اشترك الإنزيمات والبروتينات في عمليات الدفاع والإصلاح ضد الاجهاد التأكسدي

لمواجهة الإجهاد التأكسدي تنتج الخلايا عددا من الانزيمات او البروتينات مثل الوصيفات إضافة الى بعض العوامل المساعدة التي تحفز الانزيمات او الانظمة العاملة في الإصلاح لتعمل بشكل شبكة على كل الأجزاء المتضررة من الخلية .

العوامل : ومنها عوامل الانتساخ فمثلا في *E. coli* فان عامل الانتساخ OxyR لا يتأثر بجذور الأوكسجين او مركباته الفعالة وانما ينشط بوجود البيروكسيدات ويحث الاستجابة للاجهاد التأكسدي .

الانزيمات : وهي التي تنشط عند تعرض الخلايا لإجهاد الأكسدة مثل PTP 1B (Protein tyrosine phosphatase 1 B) وكذلك (Tumor suppressor phosphatase) الذي ينشط بشكل وقي عند الاجهاد التأكسدي ، وهذه تساهم من خلال مجاميع الثايول الحساسة للأكسدة التي تحملها على ثملات السستئين والتي تتعرض نتيجة أكسدتها الى تغيرات شكلية قابلة للرجوع .

انزيمات نزع الهيدروجين وتشارك هذه الانزيمات بشكل مباشر او غير مباشر . فكل من O_2^- وبيروكسيد الهيدروجين تحت تفاعلات إنزيم نزع الهيدروجين NADH (Diaphorase) ولذلك يكون تركيز الاخير قليل في الخلايا المجهدة بالأكسدة لمنع اختزال ايون الحديدك Fe^{3+} الى الحديدوز Fe^{2+} وتكون التراكيز العالية من NADH مضره بالخلايا المجهدة خاصة عند تعرضها لبيروكسيد الهيدروجين .

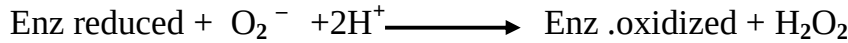
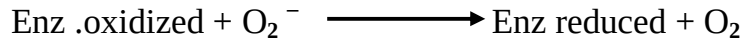
كما ان الانزيم النازع للهيدروجين يمكن ان يقوم بنقل الالكترونات الى Ubiquinone الذي يختزل ويكون اختزاله مرافقا لتكوين فروق في الأرقام الهيدروجينية ΔpH وفروق في الجهد الكهربائي $\Delta \psi$ على جانبي الأغشية الخلوية والتي يمكن ان تفقد أثناء الاجهاد التأكسدي .

وتقوم الخلايا بتقليل مستويات التنفس وبذلك يقل معدل انسياب الالكترونات في السلاسل التنفسية التي تكون مصدرا للـ O_2^- .

اما الانزيم Glucose dehydrogenase فيكون مهما للخلايا لغرض تزويدها بـ NAD(P)H ويكون مفيدا لها تحت ظروف إجهاد الأكسدة لانه يكون مصدرا للالكترونات لكل من إنزيم Thioredoxin reductase والانزيم Glutathione reductase اضافة الى ان اصلاح عطب Methionine sulfoxide المذكور اعلاه بواسطة الانزيم Methionine sulfoxide reductase الذي يحتاج الى NAD(P)H . كما ان NAD(P)H لا يختزل ايونات الحديدك كما يفعل NADH ، وبذلك يكون إنتاج NAD(P)H بمثابة مصدرا يزود الخلايا بالمكافئات المختزلة والتي بدونها تتجه الخلايا لإنتاج $HO^{\cdot}$ المضرة لها .

ومن الانزيمات الاخرى المهمة ضد الإجهاد التاكسدي والتي تعمل بشكل مباشر في البكتريا او غيرها من الاحياء هي Superoxide dismutase بنوعيه SOD A , SOD B والكاتيليز مثل Kat E , Kat G وإنزيم تخليق الكلوتاثايون Glutathione synthetase (*gshAB*) و Glutathione reductase (*gor*) وانزيم Peroxidase .

وفي البكتريا يوجد SOD المعتمد على NADH وينتج بيروكسيد الهيدروجين :



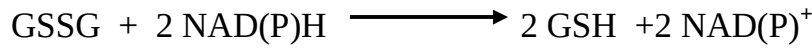
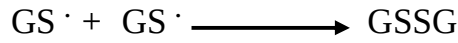
وتحتوي مجموعة انزيمات SOD على المعادن الانتقالية التي تساعد في نقل الالكترونات ومنها MnSOD الذي ينتشر في الخلايا حقيقية النواة ، FeSOD الموجود في الخلايا بدائية النواة و CuZnSOD يوجد في الخمائر وغيرها وعادة لا يوجد في البكتريا . وبما ان نواتج تفاعلات SOD هي بيروكسيد الهيدروجين وهو من المركبات الفعالة لذا لا يكون مفيدا للخلايا الا اذا كان

- O_2^- اكثر سمية من البيروكسيد للخلايا .
- البيروكسيد يتفكك بسرعة .
- يمكن ان يقوم SOD بتوجيه O_2^- الى إنتاج بيروكسيد الهيدروجين وهو افضل من المسار الأكثر سمية وهو إنتاج جذور الكلوتاثايون $GS^{\cdot}$.
- ولكن البيروكسيد الناتج يفكك بسرعة بانزيمات الكاتيليز التي تكون مرافقة للإنزيم SOD .
- وتفاعلات الكاتيليز من النوع المنتج للحرارة Exothermic ولا يحتاج الى ATP لذلك فانه يوفر الحماية للخلايا التي هي في حالة نقص للطاقة .

في *E. coli* توجد مواقع مختلفة لانزيمات الكاتيليز ، الأول يقع في الفسحة المحيطة والثاني في الساييتوبلازم وهذا يشير الى وجود مواقع مختلفة لإنتاج بيروكسيد الهيدروجين اثناء الاجهادات سواء الاجهاد التاكسدي او اجهاد المجاعة او التعرض للمواد القاتلة وكذلك تتوزع هذه المجموعة من الانزيمات في خلايا الخمائر بين الساييتوبلازم والميتوكوندريا .

والانزيم Peroxidase يختلف عن الكاتيليز بانه يحتاج الى NADH او NAD(P)H مصدرا للالكترونات ولذلك فتحت الظروف التي تقل فيها المكافئات المختزلة المذكورة يصبح قليل الفائدة والأهمية .

اما انزيم تخليق الكلوتاثايون فيكون مهما لان الكلوتاثايون يعد من مضادات الأكسدة المهمة والتي تتخلق بواسطة الانزيم Glutathione synthetase ووجود كميات كبيرة منه تجعل البيئة الداخلية للخلية مختزلة ، ويتفاعل الكلوتاثايون GSH مع بيروكسيد الهيدروجين او O_2^- او $\text{HOO}^\cdot$ ليعطي جذور الكلوتاثايون $\text{GS}^\cdot$ التي سرعان ما تزوج لتكون GSSG ، ويقوم الانزيم Glutathione reductase بنقل الالكترونات من NAD(P)H الى الكلوتاثايون المؤكسد GSSG لغرض استعادة الشكل المختزل GSH ليمارس وظيفته في الخلية وفق المعادلات الاتية :



ومن وظائف الكلوتاثايون المختزل GSH اختزاله للجسور الكبريتيدية الثنائية $\text{S}=\text{S}$ التي تتكون نتيجة إجهاد الأكسدة في البروتينات ، والبروتينات داخل الخلية تحوي على السستينين بنسبة تصل الى 2 % وهي توجد في الحالة الثايولية (SH -) بشكل رئيس .

كما توجد انزيمات اخرى يمكن ان تشارك باختزال العديد من البيروكسيدات العضوية .

إنزيمات وأنظمة إصلاح أضرار المواد النووية

مثلما ذكر آنفا ان جذور الأوكسجين تؤدي الى أضرار كبيرة في DNA و RNA التي تنتج عن اضطراب عمليات الانتساخ او حدوث طفرات . والاجهاد يؤدي الى تحفيز العديد من الجينات لتكوين المركبات والانزيمات والبروتينات المذكورة اعلاه ، ولذلك يكون التعبير عن الجينات الكامنة وسيلة للحفاظ على الطاقة وكذلك تحفيز أنظمة تحتاجها الخلايا تحت ظروف معينة . ومن الانزيمات التي تستحث في هذا المجال هي انزيمات القطع لتصحيح الاصابات التي تحصل في DNA . ونوعية الاصابات هي التي تحدد أي الإنزيمات او الأنظمة التي تقوم الخلايا بحثها فمثلا تكوين Thymine glycols يكون مولدا للطفرات وليس من الضروري ان تكون مميتة للخلايا لذلك تحث الخلايا الانزيمات التي تفككها مثل N- glycosylase وتحث ايضا الانزيمات القاطعة من المجموعة الثانية التي لها علاقة مباشرة بنوعية الإصابة . ومن الجدير بالذكر ان ثمانية الثايمين هي اكثر الثمالات تضررا بالاجهاد التاكسدي لذلك تكون مواقع A : T هي بمثابة بقع ساخنة للتأثر بالأكسدة الكيماوية وتكون الخلايا مهياة لمعالجتها ، ولكن هذه الاصابات لا تحث نظام الاستغاثة الذي يحث بواسطة وجود الأشرطة المفردة أي التكرس الذي يصيب احد الشريطين وليس التحويل الذي يصيب مكونات الاشرطة

فكسور الاشرطة المفردة تحدث عند معاملة الخلايا ببيروكسيد الهيدروجين لذلك يتوقع ان تشارك استجابة الاستغاثة في إصلاح مثل هذا الضرر وعليه يلاحظ ان الخلايا الحاوية على طفرات $recA^-$ تكون حساسة للبيروكسيد ، ومن هذه الحقيقة يلاحظ ان الاجهاد الذي يولده البيروكسيد يؤدي الى انتاج الطفرات وذلك لان نظام الاستغاثة عادة ما يكون مصحوبا بالأخطاء .

وتحت اجهاد التاكسد تشارك الجينات العاملة في إصلاح ضرر الأشعة فوق البنفسجية مثل *uvrC* و *uvrA* , *uvrB* , وتلعب دورا مهما في ذلك .

ومن جهة ثانية يلاحظ ان O_2^- والتطهير الناجم عنه يكون غير معتمدا على نظام الاستغاثة وتكون A : T هي الاهداف الرئيسية في الخلايا التي ينقصها انزيم SOD .

مشاركة الوصيفات

كما ذكر سابقا ان الوصيفات وكذلك مساعداتها يمكن ان تشارك في أكثر من مسار للمساعدة في علاج الاجهادات التي تقع على الخلايا ، ولكن البعض منها قد يكون متخصصا كما في Hsp33 وهو من الوصيفات الجزيئية الذي يتحفز تخليقه بوجود مركبات وجذور الأوكسجين الفعالة ويقوم بالحماية ضدها ويوجد في بدائية النواة ، اما في الخلايا حقيقية النواة فيعتقد انه يوجد في الماييتوكوندريا . وتقوم المواد المؤكسدة بأكسدة ثملالات السستئين الأربعة الثابتة الموجودة في تركيبه لتحفز وظيفته في التعديل .

ومن البروتينات الاخرى والتي تنظم فعاليتها بحالة الأكسدة والاختزال هو الوصيف PDI وهو من انزيمات Oxidoreductases ، ويقوم بالارتباط ببعض البروتينات الخاصة التي يعمل عليها وهي في حالة اختزال ثم يطلقها وهي في حالة أكسدة .

وتحت العديد من بروتينات الصدمة الحرارية تحت ظروف اجهاد الأكسدة كما في *E. coli* و *Salmonella* وغيرها من الاحياء ، مثل حث DnaK (Hsp70) و GroEL التي يزداد تخليقها بعد الإجهاد التاكسدي والتي تساعد في طوي البروتينات بشكل صحيح كما مر ذكره سابقا .

تأثير اجهاد الأكسدة في البكتريا

مما ذكر ان البكتريا تمثل نموذجا دراسيا ملائما ، وقد تم الاستشهاد في العديد من المواضيع بما اثبت في البكتريا ولكن هناك بعض الجوانب الخاصة بهذه الأحياء التي تكون فيها عمليات التنظيم والتطبع سريعة نظرا لانها وحيدات الخلايا والكائن بأكمله يواجه البيئة المحيطة . وفي النموذج الدراسي *E. coli* تؤدي مركبات الأوكسجين الى استجابات تختلف فيما بينها .

الاستجابة لبيروكسيد الهيدروجين

تعالج البكتريا زيادة البيروكسيد بإنتاج الكاتيليز الذي يوجد منه نوعين HPI و HPII والجين المشفر له *katG* و HPII والجين المشفر له *katF* . اضافة الى وجود انزيمات تفكك البيروكسيدات العضوية

Organic hydroperoxidases والجينات الخاصة بها *ahp* مثل *ahpC* , *ahpF* التي تقوم منتجاتها بوظائف دفاعية وذلك باختزال عددا من البيروكسيدات العضوية .

وعند تعرض البكتريا الى تراكيز عالية من بيروكسيد الهيدروجين او البيروكسيدات العضوية فان ذلك يؤدي الى تحفيز الخلايا لإنتاج ما يقرب من 30 بروتين وتكون بمستويات اعلى من المستوى الطبيعي وتسمى عندها الاستجابة لإجهاد البيروكسيد . و 8 من البروتينات تكون مهمة في *E. coli* و *Sal. typhimurium* ، البعض منها ينظم بـ *OxyR* وتقع جينات التنظيم ضمن المنظم *OxyR regulon* . والطفرات الحاصلة في هذا المنظم تفشل في حث البروتينات المذكورة ، اما عند حصول طفرات اصيلة وغير مستحثة (*OxyR (con)*) فان البروتينات تبقى بتراكيز عالية . ويلاحظ ان تدريب الخلايا بتراكيز واطنة من بيروكسيد الهيدروجين تؤدي الى حصول المقاومة لتراكيز عالية . والحقيقة ان جزء من الاستجابة والمقاومة هي عمليات اصلاح للـ DNA .

وبروتينات اجهاد البيروكسيد تنتج على مدى زمني معين مثل عند معاملة الخلايا لمدة 60 دقيقة ، فيلاحظ ان 30 بروتين المذكورة اعلاه يختلف إنتاجها من حيث الموقع الزمني منها 12 تعد من البروتينات المبكرة تنتج في 30 دقيقة الأولى ، في حين ان 18 الاخرى أي المتأخرة تنتج في 30 دقيقة الأخيرة . ومن البروتينات المبكرة هو كاتيليز HPI واخرى من *Ahp* وتنتج كذلك *MnSOD* وانزيم *Glutathione reductase* .

الاستجابة للـ O_2^- : خلايا *E. coli* النامية تحت الظروف الهوائية تنتج *SODs* ويكون على نوعين *MnSOD* والجين المسئول عنه *sodA* و *FeSOD* والجين المسئول عنه *sodB* وهذه الإنزيمات تفكك O_2^- الى H_2O_2 والخلايا التي تعاني من طفرات تعطل فيها الانزيم *SOD* يتجمع فيها O_2^- بتراكيز تصل الى حوالي 2300 بقدر الخلايا الطبيعية .

وعند تعرض الخلايا للـ O_2^- فإنها تنتج ما يقرب من 30 بروتين هي *Superoxide stimulon* *proteins* التي تنظم بالجينات *soxR* , *soxS* . وكما هو الحال مع معظم استجابات الخلايا فان الخلايا المدربة تكون أفضل في النمو عند زيادة تراكيز O_2^- . وتكون عمليات الاستجابة مرافقة لعمليات اصلاح DNA .

ومن البروتينات التي تخلق *MnSOD* الذي يتكون اولا وكذلك ينتج *Endonuclease IV* (وهو واحد انزيمات الاصلاح الذي يعود الى *soxR regulon* ويرتفع مستواه عند معاملة الخلايا بـ O_2^-) وانزيم *apurinic / apyrimidinic Ap - endonuclease* وينتج أيضا انزيم *Glucose -6 dehydrogenase* , *NAD(P)H dehydrogenase* ، فالانزيم المتكون *MnSOD* يؤدي الى تكوين البيروكسيد الذي بدوره يحفز الاستجابة الخاصة به أي يحصل حث ثانوي . ومن

البروتينات الأخرى المستحثة تحت هذه الظروف HPI وانزيمات Ahp وكذلك بروتينات الصدمة الحرارية و GroEL وكلها يطلق عليها SoI proteins .

ويلاحظ ان هناك عددا من البروتينات تنتج تحت اجهاد O_2^- ولا تنتج تحت اجهاد بيروكسيد الهيدروجين والعكس صحيح وربما لا يوجد بينهما تداخل والبعض منها موضح في الجدول (10) .

جدول 10: البروتينات والجينات المسنولة عن الاجهاد التاكسدي في بعض البكتريا المعوية

البروتين	البكتريا	الجين	بيروكسيد الهيدروجين	Super oxide	الحرارة
HPI catalase	<i>Sal. typhimurium</i>	<i>katG</i>	+	؟	-
	<i>E. coli</i>	<i>katG</i>	+	-	-
Ahp	<i>Sal. typhimurium</i>	<i>ahpF</i>	+	؟	+
		<i>ahpC</i>	+	؟	-
	<i>E. coli</i>	<i>ahpF</i>	+	+	-
Glutathione reductase	<i>Sal. typhimurium</i>		+	؟	؟
	<i>E. coli</i>	<i>gor</i>	؟	؟	؟
MnSOD	<i>Sal. typhimurium</i>	؟	+	؟	؟
	<i>E. coli</i>	<i>sodA</i>	-	+	؟
Endo IV	<i>E. coli</i>	<i>nfo</i>	؟	+	؟
Glucose -6p dehydrogenase	<i>E. coli</i>	<i>zwf</i>	؟	+	؟
NADPH dehydrogenase	<i>E. coli</i>	<i>ndh</i>	؟	+	؟
Soi - 28	<i>E. coli</i>	<i>Soi-28</i>	-	؟	؟
Soi-17 / 19	<i>E. coli</i>	<i>Soi-17 / 19</i>	-	+	؟
GroES	<i>Sal. typhimurium</i>	؟	-	؟	+
	<i>E. coli</i>	<i>groES</i>	+	+	+
GroEL	<i>Sal. typhimurium</i>	؟	-	؟	+
	<i>E. coli</i>	<i>groEL</i>	-	+	+
DnaK	<i>Sal. typhimurium</i>	؟	+	؟	+
	<i>E. coli</i>	<i>dnaK</i>	+	-	+
RecA	<i>E. coli</i>	<i>recA</i>	+	+	-

تداخل إجهاد الأكسدة مع اجهادات اخرى

الاجهاد التاكسدي يؤدي الى حث تخليق بروتينات لوحظت تحت الاجهاد الحراري وتدمير DNA ومنها GroES وتنتج تحت اجهاد O_2^- و بيروكسيد الهيدروجين والمجاعة واستجابة الاستغاثة (على الاقل في *E. coli*). فالبروتين DnaK (Hsp70) من بروتينات الصدمة الحرارية ينتج عند معاملة الخلايا ببيروكسيد الهيدروجين وكذلك عند معاملة الخلايا بالمضاد الحيوي Nalidix acid (الذي يؤثر على DNA) والتعرض للأشعة فوق البنفسجية والمجاعة.

وقد لوحظ انتاج SOS protein RecA تحت إجهاد الأكسدة عند تعرض الخلايا لبيروكسيد الهيدروجين و O_2^- وليس الحرارة وناتج الجين *rpoH* الذي يشفر للعامل سيكما -32 الذي يعد اهم العوامل العاملة في الصدمة الحرارية هو المسئول عن هذه الفعاليات ، والخلايا *E. coli* الحاوية على طفرة في هذا الجين لا تستطيع النمو بدرجة حرارة اكثر من 20° م ، ولكن زيادة إنتاج GroEL ، GroES يساعد الطفرة في النمو لحد 40° م ، وهذا يعني التعبير المفرط للجين *dnaK* ويشير ان كل من GroE ، DnaK ضروريا تحت الاجهاد الحراري . وعليه فان بعض بروتينات الصدمة الحرارية تعمل كبروتينات مضادة للاجهاد عامة . فمعاملة الخلايا مثل *E. coli* بدرجة حرارة 48° م لمدة ساعة فانه يؤدي الى انتاج O_2^- وذلك لاضطراب الأغشية الخلوية وبالتالي سيتم حث MnSOD، وكذلك الحال مع بعض الأدوية التي ترتبط بالأغشية الخلوية وتمنع الفعالية التنفسية المرتبطة بها يمكن ان تؤدي الى حث MnSOD تحت الظروف الهوائية فقط .

ومن جهة ثانية فان الخلايا المعرضة بشكل أولي لبيروكسيد الهيدروجين تظهر قابلية عالية لمقاومة الصدمة الحرارية ، فالملاحظ ان بكتريا *Sal. typhimurium* المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين تنتج ما يقرب من 30 بروتين 5 منها هي بروتينات صدمة حرارية مثل (DnaK) وتكون مقاومة للإجهاد الحراري .

تداخلات اجهاد الاكسدة مع مجاعة الكربون : ذكر سابقا ان البكتريا ومنها *E. coli* في طور الاستقرار وعندما تعاني من نضوب الكلوكوز تصبح مقاومة لعدد من انواع الاجهاد مثل الصدمة الحرارية وإجهاد الأكسدة وإجهاد الضغط التنافذي والمجاعة وغيرها . والبروتينات المذكورة اعلاه والخاصة بإجهاد الأكسدة واخرى خاصة بالصدمة الحرارية وغيرها تنظم في هذه البكتريا بالعامل سيكما - 32 الذي يزداد عند المجاعة وجزء من الاستجابة لإجهاد الأكسدة ويستحث كجزء من نظام متعدد الجينات Regulon الذي يفتح عند طور الاستقرار ومجاعة الكربون .

اجهاد الاكسدة واستجابة الاستغاثة

ان تلف المواد الوراثية وحدوث الإجهاد الوراثي يستحث استجابة الاستغاثة ومعاملة الخلايا بتركيز واطئ من بيروكسيد الهيدروجين يؤدي الى تحفيز الجين *recA* الخاص بنظام SOS .

والمعروف ان بيروكسيد الهيدروجين يؤدي الى حث اثنين من وظائف نظام الاستغاثة وهي حث العائلي لمدا من الخلايا المستذابة وكذلك تكوين الخيوط Filamentation والمعروف ان تكوين الخيوط ينتج من تأثير الجين *SluA* (*SfiA*) الذي يشفر لمثبط الانقسام الخلوي ، ولذلك فان معاملة الخلايا بالبيروكسيد وتؤدي الى التأثير على الانقسام الخلوي المعتمد على SOS وكذلك غير المعتمد على SOS .

ويمكن إجمال الاستجابة للإجهاد التأكسدي وتداخلاته بالاتي :

- البروتينات المستحثة تنتج بنمط زمني مختلف .
- البروتينات المستحثة بـ O_2^- تختلف عن تلك المستحثة بيروكسيد الهيدروجين .
- بعض البروتينات المستحثة بإجهاد الأكسدة يمكن ان تستحث تحت اجهادات اخرى مثل الصدمة الحرارية والمجاعة واستجابة الاستغاثة .
- تنظيم تخليق البروتينات وفعاليتها تختلف بين الأحياء .

الدفاعات في الخمائر وحقيقيات النواة ضد إجهاد الأكسدة

تتعرض الخمائر بشكل خاص الى بيئات متذبذبة وبشكل سريع لذلك فان الخمائر وخاصة خميرة الخبز *S. cerevisiae* المستعملة كنموذج دراسي لدراسة العديد من الظواهر . وتتأثر بالإجهاد التأكسدي ، فالتأثيرات السامة لكل من بيروكسيد الهيدروجين و O_2^- تعود الى تحولهم الى جذور الهيدروكسيل ($OH^\cdot$) ذات الفعالية العالية ودفاعات الخميرة ضد هذه الظروف يمكن ان تكون اصيلة (Intrinsic) اي غير مستحثة وتعتمد على مرحلة النمو في دورة الخلية وبعض الاحيان يمكن ان تكون الاستجابة مستحثة . وتكون دفاعات الخميرة الرئيسية :

- تفكيك وإزالة سمية مركبات الأوكسجين الفعالة .
- الحفاظ على توازن ايونات المعادن ومنعها من إنتاج $OH^\cdot$.
- تصحيح التدمير الحاصل .

وتعريض الخمائر الى بيروكسيد الهيدروجين يؤثر عليها وذلك نتيجة لاضطراب توازن الأكسدة والاختزال في الخلية فمثلا في الخميرة *Schizosaccharomyces pombe* يؤدي الى اضطراب عمليات الانتساخ بنمط يعتمد على تركيز البيروكسيد . اذ ان التراكيز المختلفة تحفز استجابات مختلفة ، وهناك حوالي 56 جين يتغير التعبير عنها عند الإجهاد التأكسدي ، وبعض هذه الجينات تعمل ضمن مسارات الاستجابات العامة مثل الكاتيليز و Peroxidase . وتحوي الخمائر على حوالي 12 جين من 56 المذكورة تكون متخصصة جدا ببيروكسيد الهيدروجين ومنها التشفير للـ Thioredoxin reductase الذي هو من المحتمل ان يكون من Flavohemoproteins التي تعمل في مسارات مضادة للأكسدة .

كما ان بيروكسيد الهيدروجين يحث بعض الناقلات الغشائية مثل Ser / Thr kinase التي تنظم توازن الايونات في الخلايا ، كما انه يحث تخليق الانزيمات العاملة في مسار تخليق واستعمال كل من Pyridoxine , Riboflavin وذلك لان الأخير يمكن ان يقلل او يخدم من فعالية ذرات الأوكسجين الأحادية (والذي يحمي من تأثير O_2^- في مرضى السكري) .

وعندما تتطبع الخمائر وكما هو الحال مع الخلايا الخضرية للبكتريا فان تعريض الخلايا لجرع واطئة من العوامل المجهدة مثل بيروكسيد الهيدروجين يمكن ان تصبح الخلايا مقاومة له عند تعريضها مرة اخرى ، واثناء عملية التطبع تقوم الخلايا بحث تخليق سلاسل بيبتيديية متعددة البعض منها خاص بالبيروكسيد . وفي التطبع للبيروكسيد يكون الكاتيليز والكلوتاثيون هما اللاعبين الرئيسان في الاستجابة التطبيعية .

اما في الاحياء الاخرى وخاصة الابتدائيات فان تعرضها لظروف الإجهاد التاكسدي وغيرها من الاجهادات فانها تخلق مستويات عالية من بروتينات الصدمة الحرارية مثل Hsp70 , Hsp60 . وتكون مستوى هذه الوصيفات اعلى في الأنواع الحرة المعيشة التي تكون أكثر تأثرا بالاجهادات .

اجهاد الكحول

يحصل إجهاد الكحول ومنه الكحول الاثيلي خاصة في الخمائر مثل خميرة الخبز التي تستعمل لإنتاجه . فوجود الكحول بنسبة 4 – 6 % يؤدي الى اجهاد الكحول على الخلايا ، لذلك يتوقف النمو وتموت الخلايا ، اذ يؤثر على ميوعة الأغشية الخلوية ومسح البروتينات . وعند تعرض الخلايا للكحول فان ذلك يؤدي الى تنشيط عددا كبيرا من الجينات العاملة في مسارات الايض ومنها :

- ايض الطاقة .
- عملية توجيه البروتينات .
- التوازن الأيوني في الخلية .
- ايض الدهون .

فتحت اجهاد الكحول فان الجدار الخلوي لا يتأثر وانما تحصل تغيرات في الغشاء الخلوي من حيث نوعية الحوامض الدهنية وطول سلاسلها ودرجة تشبعها والتي تكون ضرورية لعملية التطبع للكحول .

وفي الخمائر وهي من الخلايا حقيقية النواة فان وجود الجزيئات معزولة في أجزاء مختلفة من الخلية تعد إحدى وسائل تنظيم الدفاعات .

وزيادة الكحول تؤدي الى إعطاء إشارات لمختلف المسارات مما يعطي مظهرا متعدد الصفات Pleiotropic . ومنها المسارات والأنظمة العاملة في الاستجابات العامة ، مثل مسار سلامة الخلية ومسار التمايز ولذلك يعتقد ان جزيئات الإشارة تحفز مكائن الانتساخ وغيرها من المكونات الخلوية . وفي حالة اجهاد الكحول يقوم العامل البروتيني (Asr1p / PHD Alcohol sensitive ring / finger 1 protein) ذو الوزن الجزيئي 36 كيلو دالتون بالتحرك من الساييتوبلازم الى النواة اثناء دقيقة واحدة وتصل سرعته ذروتها بعد 10 – 30 دقيقة من حصول الاجهاد ، ويتراكم في النواة من خلال استعمال بروتينات النقل النووية عبر الأغشية النووية مثل بروتينات الموردرات Importins و Exportin Xpo 1p بالاعتماد على GTP . والبروتين ليس ضروريا للنمو تحت الحالات الطبيعية ، ويعود الى الساييتوبلازم بعد إزالة الكحول من الوسط المحيط بالخلايا ، لذلك تكون هذه العملية من التنظيم هي بمثابة عملية تنظيم مكاني وزماني . وتكون الاستجابة خاصة بالكحولات دون عوامل الاجهاد الاخرى

فتعريض الخلايا الى 7.5% كحول اثلي يؤدي الى تجميعه في النواة وكذلك تحصل الاستجابة عند تعريض الخلايا الى 1 - بيوتانول بتركيز 2 % او 2- برنانول 5 % لمدة 10 دقائق . ووجد ان بروتين Asr 1p ليس من عوامل الانتساخ التي تستعمل في مسارات اخرى مثل MPK Hog 1p او غيرها ، لانه لا يمتلك اجزاءا يرتبط بها الى DNA ولكن يعتقد انه يعمل بواسطة تداخل البروتينات (بروتين – بروتين) العاملة في العديد من العمليات الخلوية .

الاركية والاستجابة للاجهادات

تختلف الاركية عن البكتريا في عدة أوجه (كما مر ذكره) وتقسم الاركية اعتمادا على متطلباتها الحرارية الى محبة للبرودة Psychrophiles وتكون حرارتها المثلى 15° م او اقل ، والمتحملة للبرودة Psychrotolerant والتي تكون حرارتها المثلى للنمو 20 – 30° م ، اما المحبة لحرارة متوسطة فتعيش بحرارة مثلى 35 – 40° م ، والمحبة للحرارة فتعيش في 50 – 70° م ، والمحبة لحرارة متطرفة Hyperthermophiles فتعيش بحرارة مثلى 80° م وأعلى ، والبعض منها هوائية واخرى لاهوائية في انظمة بيئية مختلفة ، تمتد من بيئات معتدلة الى بيئات متطرفة .

وتختلف استجابتها للاجهادات تبعا لذلك واغلب الاركية تعيش في ظروف مجهدة ، وبما انها تشكل حقا مهما من ناحية التقنيات الحيوية خاصة التي تعيش تحت ظروف الاجهاد لذا سيتم تناول بعض هذه الجوانب .

الاركية تمثل مجموعة اكتشفت بعد البكتريا وحقيقيات النواة والتي كانت معظم الأسس لتراكيبها وآلياتها قد وضعت ، لذلك فعند دراسة الاركية يتم الإشارة الى انها مشابهة لبدائية النواة او حقيقية النواة ، وان كانت هذه المجموعة والتي تمثل الفرع الثالث من شجرة الحياة او الشكل الثالث للحياة هي ذات

تراكيب خاصة بها ، فهي مثلا في الكثير من الأحيان لا تمتلك جدار خلوي ولكن تحوي على S – layers لحمايتها ، وكذلك يوجد في البعض منها هيكل خلوي بدائي يمكن ان يرتبط الى Chaperonin system ، كما ان لها طريقة خاصة في عمليات الانتساخ والترجمة وهي تشبه الموجودة في حقيقيات النواة وتشير التفاصيل للعلاقات التطورية الى انها اندمجت مع بعض أسلاف البكتريا السالبة لصبغة كرام لتكون الخلايا حقيقية النواة وبذا فهي تشابه حقيقة النواة أكثر من بدائية النواة .

الاجهاد الحراري

من اهم دفاعات هذه المجموعة هو تكوين الوصيفات (المذكورة في الجدول 9) وتضم الاركيا العديد من الافراد التي تعيش في درجات حرارية متطرفة فمثلا *Sulfolobus* تكون الحرارة المثلى لها 70 – 80° م وبرقم هيدروجيني اقل من 2 - 3 ، اما الجنس *Thermoplasma* والتي لا تحوي على جدار خلوي فتعيش بدرجة حرارة 55° م ورقم هيدروجيني امثل 2 . وتحوي الاركيا على بروتينات الصدمة الحرارية ومنها Hsp70 الذي سجل في 1991 في *Methanosarcina mazei* التي تعيش بحرارة مثلى 37° م ثم تلا ذلك في *Halobacterium marismortui* (الاسم الحديث *Haloacola*) وهي محبة لحرارة متوسطة ولكنها محبة لملوحة متطرفة . ويوجد Hsp70 في احياء تعيش بحرارة 45 او 55° م وهذا يشير الى وجود هذه الوصيفات في الاحياء عامة ، ولكنها لم توجد في الاحياء التي تعيش بدرجات حرارية اعلى من 80° م او اكثر أي المحبة لحرارة متطرفة .

وتحوي الاركيا على بروتينات اخرى ترافق Hsp70 مثل Hsp40 (DnaJ) Hsp23 وGrpE) ويكون ترتيب الجينات في الاركيا مشابه لما موجود في البكتريا الموجبة لصبغة كرام وكالاتي:

5' - grpE-hsp70-hsp40 -3'

. وقد توجد اختلافات بين افراد الاركيا في التسلسل كما في الاحياء الاخرى في الفواصل بين الجينات ، ويعتقد ان الجين *hsp70* انتقل الى اركيا من البكتريا عن طريق النقل الأفقي لانه لا يوجد في كل الاركيا . وهذه الجينات تستجيب للصدمة الحرارية وانتساخ النسخ وانتاجها Transcripts يكون بشكل منفصل Monocistronic مثل الخلايا حقيقية النواة وتستمر الاستجابة فيها لمدة أطول مما هي في البكتريا . وتستجيب هذه الجينات بالاضافة الى ارتفاع درجة الحرارة الى وجود ايون الكاديوم Cd^{++} والامونيا كما هو متوقع بالنسبة لبروتينات الصدمة الحرارية وتداخلاتها في اكثر من مسار او استجابة . وهذا يشير الى ان Hsp70 في الاركيا هو خليط من صفات البكتريا وخلايا

حقيقيات النواة وذلك لان الاركيا لا تستعمل العامل سيكما للتغيير في عمليات الانتساخ كما في البكتريا لانها لا تحوي على عوامل سيكما ، وانما تستعمل عوامل انتساخ من النوع الخاص بالخلايا حقيقية النواة مثل TBp و TFII p . ومن جهة ثانية فان تسلسل الحوامض الامينية في بروتينات Hsp70 مشابه لتوالياته في البكتريا الموجبة لصبغة كرام الى حد كبير ، ولكن يختلف في الممهدات وإشارات الانتساخ التي تكون مشابه للخلايا حقيقية النواة .

وينتشر Hsp70 في الاركيا (ولكن ليس بشكل مطلق) فهو يوجد في الاجناس المولدة للميثان سواء المحبة لحرارة متوسطة او حرارة عالية ولكن وجوده ليس مطلقا ، وغيابه يؤدي الى غياب البروتينات المرافقة وهي Hsp40 , GrpE ، ويعتقد ان البروتينات الثلاثة انتقلت من البكتريا (دفعة واحدة) ولكن توالي الإشارة لها ليس من النوع البكتري . والاركيا وان كانت من خلايا بدائية النواة الا انها لا تحوي على Hsp60 وإنما تحوي على Chaperonin complex المشابه لذلك الموجود في السائل الخلوي لحقيقيات النواة ويتكون المعقد من جزأين Chaperonin I وهو مكون من GroEL و (groEL) و (groES) GroES ويسمى في بعض الاركيا TF-55 كما في *Sulfolobus shibatae* .

وتجمع الجزء الكبير (L) مع الجزء الصغير (S) يؤدي الى تكوين التركيب البرميلي . ويعمل Hsp70 (DnaK) ومرافقاته في المراحل الأولى من تخليق البروتينات لمنع تجمع الببتيدات الناشئة أثناء عملية الترجمة ، ثم تصل الى المعقد GroE/L لتكملة عملية الطوي النهائية . وفي الواقع فان ليست كل البروتينات تحتاج الى المعقد الاخير ولكن يوجد تعاون بين Hsp70 و GroE/L لإعطاء الوظيفة المميزة لها .

Chaperonin II في الاركيا يشابه TCP-1 (Tailless complex polypeptide 1) ومشتقاته الموجود في حقيقيات النواة ، والذي يوجد في الماييتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء ، والجينات المسؤولة عنه موجودة في النواة . وChaperonin يسمى في بعض الانواع الجسم الحراري Thermosome الذي يكون بمثابة قفص مكون من 8 – 9 حلقات فهو في *Thermoplasma acidophilum* يتكون من نوعين من الحلقات متبادلة α و β ويصل وزنه الجزيئي الى 58 كيلو دالتون .

ولذلك يلاحظ ان الاركيا وهي التي تشكل موقعا خاصا في شجرة الحياة تحوي على مكنة وسميات مشابهة لبداية النواة ، وتحوي على نظام Chaperonin من حقيقية النواة في خلية واحدة ، اضافة الى ان تواليات البروتينات تكون مشابهة لبداية النواة والتنظيم مشابهة لحقيقية النواة . واطافة الى تكوين الوصيفات وبروتينات الصدمة الحرارية تحت الاجهاد الحراري فان بعض افراد الاركيا تظهر

انواع اخرى من المقاومة مثل *Sulfolobus acidocaldarius* تقوم بتغيير حركتها اعتمادا على الحرارة الملائمة ولذا تمثل الحركة استجابة لإجهاد الحرارة وآلية للهروب من الحرارة القاتلة . ونظرا لوجود التطرف في بعض انواع هذه المجموعة فيعتقد انه من الممكن استغلالها في الكواكب الاخرى وفي معاملة الفضلات التي لا يمكن التعامل معها بالأنظمة الحيوية المعتدلة .

تأثير اجهادات اخرى في الاركيا :

اجهاد الاشعاع : الاركيا تقاوم اجهادات اخرى فهي بالإضافة الى انها تعيش بدرجات حرارية عالية مثل 75°م والبعض يعيش بدرجات اعلى من 100°م فان مثل هذه الحرارة تعمل على تفكك DNA ، كما ان التعرض للإشعاع يزيد من الاجهادات على الخلايا لذلك فان الاحياء التي تعيش في مثل هذه البيئات تحتاج الى أنظمة إصلاح غير مستحثة وانما دائمة . ويختلف تصرف الاركيا مع العوامل فمثلا *Sulfolobus acidocaldarius* التي تنمى في المختبر تكون حساسة جدا للأشعة فوق البنفسجية الاقصر من 300 نانومتر اكثر من *E. coli* بضعفين وتحث فيها الطفرات اكثر من *E. coli* ، ولكن في الكائن الموجود في الطبيعة يحوي على نظام اصلاح ضوئي انزيمي DNA photolyases لإصلاح مزدوجات الثايمين الذي يصلح 80 % من الإصابات والمجاميع الأخرى تمتلك أكثر من نظام لإصلاح ضرر الأشعة فوق البنفسجية .

ارتفاع الملوحة والحرارة : تستعمل الاركيا وسائل مشابهة لحقيقيات النواة والبكتريا عند ارتفاع الضغط التنافذي . ولكن الاركيا تجمع مواد عضوية غير طبيعية . فهي تجمع الايونات اللاعضوية مثل البوتاسيوم بواسطة أنظمة في الأغشية الخلوية تقبض الايون بمعجلات عالية ولكن عند زيادته في الخلايا يصبح مضرا لها خاصة للتفاعلات الانزيمية . والاركيا على عكس البكتريا تمتلك تراكيز عالية من الايونات اللاعضوية وفي مقدمها ايونات البوتاسيوم تحت ظروف النمو الاعتيادية ، وحتى في الاحياء غير المحبة للملوحة يكون تركيز ايون البوتاسيوم عاليا جدا ويصل الى اكثر من 0.5 مول وهذا يشير الى انه حتى تحت الظروف الطبيعية فان الخلايا تحتفظ بضغط تنافذي عالي عندما يكون ايون البوتاسيوم حر ولا يرتبط الى الجزيئات الكبيرة . اما في الخلايا المتحملة للملوحة فان تركيز الايون يختلف باختلاف تراكيز كلوريد الصوديوم وفي هذه الحالة يعد من التنافضيات التي تحمي الخلايا . وفي انواع اخرى من الاركيا يمكن ان تحوي على مواد اخرى تعاكس الارتفاع في تراكيز كلوريد الصوديوم .

اما في الاحياء غير المحبة للملوحة تكون عملية قبط ايون البوتاسيوم كاستجابة مبكرة نتيجة لزيادة تراكيز ايون الصوديوم ولكن سرعان ما يتعادل تأثير ايون البوتاسيوم المتجمع بتجميع الكلوتامات كايون معاكس ، أي ان تجميع ايون البوتاسيوم يكون بمثابة استجابة آنية ويستبدل بمركبات غير عضوية امفوتيرية مثل البرولين و (Glycine betain) GB .

اما في الانواع المحبة للملوحة فتتجمع تراكيز عالية ايون البوتاسيوم ففي بعض الانواع *Halobacterium spp* يصل تركيز الايون الى 5 مول في الخلية ويكون هذا أكثر من ذوبان كلوريد البوتاسيوم KCl وهذا يعني ان جزءا يكون مرتبطا بالجزيئات الكبيرة والجزء الأكبر حرا في السائل الخلوي .

ولتفادي الضرر من زيادة ايونات البوتاسيوم طورت الاركيا بروتيناتها وانزيماتها لمواجهة هذه البروتينات تكون غنية جدا بالحوامض الامينية الحامضية مثل حامض الكلوتاميك والاسبارتيك مقارنة بالحوامض الامينية القاعدية مثل الارجيين واللايسين . وحتى الاركيا التي تعيش في ظروف ملحية معتدلة تكون انزيماتها وبروتيناتها ذات طابع حامضي . وذلك لان زيادة الحوامض الامينية الحامضية يؤدي الى إصفاء شحنة سالبة على سطح البروتين ويؤدي الى منع طوي البروتينات الى الشكل غير الفعال ما لم يوجد ايون البوتاسيوم لمعادلة تأثير الشحنات . وإضافة الى ذلك فان بروتينات الاحياء المحبة للملوحة تكون ذات كراهية للماء واطئة وهذا يؤدي الى تقليل الترسيب بالأملاح Salting out بتأثير ايونات البوتاسيوم ويؤدي الى احتفاظ البروتينات بفعاليتها تحت ظروف ملوحة متطرفة .

ويمكن اجمال بعض الاجهادات المدروسة وبروتيناتها في الاركيا في الجدول الاتي (جدول 11) .

جدول 11: الاجهادات المؤثرة على الاركيا والبروتينات المشتركة في معالجة الاجهاد

البروتين	الوزن الجزيئي (كيلو دالتون)	الكائن الحي	الوظيفة	المجهد العام
انزيم SOD	20	<i>Halobacterium halobium</i>	كسح جذور الاوكسجين الحرة	الحرارة
ناقلات Betain	-	<i>Methanosarcina thermophila</i>	المحافظة على التوازن الايوني الداخلي	الضغط التنافذي
مركبات الاينوزيتول	-	<i>Methanococcus igneus</i> , <i>Pyrococcus woesei</i> , <i>Py. furiosus</i>	المحافظة على التوازن الايوني الداخلي	الضغط التنافذي
TrkA	44.1	<i>Methanosarcina mazei</i> S-6	المحافظة على توازن K^+ الداخلي	الامونيا
انظمة اصلاح DNA		<i>Pyrococcus</i> AL585	اصلاح DNA	اشعة UV
Prefoldin	14 - 23	<i>Methanococcus jannaschii</i>	طوي البروتينات	-
sHps	-	<i>Methanococcus jannaschii</i>	تثبيت RNA والتحمل الحراري	-
ClpB	-	<i>Methanosarcina</i>	النمو عند	-

	درجات حرارة عالية وتحليل البروتينات	<i>acetivorans</i>		
الضغط التنافذي	المحافظة على التوازن الايوني الداخلي	<i>Haloferax mediterranei</i>	-	Bacterioruberin
	تسريع عمليات طوي البروتينات	<i>Halobacterium cutirubrum</i> , <i>Methanococcus thermolithotrophius</i>	31 – 19.4 42 - 16	PPIases

الاجهادات في الخمائر

تمثل الخمائر وخاصة خميرة الخبز *S. cerevisiae* المتبرعمة نموذجاً دراسياً جيداً للدراسات الجزيئية لحقيقيات النواة ، كما انها تعد أفضل المضافات لإنتاج البروتينات العلاجية وغيرها من الأغراض ، وتدرس بعض الخمائر من النواحي الجزيئية لأهميتها ، فمثلاً *C. albicans* تعد من الممرضات المزعجة ، اما الخميرة *Debaryomyces hansenii* البحرية فتدرس لمعرفة أسباب مقاومتها لتراكيز الصوديوم العالية جداً ، وتدرس الخمائر الملوثة للأغذية مثل الخميرة *Zygosaccharomuces rouxii* لمحاولة إيجاد أفضل السبل لحفظ الأغذية ، وتدرس خميرة *Sz. pombe* المنشطرة التي تختلف عن خميرة الخبز ولكن الاثنان لهم شبه بالخلايا الحيوانية لذلك تكون وسائل دراسية مهمة .

ونظراً لكون الخمائر أحياء وحيدات الخلية لذلك وجب ان تكون وسائل دفاعها كفوءة كي تعيش في بيئات تتذبذب فيها الظروف . وبصورة عامة فان المستويات الواطئة من عوامل الإجهاد تؤدي الى استجابة التطبع والتي تكون مرحلة انتقالية لمقاومة المستويات الأعلى لذلك كانت الخلايا المتطبعة والمدرّبة أكثر كفاءة في العيش عند حدوث حالات الاجهاد ، وترافق عمليات التطبع تخليق البروتينات الملائمة والذي يعني بدوره تغير التعبير الجيني ، ففي خميرة الخبز فان 10 – 14 % من الجينات يتغير التعبير عنها عند الإجهاد . فالجينات التي تحت عمل في مجالات ايض الكربوهيدرات (لتوفير الطاقة) وإزالة سمية مركبات الأوكسجين الفعالة ، وكذلك إنتاج بروتينات تقوم بطوي البروتينات المتضررة او تفكيكها ، وكذلك تغير فعالية الفجوات والميتوكوندريا وعمليات الالتهام الذاتي Autophagy ونقل مواد الايض . اما الجينات التي تكبح عادة فهي تلك العاملة في مسارات استهلاك الطاقة والمتعلقة بعمليات النمو مثل معالجة RNA ، الانتساخ والترجمة للبروتينات غير الضرورية ، وتخليق الرايبوزومات وهذه تعرف باستجابة الإجهاد البيئية Environmental stress response (ESR) او الاستجابات البيئية العامة Common environmental response (CER) .

ويمكن ان تحصل التداخلات بين الاستجابات والتي تشير الى ان ظروف الاجهاد يمكن ان تنشط آليات دفاع متشابهة او وجود آليات عامة تسيطر على الاستجابات للاجهادات مظهرة مستوى أساسي من الحماية .

وتحوي الخمائر على Stress response element (STRE) كتسلسل موجود في معظم ممهدات الجينات التي تنشط تحت ظروف الاجهاد الخاصة مثل الصدمة الحرارية ، ومجاعة النتروجين والإجهاد التأكسدي وغيرها وهذه العناصر تسهل انتساخ الجينات الحاوية عليها .

الوصيفات وبروتينات الصدمة الحرارية

تعد دراسة هذه المجموعة من البروتينات مهمة لأنها تشارك في عمليات التخليق الحيوي للبروتينات عامة Protein biogenesis وقد ذكر سابقا ان مجموعة البروتينات هذه ترافق او تلازم البروتينات الجديدة منذ ظهورها على شكل بيبتيديات من الرايبوزومات الى مراحل التحويل والطوي الى الشكل الفعال ثم توصيلها الى الأماكن التي تعمل فيها لذلك سميت بالمعدلات او الوصيفات الجزيئية . وتوجد انواع منها في الخميرة مثل Hsp70 , Hsp90 Hsp60 وغيرها والتي تساهم في التخليق الحيوي للبروتينات وتكون ثابتة ومحافظ عليها في العديد من الاحياء .

ومساهمة بروتينات الصدمة الحرارية في تخليق البروتينات الحيوي يكون بواسطة طوي البروتينات وتجميع الوحدات الفرعية للبروتينات او الإنزيمات داخل الأنظمة الحية والتي لا يمكن ان تكون عملية تلقائية بحتة . فالوصيفات ترتبط للسلاسل الجديدة بشكل مؤقت وبشكل لا تساهمي وكذلك ترتبط الى البروتينات غير المطوية والبروتينات غير المتجمعة لتؤدي في النهاية إنتاج بروتينات سليمة ويكون ذلك بواسطة التداخلات بين البروتينات - البروتينات لتطوى الجديدة بشكل صحيح ، وتعد Hsp60 , Hsp70 الأهم من الوصيفات الجزيئية و Hsp70 وجد في كل الخمائر التي فحصت وتختص بالارتباط الى البروتينات غير المطوية مثل تلك الناشئة حديثا لتكمل معالجتها الى النهاية .

وفي الخميرة يوجد Hsp70 في داخل الماييتوكوندريا وعلى الشبكة الاندوبلازمية ويلعب دورا أساسيا في نقل البروتينات من السائل الخلوي الى العضيات بالارتباط للبروتينات المراد نقلها في المراحل الأولى من عمليات النقل .

اما Hsp60 (Cpn60) فيوجد في الخلايا بدائية وحقيقية النواة ويمكن ان يرتبط بالبيبتيديات غير المطوية داخل وخارج الأنظمة الحيوية ويمنع تجمعها وتكتلها العشوائي ويقوم بعمليات طويها ، وازضافة الى Hsp70 , Hsp60 توجد بروتينات اخرى تقوم بعمليات التعديل ومنها Hsp90 وإنزيمات Proline isomerases وكذلك PDI (Protein disulfide isomerase) . ويوجد Hsp140 الذي يخلق تحت ظروف الإجهاد ويقوم بالوظائف نفسها المذكورة اعلاه .

Hsp70 : من البروتينات الثابتة بشكل كبير في كل الانواع من البكتريا الى الإنسان وما يقابله في *E. coli* هو DnaK الذي يشابهه بنسبة 50 % نظيره في الخلايا حقيقية النواة ، اما Hsp70s في حقيقيات النواة فتظهر تشابها فيما بينها بنسب تتراوح بين 50 – 90 % ، وهي تحوي على نهاية امينية تشغل ثلثي البروتين وتكون أكثر ثباتا من النهاية الكربوكسيلية والتي تمثل الثلث الباقي . وتمتاز البروتينات بان لها أكثر من موقع لأداء وظيفة معينة . فهي تحوي على جزء له الفة عالية للارتباط للـ ATP وجزء آخر للارتباط للبيبتيدات . وفي بروتينات Hsp70 من الخلايا البشرية يكون الجزء في النهاية الامينية بوزن جزيئي 44 كيلو دالتون له فعالية تحليل البروتينات وكذلك تحليل ATP (ATPase) ولكن الأخيرة لا تتحفز بارتباط البروتين للبيبتيدات ، وهذا يشير الى اختلاف مواقع الارتباط وهو بذلك يشابه ارتباط ATP للـ G actin في الخميرة . اما النهاية الكربوكسيلية (في الانسان) فتظهر تشابها مع MHC I (Major histocompatibility complex) من حيث التركيب الأولي والثانوي ، وفي اللبائن فان Hsp70 الموجود على الشبكة الاندوبلازمية يطلق عليه Bip .

ان إطلاق البيبتيد المعدل من Hsp70 يحتاج الى طاقة تأتي من تحلل ATP وهذا يشير الى تدخل الطرف الاميني الذي يملك قابلية التحليل (ATPase) مع الطرف الكربوكسيلي الذي يحمل البيبتيد ويكون ذلك بحصول تغيرات شكلية في توزيع الجزيئة (كما ذكر انفا) .

وخميرة الخبز تحوي عددا من Hsp70s كما هو الحال في معظم حقيقيات النواة ، 2 منها في العضيات وهي Ssc 1p في ارضية الماييتوكوندريا و Kar 2p في جوف الشبكة الاندوبلازمية ، إضافة الى وجود 6 تتوزع على مجموعتين او عائلتين ، 4 تعود للمجموعة SSA و 2 تعود الى SSB والبروتين Ssc 1p يشبه DnaK في *E. coli* وهذا ما يدعم الرأي القائل بأن الماييتوكوندريا هي خلايا بدائية النواة تطلعت في الخلايا حقيقية النواة . والجين المسئول عن Ssc 1p وهو Ssc1 موجود في النواة يعطي ناتجا يعاني من التحوير اذ تزال منه 28 حامض أميني عند النقل ليعطي البروتين Ssc 1p في الماييتوكوندريا ، ويخلق البروتين طول حياة الخلية ويشارك في نقل البروتينات من السائل الخلوي الى الماييتوكوندريا .

اما Kar 2p فيوجد في الشبكة الاندوبلازمية ويسمى Bip فيرتبط بالعديد من البروتينات ، ويكون مسئولا في الخمائر عن منع حصول الاندماج النووي ويكون ضروريا لعيوشية الخلايا ، ويشارك في عمليات نقل البروتينات بين الأجزاء الخلوية لخميرة الخبز .

وبروتينات SSA الأربعة فتوجد في السائل الخلوي ، 3 منها تحت بالحرارة وتكون ضرورية لبقاء الخلايا حية ، فحدوث ضرر في SSA1 ، SSA2 يؤدي الى بطيء نمو الخميرة وعدم قابليتها

على تكوين المستعمرات بدرجة حرارة 37°م . وتتداخل هذه البروتينات مع بعضها من النواحي الوظيفية وتشارك في نقل البروتينات بين أجزاء الخلية .

وبروتينات SSB يتوقف تخليقها بالحرارة ويوجد جينيان لتخليقها ، وتتشابه في الوظائف التي تؤديها وتعطي النمط المظهري نفسه للخلايا ، وعند تلف احد الجينين يؤدي الى جعل الخلايا بطيئة النمو وحساسة للبرودة ، وتكون كمياتها كبيرة تحت الظروف الاعتيادية ، وتساهم في عمليات الترجمة على الرايبوزومات .

في *E. coli* كما ذكر توجد بروتينات مساعدة للـ DnaK وهي DnaJ , GrpE فالأول يقوم بعملية تحليل ATP والثاني يساعد في الإطلاق الكفوء ، في حين في الخمائر والانسان توجد 4 بروتينات مشابهة للـ DnaJ .

Hsp60 : يوجد في العديد من الاحياء وفي الخميرة يوجد في الماييتوكوندريا ويكون مشابها للـ GroES في *E. coli* . وتشمل مجموعة Hsp60 مجموعة اخرى من البروتينات الثابتة ويعرف ايضا Cpn60 . ويتكون من حلقتين منضدة فوق بعضها وكل حلقة مكونة من 7 وحدات فرعية ، في *E. coli* يساهم في طوي البروتينات كما مر ذكره ، وفي الخمائر GroEL (5 كيلو دالتون) مع البروتين الاخر GroES يحفزان بالحرارة ويشترك الاثنان في طوي البروتينات غير المطوية ، اذ يرتبط الى البيبتيد غير المطوي ، وبعد طويه يطلق بمساعدة تحلل ATP التي يقوم بها GroEL . ويشفر للـ Hsp60 في الخمائر بالجين *MIF4* الموجود في النواة ، ويعتقد انه يشارك في نقل البروتينات بين أجزاء الخلية . Hsp60 الخلوي يوجد في السائل الخلوي ومقابلته في الحيوانات Tcp1 وهو يشابهه في الوظيفة اذ يشارك في طوي بروتينات الهيكل الخلوي وهي الاكتين و Tubulin وكذلك يساهم في عمليات التخليق الحيوي للبروتينات . وكل من Hsp60 , Hsp70 تعمل في الخمائر او غيرها من الأحياء بشكل متتابع في مسارات عامة .

Hsp90

من البروتينات التي توجد في البكتريا والخمائر واللبائن ، ويوجد بكثرة في حقيقيات النواة وفي الخمائر يوجد منه 2 الاول Hsc82 يوجد بمستويات عالية دون الحاجة الى عمليات حث ، والآخر Hsp82 ويكون مستواه واطنا ويستحث بالحرارة ليصل تركيزه الى 10 – 15 مرة مقارنة بالحالة الطبيعية . وفي الفعريات يكون Hsp90 مرتبطا بعدد من الوظائف مثل كابينيز التايروسين ومستلمات الهرمونات الستيرويدية ، ولذلك يعتقد انه يعمل في مجال التنظيم ، ويقوم بتثبيت البروتينات المتصلة به الى ان تصل الى مكانها .

ويحوي البروتين على موقع او مستلم يربطه بالـ DNA ، عند انطلاق Hsp90 من المعقد مع مستلم الهرمونات يؤدي هذا الى تغيير المستلم على Hsp90 ويصبح من غير قادر على الارتباط بالـ DNA الى شكل قادر على الارتباط . كما انه يشترك في تكوين معقدات المستلمات الخاصة به أي ان له دورا مهما في التخليق الحيوي للمستلمات ، ويشترك Hsp90 في تعديل بعض الإنزيمات وقطع Fab في الأجسام المضادة وحيدة النسيلة Monoclonal antibodies .

Hsp140

يكون مستوى البروتين في الظروف الاعتيادية واطنا ولكنه يستحث بالحرارة بقوة ، ولذلك يعتقد انه ليس ضروريا عند النمو تحت الظروف الاعتيادية . والخمائر تموت عند حرارة 50° م ولكن عند التدريب بالحضن عند حرارة 37° م فان Hsp140 المستحث يعمل في مجال التحمل الحراري الذي تبديه الخميرة ، ويكون Hsp140 ضروريا للتحمل الحراري في طور الاستقرار وكذلك في الابواغ التي تكونها ، ويكون ضروريا ايضا لتحمل الكحول الايثيلي . وهو يشابه أفراد عائلة ClpB ، ClpA المستحثة بالحرارة في *E. coli* ، وهذه العائلة تعمل في *E. coli* في مجال تفكيك البروتينات ، ClpA لا يفكك البروتينات وانما يعمل كـ ATPase الذي يساعد في تنظيم ClpP . ولذلك فان Hsp140 ليس من البروتينات وانما يعمل على تنظيمها ربما من خلال تداخلات بروتين – بروتين . ومن البروتينات الأخرى العاملة في الخمائر وغيرها من الأحياء في عمليات التعديل هي إنزيمات المزامرة Isomerases ومنها :

- Protein disulfide isomerases (PDI) تساعد في تكوين الأواصر الكبريتيدية الثنائية في البروتينات المختزلة وهذه توجد في داخل الشبكة الاندوبلازمية في الخميرة وباقي حقيقيات النواة . وتساهم بشكل فاعل في طوي البروتينات في داخل الأنظمة الحية ويشفر لها في الخميرة بالجين *PDI 1* .

• انزيمات مزامرة البرولين Proline isomerases مثل (Peptidyl – porlyl – cis – trans) تعمل على مزامرة Cis-trans عند وجود البرولين في السلسلة الببتيدية ، وتعمل على طوي البروتينات المعتمدة على مزامرة البرولين (Proline isomerization) . وتوجد بروتينات مشابه لها ترتبط بالأدوية المحبطة للمناعة مثل Cyclophilins التي ترتبط بـ Cyclosporin A وتعمل بروتينات Cyclophilins على طوي البروتينات ، ويوجد مثلها في الدروسوفيلا في الشبكة الاندوبلازمية للخلايا المستلمة للضوء Photoreceptor cells ويساهم في طوي البروتينات وتوجيه بروتينات Rhodopsins ، وتوجد بروتينات أخرى ترتبط بأدوية أخرى .

تحليل البروتينات

عند تعرض الخلايا للظروف غير الطبيعية او الاجهادات فان بروتيناتها تمسخ وتصبح غير مطوية وغير فعالة ، وهناك طريقتان للتعامل معها :

- استعادة تركيبها الطبيعي بمساعدة الوصيفات الجزيئية .
- تفكيكها عند عدم إمكانية تصحيحها .

وعليه فان الوصيفات الجزيئية تساعد في عملية التفكيك وتكون عمليات التفكيك في اغلب الاحيان ضمن مسار المدمر Ubiquitin pathway وهو الطريق المتبع لتفكيك البروتينات في حقيقيات النواة وبعض مكوناته تنشط تحت ظروف الاجهاد .

وفي الخمائر يشفر للمدمر بأربعة جينات UBI الذي يكون ضروريا لبقاء الخلايا حية تحت الظروف المجهدة وذلك بتزويدها بجزيئات المدمر تحت ظروف الاجهاد وتشارك بعض مكونات المدمر في تجميع الرايبوزومات وبشكل أدق تجميع بروتينات الرايبوزومات وبذا فهو يقوم بوظيفة الوصيف ، وهناك العديد من إنزيمات خميرة الخبز التي يمكنها الارتباط بالمدمر وكلها تشترك في احتوائها على جزء يحوي على السستينين الذي يرتبط به المدمر بشكل تساهمي . ويساهم المدمر في العديد من الفعاليات الحيوية منها بعض عمليات إصلاح DNA وأخرى تعمل على استمرار دورة الخلية من مرحلة G1 الى مرحلة التخليق S . إضافة الى مشاركته في تدمير البروتينات المتضررة . والبروتين المدمر بروتين ثابت مكون من حوالي 76 حامض أميني وعندما يتحفز يكون مركب نشط مع الإنزيم المنشط له ، ثم ينقل مادة الأساس (البروتينات او الانزيمات) المراد تفكيكها الى جسيم التحلل البروتيني الذي يوجد في العديد من الإحياء .

جسيم التحلل البروتيني في الخمائر وخلايا اللبائن يكون بمثابة تركيب اسطواناني بحجم 20S (S وحدة الترسيب) ، ويتكون على الأقل من 12 وحدة فرعية مرتبة بشكل 4 حلقات متراسة . خارج الأنظمة الحية يظهر الجسيم ثلاث فعاليات منفصلة من Endopeptidases ، ولكن يبدو ان هناك بروتين آخر او بروتينات أخرى تشارك في تفكيك البروتينات المتضررة داخل الخلية يعرف بـ 26S

. ويوجد الجسيم في العديد من الإحياء وفي خميرة الخبز فان الجين *pRE 1* يشفر لإنزيم مشابه للـ Chymotrypsin .

مسارات نقل الإشارات في الخمائر

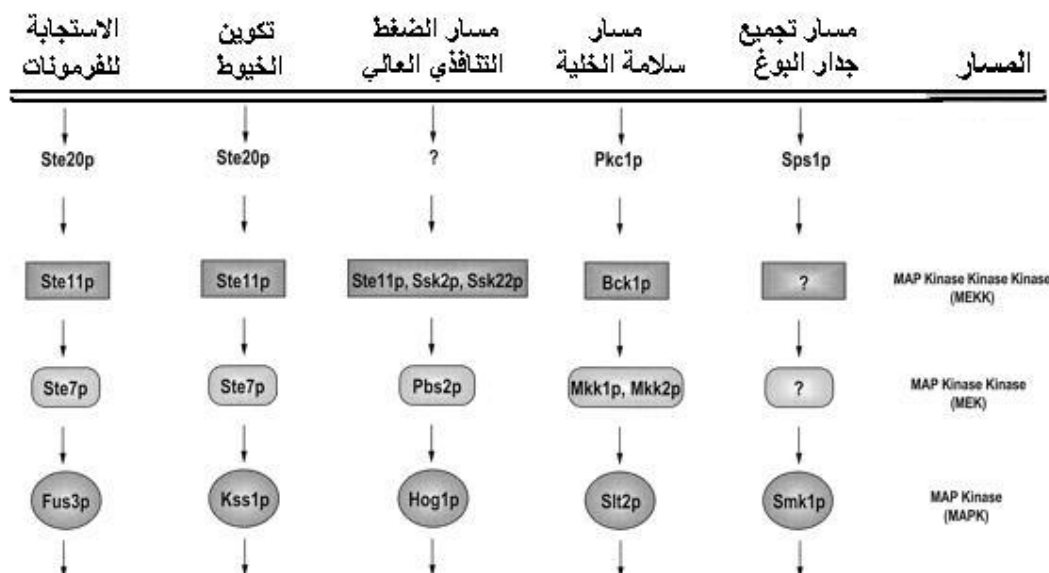
بعد استعراض أهم المكونات التي يمكن ان تتعامل مع ظروف الإجهاد التي تحيط بخلايا الخمائر ، يمكن الانتقال الى المسارات التي تنقل هذه الإشارات ، وفهمها في الخمائر يكون مهما بالنسبة للعديد من الجوانب في الإحياء حقيقية النواة الأكثر رقيا .

فالخمائر وخاصة خميرة الخبز احياء غير متحركة ، وهي ليست مثل البكتريا - المتحركة على الأقل - والتي تظهر فيها ظاهرة الانجذاب (كما مر ذكره) . هذه الاحياء غير المتحركة تظهر استجابات سريعة للبيئة المحيطة ضمن مسارات نقل الإشارات المعقدة جدا كما سجل في المحتوى او المكنون البروتيني لخميرة الخبز ، ويعتمد تخصصها الدقيق على وجود المنصات التي تصطف عليها وكذلك البروتينات المرسية والمكيمات ويمكنها بذلك العمل في أكثر من مسار . أي تكون عملية التخصص لمسار معين معتمدا على حجز البروتينات العاملة في المسار ضمن قالب محدد ، وتعتمد عملية حجز البروتينات في خط عمل موجه اعتمادا على وجود المنصات ، اضافة الى ذلك فان عملية طوي البروتينات العاملة في المسار بشكل معين يلاءم مسار معين ولا يلاءم مسار اخر وهذا يساعدها في تميز مواد الأساس التي تعمل عليها .

ومن اهم المسارات العاملة في نقل الإشارات هو مسار MAPK (السابق الذكر) ، وفي الخمائر يشارك المسار في تنظيم عددا من فليات الخلية :

- ◆ تنظيم الاستجابة للضغط التناظفي .
 - ◆ الاستجابة للفرمونات والتزاوج .
 - ◆ مسار المحافظة على سلامة الخلية .
 - ◆ مسار تجميع الجدار الخلوي وتكوين الابواغ .
 - ◆ مسار تكوين الخيوط او الهايفات الكاذبة للغزو .
- وهذه صنف وفق المسار الذي يعمل فيه MAPK وكذلك اعتمادا على الحوامض الامينية الواقعة بين ثملالات الثروينين والتايروسين التي تتم فسفرتها والتي سبق ذكرها .

وهذه المسارات موضحة مجملها في الشكل (50)



شكل 50 : مسارات MAPK المختلفة في خميرة *S. cerevisiae*

والكاينيزات المشتركة في سلسلة التفاعلات الموضحة في الشكل مقسمة الى عدة مجموعات كل مجموعة تؤدي وظائف معينة والتي يمكن ان تتعاون فيما بينها . وتحتوي الكاينيزات على مواقع للارتباط بالـ ATP ، وأخرى لعمليات الفسفرة ، كما ان بعضها تحوي على مواقع لا تشارك بالتفاعلات ولكن تشارك بالتنظيم مثل عمليات التنشيط الذاتي ولذلك فان التلف الحاصل في هذه المواقع يؤدي الى تنشيط الكاينيزات عند غياب المحفز . وتعمل الأنظمة بشكل شبكة متداخلة .

استجابة الخمائر للضغط التنافذي

زيادة الضغط التنافذي او قلة الماء يؤدي الى حدوث الجفاف وتقويض تدرج الايونات عبر الأغشية الخلوية وبالتالي تؤثر على عيشية الخلايا . ويمكن تلخيص تأثير ارتفاع الضغط على الفعاليات الحيوية للخلايا :

- ♦ اضطراب السيطرة على نقل المواد عبر الاغشية الخلوية .
- ♦ اضطراب السيطرة على تنظيم الفعاليات الحيوية .
- ♦ التأثير على دورة الخلية .
- ♦ التأثير على الهيكل الخلوي .

وقلة النشاط المائي يؤدي الى تقليل نمو الخمائر وقد استعملت هذه الظاهرة منذ قديم الزمان في عمليات حفظ المواد الغذائية والفواكه كما في زيادة تركيز السكريات في صناعة المرببات . والنشاط المائي يتغير بسرعة حول الخمائر وذلك نتيجة لتأثير الظروف الخارجية او نتيجة لفعالية الخلايا نفسها . ولذلك تحافظ الخلايا على حجمها الطبيعي وتحافظ على النسبة بين الماء الحر والماء المرتبط او

المقيد ليلائم فعاليتها الحيوية . فالنشاط المائي في المحلول الخلوي وعضيات الخلية للخمائر يجب ان يكون اقل من النشاط المائي للوسط المحيط لتكون هناك قوة دافعة للماء للدخول الى الخلايا بشكل ثابت . وهذه القوة يعاكسها الضغط الانتفاخي والذي يكون ناتجا عن محدودة تمدد كل من الأغشية والجدران الخلوية . وتحت مثل هذه الظروف تحاول الخلايا البقاء حية عند حصول تغيرات مفاجئة في النشاط المائي سواء عند الانخفاض أي حصول زيادة في الضغط التنافذي الذي يؤدي الى *Hyperosmotic shock* (Osmotic upshift) والذي يرافقه خروج الماء وانكماش الخلية ، او زيادة النشاط المائي الذي يؤدي الى *Hypoosmotic shock* (Osmotic downshift) مؤديا الى دخول الماء وانتفاخ الخلايا وزيادة الضغط الانتفاخي . ان قابلية الخمائر للتعامل مع التغير في النشاط المائي لابد ان تكون نابعة من داخل الخلايا ، وهذا يعني وجود الأنظمة الملائمة تتخذ الإجراءات اللازمة تحت كل الظروف وتعمل في إنشاء الثواني الأولى من التغير وذلك لان خروج الماء ودخوله يحدث بسرعة ، وخروج الماء يؤدي الى زيادة تركيز الايونات والمواد الخلوية الاخرى ، وهذا يؤدي الى توقف الفعاليات الحيوية الطبيعية وتصبح الخلايا تحت الاجهاد التنافذي . وقد طورت الخمائر آليات للتعامل مع هذا الاجهاد وتعتمد الآليات على عدة مكونات .

استجابة الخمائر لزيادة الضغط التنافذي : تتم معالجة الاجهاد وتنظيمه عن طريق MAPK كعمود فقري تسبقه بعض المكونات وتعقبه بعض المكونات التي تقوم بإكمال دوره .

تحسس الضغط التنافذي : هناك العديد من البروتينات التي تعمل كمتحسسات للتنافذية *Osmosensors* وتكون هذه لازمة للاستجابة . وهذه المتحسسات تختلف عن المتحسسات الكيماوية *Chemosensors* في انها لا تعمل كمستلمات للمواد وانما تتحسس التغيرات في الصفات الفيزيوكيماوية في المذيب المحيط بالخلايا نتيجة لتغير تركيز الماء او تغيير تركيب جريئة الماء ، أي انها تتحسس التغيرات التي تحصل نتيجة لتغير النشاط المائي a_w (Water activity) . ومن المتوقع ان متحسسات التنافذ تعمل على سطوح الخلايا كبروتينات أصيلة في الأغشية ، ولكن يمكن ان تكون بعض متحسسات التنافذ بروتينات ذائبة . وهناك نوعان من البروتينات التي تسيطر على التغيرات التنافذية وهي :

♦ بروتينات متحسسة فقط وهي أصيلة وغير مستحثة وتسيطر على مسارات نقل الإشارات وتؤدي الى حصول الاستجابة للتكيف للضغط التنافذي .

♦ البروتينات الناقلة التي تشغل وتستعرض الاغشية الخلوية وهي التي يسيطر عليها بالمحفزات الميكانيكية او التغير في درجة تنافذية الوسط المحيط بالخلايا . والتي يعتقد انها قنوات حساسة للتغير الميكانيكي وترتبط بمسارات نقل الإشارات في الخلية .

والتحسس يمكن ان يحصل خلال دقيقة في حالة إضافة تراكيز من كلوريد الصوديوم (100 ملي مول) وتصل ذروة الاستجابة عند إضافة 300 ملي مول الى خميرة الخبز وذلك نتيجة لتغير المؤشرات ومنها الميكانيكية كما ذكر، إضافة الى التغيرات التي يحدثها الضغط الانتفاخي والذي يمثل قوة شد على سطح الخلية فتغيره يؤدي الى تغير الشد السطحي على مكونات الحدود الخارجية مثل الجدران والأغشية الخلوية والذي يؤدي بدوره الى تغير ترابط الهيكل الخلوي مع الأغشية الخلوية وهذا يعد من الإشارات القوية .

فمن المعروف ان الجدران الخلوية في الخمائر من التراكيب المعقدة ولها اتصالات عرضية كثيرة مع بروتينات الغشاء الخلوي والتغير في الشد لهذه الاتصالات يمكن ان يؤدي الى تغيرات شكلية في البروتينات الغشائية المرتبطة بالجدار الخلوي وهذا يكون بمثابة تحسس للتغيير في الضغط التنافذي ، كما ان التغير في الشد يؤثر على الطبقة الدهنية الثنائية في الأغشية الخلوية والذي يمكن ان يكون جزءا من الإشارات ، إضافة الى ان القنوات الأيونية في غشاء الخلية والتي تكون حساسة للتغيرات الميكانيكية يمكن ان تحفز بهذا الشد .

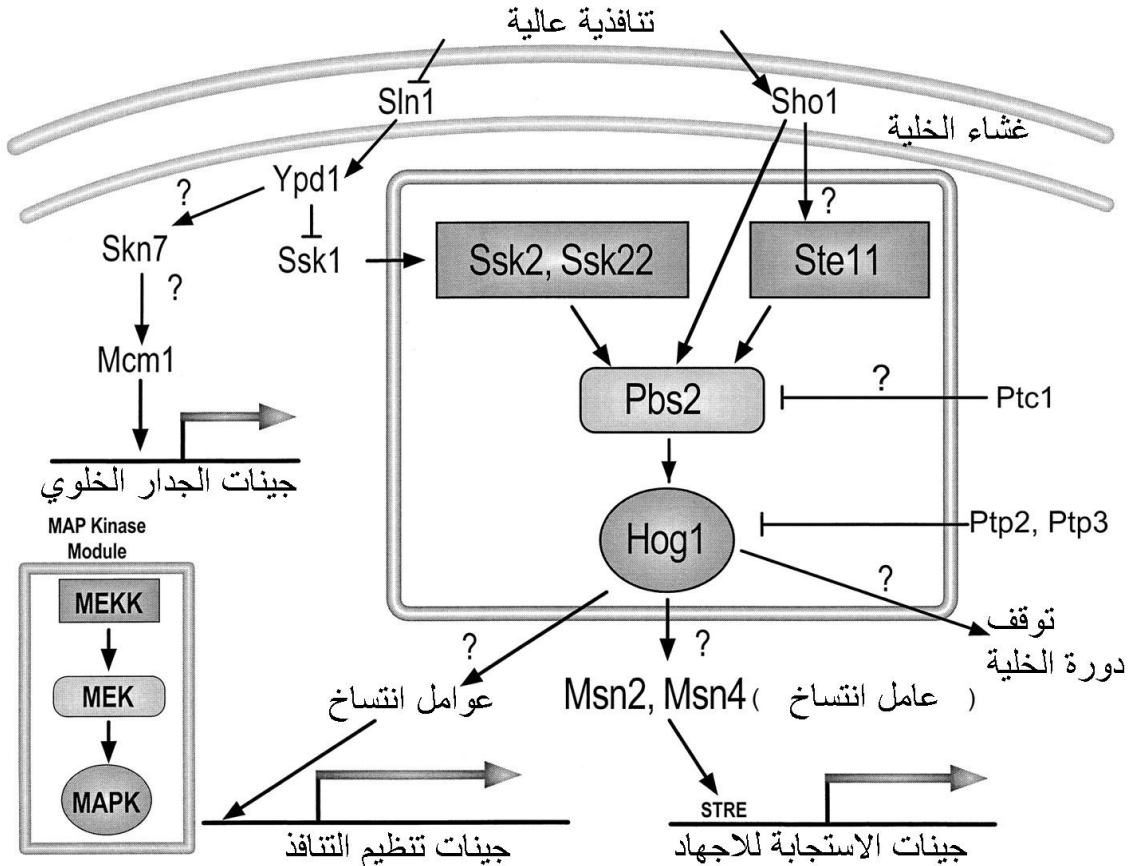
وإضافة الى ذلك فان خيوط الاكتين المكون للهيكل الخلوي يمكن ان تكون ذات اهمية في تحسس التغير في الضغط التنافذي فتوجد عدة انبعاثات غشائية تلتف حول حزم من خيوط الاكتين والمكونة لجيوب قشرة الاكتين (Cortical patches) فالتغير في الضغط التنافذي يؤثر على هذه الانبعاثات والجيوب فتتحول من انبعاثات عميقة الى انبعاثات ضحلة اعتمادا على الضغط التنافذي ، لذلك فان خيوط الاكتين سوف تشد او تتراخي مؤدية الى حدوث تغيير في شكل الاكتين وبذا تجعل البروتينات المرتبطة بالاكتين تعمل كمتحسسات للتغير في الضغط التنافذي .

تحفيز مسار تخليق الكليسرول

بعد ان تتم عملية التحسس بالضغط التنافذي تحصل عمليات تنشيط للمسار المعني بمعالجة الاجهاد وهو مسار HOG pathway (High osmolarity glycerol) وهو احد مسارات MAPK ويشبه نظام المكونين الموجود في البكتريا والموضح في الشكل (51) .

وتنشيط المسار يؤثر على التعبير عن عدد من الجينات وبالتالي التأثير على وظائف الخلية . فمن المظاهر العامة عند عمل مسار HOG :

- ◆ توقف أني للنمو .
- ◆ فقد لعمليات تنظيم اكتين الهيكل الخلوي .
- ◆ توقف مؤقت لعمليات تخليق بعض البروتينات .
- ◆ حث تخليق مجموعة بروتينات الصدمة الحرارية .
- ◆ زيادة تركيز المذابات المتوافقة داخل الخلايا .



شكل 51: مسار اجهاد التنافذ العالي في خميرة الخبز

فبالخلايا تحت الظروف الطبيعية تكون ناضحة للكليسرول ، وزيادة الضغط التنافذي خارج الخلايا يؤدي الى :

- ◆ نقصان في نضوحية الخلايا للكليسرول وذلك بتنشيط ناقلاته .
- ◆ حث تخليق الإنزيمات المسؤولة عن تخليق الكليسرول من Dihydroxy acetone phosphate وهي 1 GDP (Glycerol -3p dehydrogenase) و (-3- Glycerol phosphate) وبذا يزداد تركيز الكليسرول داخل الخلايا .
- ويستحث مسار HOG بمواد عدة مثل كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم ، والسوربيتول ، والكلوكوز مما يشير الى انه يستجيب للتغير في التنافذية وليس بنوعية مذاب معين ، من الجدير بالذكر ان زيادة تركيز كلوريد الصوديوم إضافة الى تغييره الضغط التنافذي فان له تأثير إضافي وهيسمية الملح الخاصة .
- وقد سجلت تأثيرات مسار HOG على التعبير الجيني من قياس مستوى البروتينات او قياس مستويات mRNA وقد وجد ان لكل مادة يتم تحفيز جينات خاصة وبنمط وفتي معين . والطفرات في

مسار HOG لا يمكن ان يعود فيها الاكيتين بعد إعادة الخلايا الى الوضع الطبيعي من ناحية الضغط التنافذي ، وهذا يشير الى ان المسار يصحح مكان النمو في الخلية والانقسام بعد الصدمة التنافذية . ومن ناحية علاقة المسار بدورة الخلية فهو يوقف الخلية عند المرحلة G2 . ومن جهة ثانية يلاحظ ان تنشيط المسار الدائم يكون مميتا للخلايا حتى تحت ظروف ارتفاع التنافذية ، لذلك يجب ان يغلق لتبقى الخلايا حية ويتم ذلك اما بالتنظيم الذاتي او بواسطة انزيمات الفوسفيتيزات واهمها Tyrosine phosphatase .

وبجانب مسار HOG هناك العديد من المكونات التي تعمل في مجالات التنظيم والتي تختلف باختلاف المادة المسببة لارتفاع الضغط التنافذي . مثلا المواد العضوية يكون لها توجهها خاصا يختلف عن الايونات ، فالسوربيتول يؤدي الى حث 13 جين منها 8 تكون متخصصة وتحت بشكل قوي بالسوربيتول والآخرى تعمل ضمن الاستجابات العامة .

دور الفجوات في التطبع التنافذي في الخمائر

في النباتات تلعب الفجوات دورا مهما في تنظيم التنافذ ، وتأخذ الفجوات حجما كبيرا من حجم الخلية ويكون غشائها Tonoplasts ناضحة للماء نظرا لوجود عدد كبير من القنوات المائية ، اما في الخمائر الصغيرة الحجم بالنسبة للخلايا النباتية فلا توجد مثل هذه القنوات المائية ، ولكن تشترك الفجوات في التعديل عند تغير التنافذية . ويكون الضغط الانتفاخي في الفجوة أعلى قليلا من السائل الخلوي وعند حصول إجهاد تنافذي تنكمش في المرحلة الاولى ثم تعود بعد مدة وتشترك في عمليات تعديل التنافذية ، وهناك العديد من البروتينات التي يمكن ان تزيد من تركيز ايون الصوديوم في فراغ الفجوة . وتؤدي الصدمة التنافذية الى تقسيم الفجوة الى فجوات صغيرة في الخمائر المنسطرة مثل Sz. pombe .

المقياس الزمني لمواجه الصدمة التنافذية

ان المدى الزمني لتطور الاستجابة ومقاومة ارتفاع الضغط التنافذي يعتمد على شدة الصدمة ، فيكون الوقت قصيرا بعد التعرض لصدمة معتدلة ، ويكون طويلا بعد التعرض لصدمة قوية . فبعد ثواني من تعرض الخلايا لصدمة تنافذية قوية يقلص حجمها الى 50 % من الحجم الأصلي ، مثلا عند تعرضها لـ 1.2 مولر من كلوريد الصوديوم .

وفي ثواني يمكن تحفيز مسار HOG وتتم فسفرته وتهيئته خلال دقيقة ، وتستجيب القنوات الغشائية بسرعة فتقل قابليتها على نقل المواد في اثناء 15 ثانية . ثم بعد 3 دقائق يمكن ملاحظة نواتج جينات المسار في النواة ، وبعد 10 دقائق يلاحظ ظهور mRNA وهذا ما يحدث في الصدمات المعتدلة .

اما في الصدمات القاسية جدا لا تلاحظ هذه الاستجابات ، وبالأوقات المذكورة وهذا يعني انه في هذه الحالة توجد إجراءات أخرى تحدث قبل نقل الإشارات ، اذ تقوم الخلايا في هذه اللحظات بإيقاف عمليات التكاثر وتقوم بتعديل تخليق البروتينات باستعمال آليات التحويل بعد الترجمة ولذلك تأخذ الاستجابة أكثر من ساعة الى حين ظهور mRNA والذي يتبعه عادة التغيير في مستويات البروتينات المعنية .

وبما ان أهم التغيرات الايضية التي تحصل هو تجمع الكليسرول الذي لا يمكن ملاحظته قبل ساعة في حالة الصدمة القوية . وظهور الكليسرول المتجمع يرافقه انخفاض في البروتينات المفسفرة المسؤولة عنه وتبدأ مستويات mRNA تعود الى المستويات التي سبقت الصدمة .

ومعدل الوصول الى ذروة الاستجابة في حالة الصدمة المعتدلة هو حوالي 30 دقيقة وفي حالة الصدمة القوية تصل الى 60 دقيقة . ويستمر تجميع الكليسرول لمدة ساعتين او أكثر اعتمادا على شدة الصدمة . والخلايا المتطبعة تماما تعاود تكاثرها وتمتاز بقدرتها العالية على تعديل ايض الكربون والطاقة وجهد الأكسدة والاختزال ، اضافة الى المحافظة على تراكيز عالية من الكليسرول ، وتكون هذه الخلايا ذات صفات سطحية متغيرة .

واضافة الى الكليسرول فان الخمائر يمكن ان تجمع البرولين كما هو الحال في البكتريا والخلايا النباتية ولذلك تجمع الخمائر عندما تجده في البيئة المحيطة مثل وجودها على المواد النباتية ويمكن ان تستعمله كدارئ تنافذي .

انخفاض الضغط التنافذي

تعرض الخمائر الى إجهاد انخفاض الضغط التنافذي في البيئة المحيطة بها مثلما تتعرض لزيادته وتختلف استجابة الخلايا في هذه الحالة ، اذ تقوم بتحفيز مسار سلامة الخلية (الذي سيأتي ذكره لاحقا) ، وعندها تحصل فسفرة للتايروسين وزيادة فعالية كايينيز البروتين C Protein kinase (PKC) العامل في مسار سلامة الخلايا والذي يشارك فيه MAPK . وهذا الاجهاد اقل دراسة من الحالة عند ارتفاع الضغط التنافذي ، ويبدو ان الآليات العاملة في تحويل البروتينات بعد الترجمة تلعب دورا مهما في بقاء الخلايا حية . وتقوم الخلايا بتصدير الكليسرول خلال قناة خاصة هي Fps 1p ويؤدي الانخفاض الى حث مسار سلامة الخلايا .

وعند نقل الخلايا من ضغط تنافذي عالي الى وسط ذو ضغط تنافذي واطئ يحصل انتفاخ للخلايا خلال ثواني وتتحفز المتحسسات والقنوات الخاصة ، وفي اثناء الدقيقة الأولى يلاحظ ارتفاع الكالسيوم في الساييتوبلازم ، وتزداد بعض المكونات المشتركة بشكل مفسفر ، وبعد حوالي 5 – 10 دقائق يلاحظ بدء التعبير عن الجينات الخاصة بالاستجابة ، ثم بعد ذلك يبدأ التعبير بالانحدار بسرعة ، وهذه الاستجابة القصيرة تؤدي الى تغيير مستويات mRNA والبروتينات .

وتمتاز الخمائر المتطبعة لضغط تنافذي واطئ باحتوائها على تراكيز واطئة من الكليسرول كما ان تراكيبها السطحية تكون ذات صفات محددة ، ومثلما ذكر أعلاه ان مسار الاستجابة المهم هو PKC ، وهذا المسار يحفز في الخمائر بمؤثرات اخرى مثل تحسس المواد الغذائية والإجهاد الحراري والفرمونات ، ويكون التأثير الأكبر له على مسار سلامة الخلية وذلك بالسيطرة على عمليات تجميع مكونات الجدار والغشاء الخلوي كما في منطقة البراعم .

والتغير في الجدار الخلوي يمكن ان يحصل استجابة لوسط النمو او استلام الفرمونات والتحام الخلايا وكذلك تحصل فيه التغييرات أثناء دورة الخلية ، وعند عدم الاستجابة لهذه المؤثرات فان الخلايا تصبح هشّة ، ثم يقود هذا الى التحلل او اضطراب شكل الخلايا او تغيير نمط تكوين مواد الحاجز Septum وترسبها ، ولذلك يلعب PKC دورا مهما عند تكوين البراعم واستطالة الهياقات ، ويكون مسئولا عن تكوين نتوءات التزاوج .

ومن وظائف PKC الأخرى هو السيطرة على التعبير عن الجينات المشتركة في الغشاء الخلوي وكذلك السيطرة (احتمال) على نقل الحويصلات المتكونة في الاغشية الخلوية او قربها الحاوية على مكونات تعمل في مسار سلامة الخلية .

ويتكون مسار PKC من عدة مكونات وبروتينات تعمل في نقل الإشارات والسيطرة عليها كما انه ينشط في بعض تفاعلات المسار MAPK .

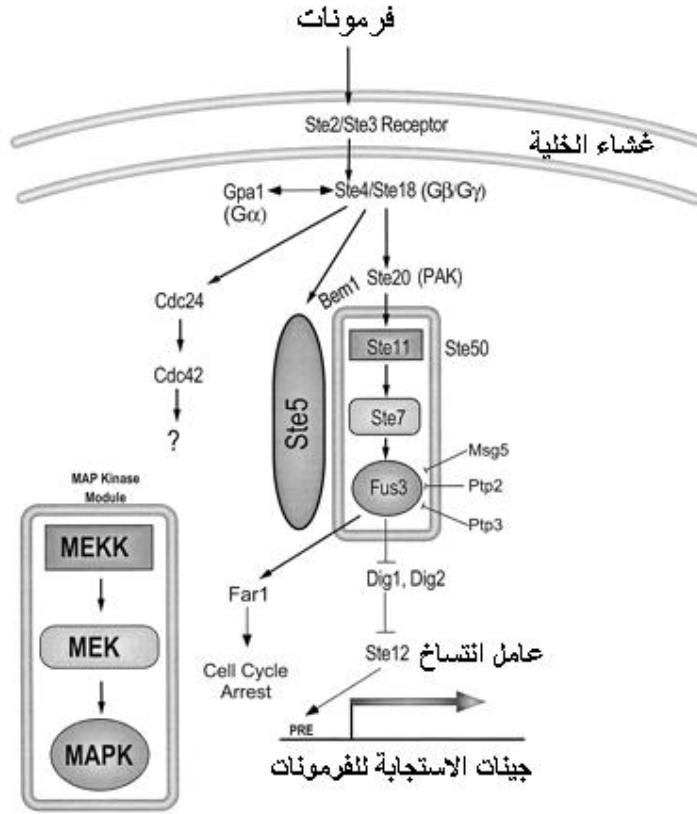
مسارات اخرى للـ MAPK :

مسار التزاوج والاستجابة للفرمونات

خلايا خميرة الخبز المتبرعمة اما توجد فردانية الكروموسومات Haploid او مزدوجة الكروموسومات Diploid . والخلايا الفردانية اما تكون α او a والخلايا الأخيرة المختلفة يمكنها التزاوج والالتحام لتكوين خلايا مزدوجة الكروموسومات . وتتم عملية التزاوج بإطلاق جزيئات الفرمونات المكونة من بيبتيديات صغيرة وتسمى a - factor من الخلايا MATa والعامل الفا من الخلايا MAT α ، وكل منهما تؤثر على الخلايا المعاكسة لتهيئة الخلايا للتزاوج . وعند استجابة الخلايا للتزاوج تحدث بعض الاحداث منها :

- استقطاب النمو في الخلية تجاه الخلية الاخرى .
- إيقاف دورة الخلية عند المرحلة G1 .
- زيادة في التعبير عن البروتينات اللازمة لالتصاق الخلايا وكذلك البروتينات اللازمة للاندماج النووي .

وتؤثر الفرمونات بواسطة مسارات MAPK الذي تتداخل بروتيناته للقيام بنقل إشارات التعبير عن الجينات المطلوبة وهي الموضحة في الشكل (52)



شكل 52 : مسار التزاوج والاستجابة للفرمونات في الخمائر

وتحصل تغييرات في الخلايا فيتأثر الهيكل الخلوي اذ يعاد ترتيبه في بعض المناطق ، أي ان الإشارات والاستجابة تعمل على إعادة تنظيم الاكتين في الهيكل الخلوي مما يؤدي الى التغييرات المورفولوجية المرتبطة بالاستجابة للفرمونات . كما ان مستلمات الفرمونات التي تقع في الغشاء تستهدف الجينات في النواة مما يعني تكون معقدات وحركتها عبر الغشاء النووي وصولا الى النواة التي يعتقد انها تتم ببروتينات مكيفة . ويلعب MAPK دورا مهما في إيقاف دورة الخلية استجابة للفرمونات وذلك لان تزاوج اثنين من الخلايا الفردانية يجب ان تكون في مرحلة متزامنة من دورة الخلية ، وكل واحدة منهم تساهم بـ (n) من الكروموسومات لتكوين اللاقحة Zygote ذو العدد المزدوج من الكروموسومات .

ومعاملة الخلايا بالفرمونات يؤدي الى إيقاف الخلايا في مكان قبيل عملية التبرعم وعملية بدا تخليق DNA أي توقف كخلية غير متبرعمة وبها (n) من DNA او الكروموسومات . والتوقف عند المرحلة G1 لا يعني توقف النمو او تثبيطه وإنما تحصل إعادة توجيه للعمليات لتكوين نتوات التزاوج .

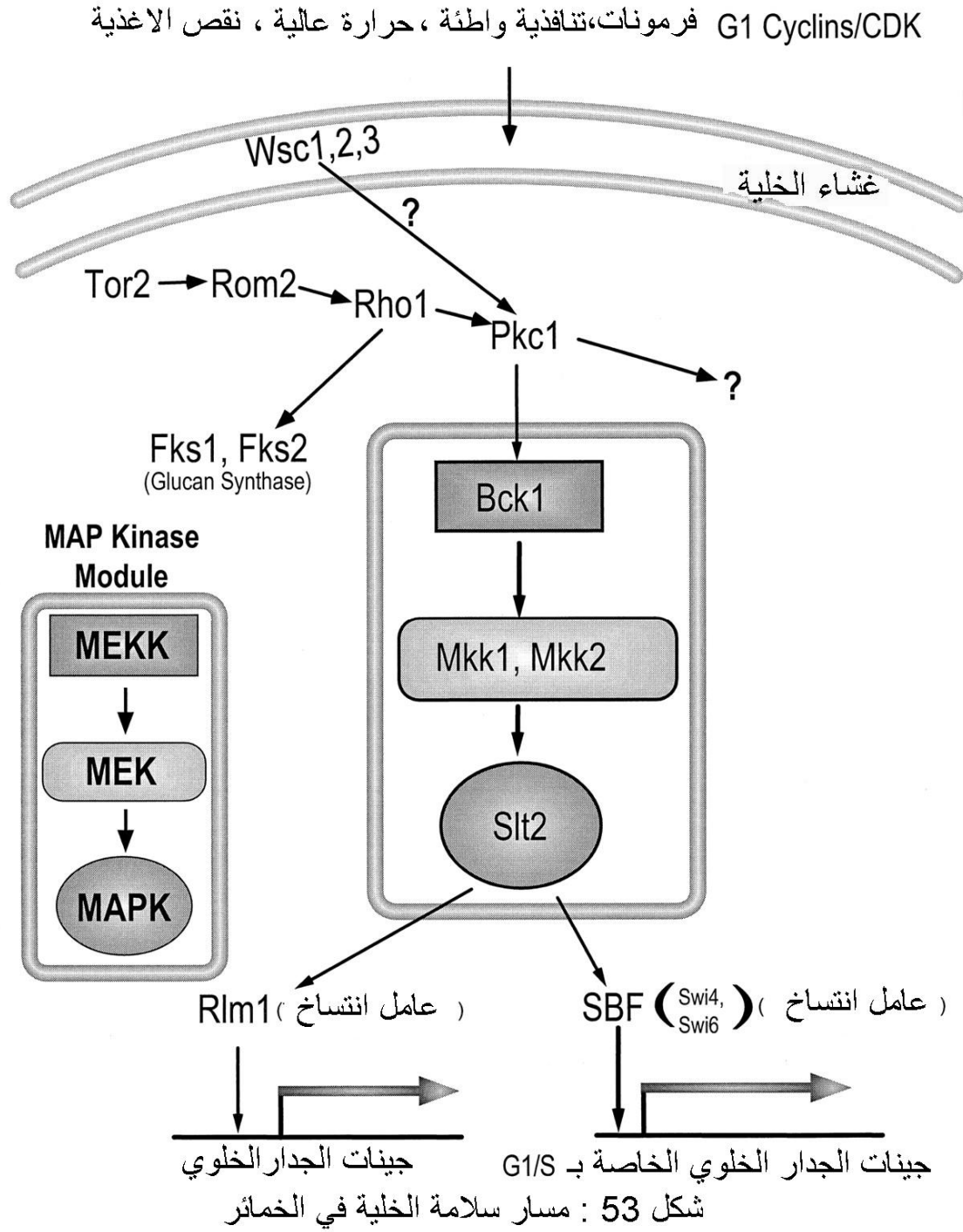
وبذا تتذبذب مكونات MAPK اذ تزداد في بداية مرحلة G1 وتنخفض عند نهايتها ، وهذا التذبذب ينظم بـ G1 cyclins . والأحداث تكون على مقياس زمني محدد ، فالمدة بين الحدث ونقل الإشارة وظهور الاستجابة تتراوح بين 1.5 – 3 ساعة والتي تتوقف أثناءها دورة الخلية .

وفي الخلايا الحيوانية تكون حركة المعقدات الى داخل النواة تحت تحفيز عامل النمو وهذا يعني ان الحركة تشمل انفكاك المعقد السايكوبلازمي من MAPK المفسفر (MEK او MAPKK) ، ولذلك يظهر MEK في السايكوبلازم بعد معاملة الخلايا بعامل النمو ، ولكن في بعض الأحيان فان MEK يحث ويتحرك من السايكوبلازم الى النواة بعد المعاملة او التحفيز بعامل النمو . واذا كان هناك طفرة في موقع إشارة التصدير الى النواة Nuclear export signal او مواقع الفعالية في MEK تؤدي الى تعطيل احد الفعاليات وخاصة موقع إشارة التصدير للنواة فان ذلك يحفز حصول تغيرات شكلية معتمدة على MEK وتوليد الأورام الخبيثة .

مسار سلامة الخلية Cell integrity pathway

ويسمى ايضاً مسار كايينيز البروتين المذكور سابقاً . ويتوسط MAPK بتفاعلاته المتسلسلة في خلايا الخميرة للحفاظ على سلامة الخلايا ، والمسار موضح في الشكل (53) . ويساعد المسار في الحفاظ على أحداث دورة الخلية بالاستمرار بالترتيب المرسوم لها ، اضافة الى استجابتها لمختلف الاشارات مثل الحرارة ، التغير بالضغط التنافذي الخارجي ، استلام إشارات الفرمونات المتمثلة باستجابة الخلايا للتزاوج ونمو نتوءات التزاوج . وبروتينات الإشارة العاملة في المسار هي البروتينات التي ترتبط بـ GTP مثل كايينيز البروتين C (PKC 1p) . ويتصل المسار بعدة تفرعات ويشترك مع مسارات أخرى . وبروتينات الغشاء المسؤولة عن استلام إشارات المسار كما موضح في الشكل هي Wsc 1p ، والمسار يشابه ذاك الموجود في الخلايا الحيوانية وينظم نمو وتكاثر الخلايا ، ولكنه يغلق عند اندماج الخلايا في حالة التزاوج ولكن بشكل مؤقت .

وفي الحالة الطبيعية لمسار الخلية يحدث التبرعم في المرحلة الانتقالية بين G1 وطور تخليق DNA (S) بعد عبور نقطة السيطرة START والتي تحتاج الى عدد من الكاينيزات المعتمدة على المدورات Cyclin – dependent kinases مع G1 cyclins والتي عندها يحصل انتساخ للجينات العاملة في بناء الجدار الخلوي .



ولمسار سلامة الخلية تأثيرات على النواحي الفسلجية ، فتفعيل مسار سلامة الخلية يؤدي الى زيادة ايون الكالسيوم الذي يساعد الخلايا في تحسسها للحرارة ، كما انه يساعد في استجابة الخلايا لفرمونات التزاوج والمشاركة في استجابة الخلايا عند هبوط الضغط التنافذي اضافة الى إنجاح الحالة الانتقالية من مرحلة G1 الى طور التخليق S في دورة الخلية . ولهذا يلاحظ ان هناك تناسقا بين فعالية مسار سلامة الخلية مع المسارات التي يشارك فيها ايون الكالسيوم ، ولذلك تموت الخلايا

التي اعطى فيها Calcineurin (وهو بروتين يعمل في مجال التنظيم ويعتمد على ايون الكالسيوم في فعاليته) ، اذ يتلاشى منها الكالسيوم وتموت عند معاملتها بالفرمونات ، وكذلك الحال في الخلايا التي تكون فيها المسارات التي يشارك فيها الكالسيوم سليمة ولكن مسار سلامة الخلية منقوص فإنها تموت عند المعاملة بالفرمونات مما يشير الى اشتراك الاثنين بشكل متوازي في بعض اجزاء المسار .

مسار تجميع جدار البوغ

وهو مسار اخر يشارك فيه MAPK . فخلايا الخميرة مزدوجة الكروموسومات التي تنتج بعد التزاوج او عند تعرضها للمجاعة او نقص النتروجين وقلة مصادر الكربون القابلة للتخمر تقوم بتكوين الابواغ التي تكون مقاومة لعدد من الظروف غير الملائمة . وعملية تكوين الابواغ عملية معقدة جدا وتحدث بعدة خطوات ، وفيها تسحب الخلايا من دورة الخلية وتحصل فيها عدة أحداث وتغيرات متتابعة تشمل التعبير عن عدد من الجينات ثم تعاني من الانقسام الاختزالي I , II ، ثم تلي ذلك عملية تجميع مكونات جدار البوغ حول أربعة انوية فردانية وتتم هذه التغيرات بواسطة عدد من البروتينات ويلعب مسار MAPK دورا مهما في تجميع جدار البوغ .

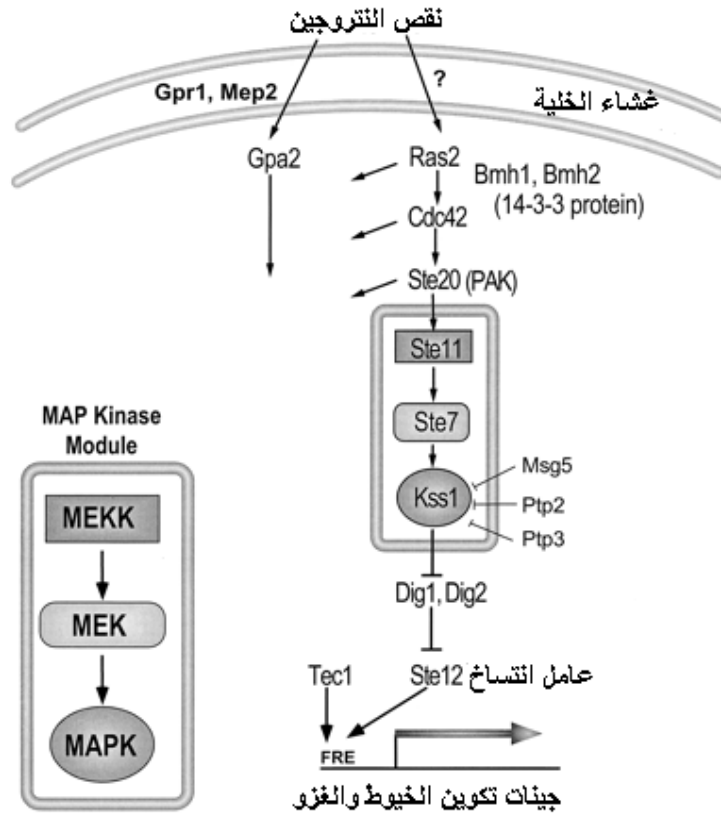
وفي نهاية العملية ينتج جدار البوغ المتكون من عدة طبقات ، اثنان داخلية مكونة من الكلايكان Glycan والكيتين ، وطبقة خارجية تحوي على بروتينات مرتبطة بالتايروسين – Dityrosine linked proteins تتجمع حول الانوية الفردانية الأربعة داخل الخلية الواحدة وكل منها بوغ كيسي Ascospore ويكون تكوين هذه الطبقات مرتبط بنمط زمني محدد بفاعلية MAPK .

مسار تكوين الخيوط

تعاني الخمائر من تغيرات مورفولوجية تحت ظروف معينة ضمن ظاهرة تغيير الأشكال الثنائي Dimorphism وتكون هايفات كاذبة وهي التي تنشأ بالتبرعم والتي تختلف عن الهايفات الحقيقية التي تتكون من استطالة طرفية للخلايا وحدوث انقسام يشبه الانشطار العادي . اما تكون الهايفات الكاذبة فيحدث في الخمائر مزدوجة الكروموسومات التي تنمو مكونة مستعمرات ذات حافات خشنة لتغزو الأوساط الغذائية ، والمحفز لها هو نقص النتروجين بشكل رئيس ، وان كانت هناك بعض العوامل التي تشجعه مثل تحسس بعض الفطريات للمؤثرات الميكانيكية الخارجية . ويحدث المسار بمشاركة MAPK الموضح في الشكل (54) .

ويتم تنظيم تكوين الخيوط بتوالي خاص في DNA وهي العناصر المسؤولة عن تكوين الخيوط والغزو Filamentation and invasion response element (FRE) وتكوين الخيوط يحتاج الى تغيير موقع التبرعم من ثنائي القطب او غيره من المواقع الى تبرعم قطبي واحد Unipolar ويحتاج المسار متحسسات لنقل إشارة الجوع للنتروجين والذي يتم بواسطة بروتينات غشائية مثل Mep 2p وهو يشبه ناقلات الامونيوم ويشترك في نقل الإشارات الخاصة المعتمدة على النتروجين

وهو من بروتينات التحسس Sensor proteins ، وتنقل الإشارات ببروتينات ترتبط الى GTP وهي Ras 2p ويليه Cdc4 2p الموضحة في الشكل المذكور .



شكل 54 : مسار تكوين الخيوط Filamentation في الخمائر

وتحدث عملية تكوين الخيوط في خميرة الخبز المزدوجة α / a تحت مجاعة النتروجين وهي استجابة منتشرة في الطبيعة ، ويؤدي هذا الى تغيير مظهري وتغيير نمط التبرعم وتحول الخلايا من الشكل البيضوي الى المستطيل وتبرعم عند الأقطاب ولا تنفصل البراعم المتكونة وانما تكون براعم ثانوية مؤدية الى تكوين سلسلة من الخلايا المتصلة مع بعضها ولهذا يمكن ان تغزو الأوساط المحيطة التي تنمو عليها مما يساعدها في الحصول على مواد غذائية اكثر . ويمكن ان يحصل غزو الأوساط من قبل الخلايا الفردانية a او α في المزارع القديمة عند قلة المواد الغذائية ولكن بشكل اقل من الخلايا مزدوجة الكروموسومات وتكون ايضا تحت سيطرة MAPK .

ولظاهرة تغير الأشكال علاقة وثيقة بالامراضية والضرارة لبعض الخمائر خاصة *C. albicans* التي تمثل كائن انتهازى ممرض خاصة في الأشخاص معلولي المناعة والتي أصبحت من الإصابات المنتشرة في المستشفيات . وتكون الخلايا الفردانية غير ممرضة اما مزدوجة الكروموسومات فتكون ممرضة .

ويعتمد تنظيم التشكل الثنائي ايضا على مستويات cAMP في الخلايا ، فعند ارتفاع مستواه فانه يشجع النمو الخيطي . وعلى العموم فان تكون الخيوط يساعد الخلايا على إنتاج الانزيمات المحللة للحصول على المواد الغذائية تحت اجهاد المجاعة والتي تكون عادة مرافقة لزيادة أمراضيتها بالنسبة للحيوانات وكذلك الحال مع الخمائر التي تصيب النباتات .

تأثير الاجهادات الأخرى على الخمائر

تتعرض الخمائر في بيئاتها الى العديد من عوامل الاجهاد غير المذكورة اعلاه ، التي يمكن معالجتها بالاستجابات العامة (GSR) General stress response وتحث بمدى واسع من العوامل المجهددة مثل ارتفاع درجة الحرارة او مجاعة النروجين ووجود الكحول وخاصة الايثيلي الذي ينتج تجاريا من الخمائر وكذلك السوربات Sorbate التي تستعمل لحفظ الأغذية من تأثير الخمائر وكذلك التغير في الارقام الهيدروجينية الخارجية .

والجينات العاملة في الاستجابات العامة تحوي على STRE (المارة الذكر) وهي تشكل جزءا من ممهدات الجينات التي تستحث بالاجهاد وهذه STRE يمكن ان ترتبط الى عوامل انتساخ خاصة مثل MSN2 , MSN4 وقد وجدت تواليات مشابهة للـ STRE في عدد كبير من الجينات ، وكما ذكر آنفا ان GSR تعمل في مجالات الاستجابة العامة لذلك يلاحظ انها يمكن ان تضيف الحماية المتداخلة للاجهادات المختلفة .

ومن الاجهادات التي تتعرض لها الخمائر إضافة الى ما ذكر :

الحرارة

تؤدي الى حث استجابة الصدمة الحرارية (HSR)Heat shock response خاصة عندما تتعرض الخلايا لحرارة دون المميتة ، وتستحث الاستجابة أيضا تحت ظروف أخرى مثل زيادة تراكيز المعادن الثقيلة وزيادة تركيز الكحول وقلة التهوية ، وتحتاج الاستجابة للصدمة الحرارية الى وجود عامل انتساخ خاص بالحرارة (HSTF) Specific heat shock transcription factor الذي يرتبط بالـ DNA ويؤدي الى انتساخ مجموعة من الجينات الخاصة بإجهاد الحرارة وتكون الجينات حاوية على توالي في ممهداتها هو (HSE) Heat shock element ويكون ارتباط العامل للـ DNA معتمدا على عملية التنشيط بالفسفرة المعتمدة على الحرارة . والاستجابة تقدر او تبدأ عند تجمع البروتينات الممسوخة وكذلك مشاركة الأغشية الخلوية الفعالة التي تساهم في نقل إشارة الإجهاد الحراري وتحولها الى إشارات حيوية . وفي المشاركة الأخيرة تلعب دهون الأغشية الدور الأساسي في تحديد الاستجابة للإجهاد الحراري

والحرارة اللازمة لأقصى تنشيط في الخمائر تتراوح بين 40 – 50 °م ويكون ذلك معتمدا على مستوى الحوامض الدهنية غير المشبعة الموجودة في الأغشية . وتزداد النسبة المئوية للحوامض غير

المشبعة في أغشية الخلايا التي هي تحت الإجهاد الحراري ، ويمكن ان تشارك دهون الأغشية في تنشيط STRE تحت إجهاد الحرارة والملح وبذلك يظهر ان الدهون الموجودة في الأغشية الخلوية والبروتينات المرتبطة بها هي الأهم في حث الاستجابة .

وفي الخلايا المجعدة حراريا يمكن ان تزداد الحوامض الدهنية غير المشبعة بنسبة تصل الى 9 % من دهون الأغشية ، وتحصل زيادة في مثل هذه الحالة في C16:1 بنسبة 8.5 % ونقصان في C18:1 بنسبة 0.5 % . وبعد زيادة الحوامض الدهنية غير المشبعة تقل استجابة STRE سواء كانت مستحثة بالحرارة او غيرها مثل الملح .

وتتداخل الاستجابة للحرارة مع الاستجابة لوجود تراكيز عالية من كلوريد الصوديوم ، فعند تنمية خلايا خميرة الخبز في وسط يحوي على 250 ملي مول كلوريد الصوديوم فانه يؤدي الى زيادة نسبة الحوامض الدهنية بنسبة 12.5 % (C16:1 بنسبة 10.5 % و C18 : 1 بنسبة 2 %) وهذا يشير الى ان تغير نسب الحوامض الدهنية غير المشبعة تؤثر بشكل متداخل لحماية الخلايا تجاه هذين العاملين المجعدة للخلايا .

والخلايا ذات المستوى العالي من الحوامض الدهنية غير المشبعة في أغشيتها تكون اقل تحسسا للحرارة وهذا يعني ان STRE يقل تحسسا للحرارة والذي يحتاج الى رفع الحرارة بفارق 25° م كي تتحسس في حين انه في الحالات الطبيعية يمكن ان يؤدي رفع الحرارة بمستوى 4° م الى تحفيز الاستجابة

وقد وجد ان جينات الاستجابة للصدمة الحرارية HSR يقل نشاطها بعد 4 ساعات من بدء التحفيز أي بعد ان تكون قد وفرت الحماية للخلايا وذلك بإحداثها تغييرات في دهون الأغشية والذي يعد العامل الأهم الذي بواسطته تتأقلم الخلايا لإجهاد الحرارة والملح على المدى الطويل .

ومن جهة ثانية فان الحرارة المرتفعة تؤدي الى تحفيز الجينات المسؤولة عن تخليق بروتينات الصدمة الحرارية مثل Hsp70 , Hsp82 ويتغير مستوى الحث والتعبير عن جينات هذه البروتينات اعتمادا على مستوى الحوامض الدهنية غير المشبعة . لذلك يعتقد انه في الخمائر يوجد منظم حراري Thermostat مرتبط بالأغشية له دور في حث مسارات الإجهاد الحراري والذي يؤدي بدوره الى تغيير النسب المئوية ونوعية الحوامض الدهنية غير المشبعة في الأغشية الخلوية .

والتحمل الحراري Thermotolerance يقاس بقابلية الخلايا على الصمود للحرارة المميتة ، اما قلة حساسية الخلايا للحرارة فيتم بواسطة مسارات الاستجابة للصدمة الحرارية (HSR) والاستجابة للاجهادات العامة (GSR) في خلايا حاوية على مستويات عالية من الحوامض الدهنية غير المشبعة ، فالخلايا الحاوية على تراكيز عالية من الحوامض الأخيرة يمكن ان تقاوم الإجهاد الحراري بدرجة كبيرة ، وهذا يعطي الإمكانية لهندسة الخلايا وجعلها تقاوم الإجهاد الحراري

والملحي بواسطة تغيير نسب الحوامض الدهنية التي تحويها . واستجابة الخلايا للحرارة المرتفعة يحفز او يفعل مسار الحفاظ على سلامة الخلية ويكون ضروريا عند نمو الخلايا بدرجات حرارة عالية .

إجهاد المواد المطفرة

من المواد المطفرة العوامل المؤكدة Alkylating agents والتي تضيف مجموعة مثيل الى ذرات النتروجين في البيورينات ويمكن ان تضيف مجموعة مثيل للبروتينات ، وهذه العوامل تحث في الخمائر عددا من الجينات منها خاصة بالنقل ABC transporters وأخرى تعمل في N-glycosylation ، إضافة الى جينات أخرى تعمل في إصلاح DNA ، ويحدث تداخل بين الجينات التي تحث تحت إجهاد المواد المطفرة وتلك التي تحث بتأثير بيروكسيد الهيدروجين ومنها الخاصة بتخليق Thioredoxin reductase والمشاركة هذه تشير الى احتمال وجود مكونات مشتركة بين نوعي الاجهاد ، او ان الاثنين تحفز مكونات مشتركة تشترك في عمليات التنظيم مما يؤدي الى تحفيز جينات متشابهة ، وبذلك فان تعريض الخلايا لمدة قصيرة لبيروكسيد الهيدروجين يؤدي الى حماية الخلايا من جرعة عالية من بعض العوامل المطفرة والعكس صحيح . وتستحث هذه العوامل جينات عاملة في دفع الأدوية الى الخارج Multidrug efflux transporters .

إجهاد المعادن الثقيلة

سيتم مناقشة الموضوع بشكل مفصل عند دراسة علاقة التقنية الحيوية بالبيئة ، ولكن لا بأس من ذكر بعض الحقائق حول تأثير المعادن الثقيلة على الخمائر بشكل خاص وتداخلاتها مع الاستجابة لاجهادات أخرى .

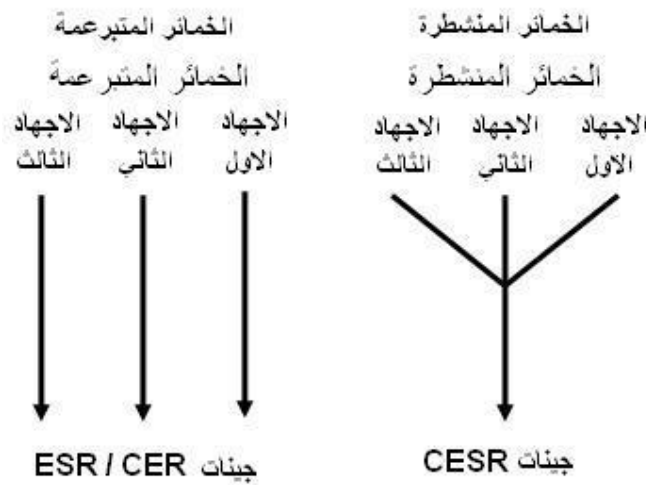
بعض المعادن الثقيلة تكون ملوثات بيئية مهمة ويتفاعل عددا منها مع مجاميع الثايول في البروتينات ويؤدي الى العديد من التأثيرات الفسلجية . والحيوانات يمكن ان تعالج هذا الاجهاد بتكوين Metallothioneins والنباتات تكون الخلابات النباتية Phytochelatins وهي مكوثرات للكلوتاثايون . اما الخمائر فتكون الكلوتاثايون GSH والذي يسيطر على مستوى العناصر بعملية الاقتناص او الاحتجاز .

فعند وجود الكادميوم في بيئة الخمائر فانه يؤدي الى استثارة الاستجابة للحرارة و بيروكسيد الهيدروجين ايضا ، ولكن الاستجابة للعنصر تكون متخصصة جدا ، وهناك 32 جين يتم حثها عند المعاملة بالكادميوم منها 2 من جينات الاستجابة العامة وأخرى خاصة وتحث بشكل كبير منها الجين المسئول عن نقل الكبريتات والتي تساهم في تخليق الحوامض الامينية الحاوية على الكبريت اللازمة لتخليق الكلوتاثايون والخابلات التي ترتبط بايون الكادميوم وتقوم بالتالي بضخ الايون الى الفجوات بنواقل معتمدة عليها . ويكون تخليق الإنزيم Glutathione synthetase مرافقا لتخليق الحوامض

الامينية الحاوية على الكبريت مثل السستئين والميثايونين . وفي خميرة الخبز تكون اغلب الجينات العاملة في تخليق الحوامض الامينية الحاوية على الكبريت مستحثة بالكادميوم .

تأثير الاجهادات في الخمائر المنشطرة : تمثل الخمائر المنشطرة وسائل دراسية ملائمة منها *Sz. pombe* لفهم الآليات والمسارات الجزيئية اذ ان كل الخلايا يمكن ان تشعر بالبيئة وتتفاعل معها بأنماط مختلفة . وهذه المجموعة من الاحياء حقيقية النواة التي تستعمل كمضاييف لغرض إنتاج البروتينات ومنها العلاجية للأحياء الراقية .

وتختلف طرق تنظيم الاستجابات في الخمائر المنشطرة عن تلك الخاصة بالخمائر المتبرعمة كما موضح في الشكل (55) .



شكل 55 : الاختلافات في تنظيم الاستجابة للاجهادات المختلفة في الخمائر المنشطرة والخمائر المتبرعمة

والخميرة المنشطرة *Sz. pombe* خلايا اسطوانية تنمو باستطالة الخلايا عند النهايات ، ويحصل الانقسام الخلوي عندما تصل الخلايا حجم حرج والذي يكون ثابتا خلال دورات الخلية المتعاقبة تحت الظروف المتماثلة ، وعند الانقسام يتكون حاجز وسطي يقسم الخلية الى خليتين بنوية متساوية . والانقسام يسيطر عليه بتنشيط الكاينيزات المعتمدة على المدورات (Cdk) التي تعد المنظمات الرئيسة للانقسام الخيطي . في الطور البيني يتكون Cdk ويبقى بشكل غير نشط بعد فسفرته بواسطة كاينيز التايروسين . وينشط Cdk (Cdc2) وذلك بإزالة الفوسفات بواسطة Cdc2 phosphatase ، وذلك لان تعريض الخمائر للاجهادات تحفز فيها استجابات عامة Core environmental stress response (CESR) والتي يسيطر عليها بـ MAPK والذي يسمى في هذه الخميرة Sty 1p وعامل الانتساخ Atf 1p . بالاضافة الى ذلك تحوي الخميرة على

مسارات خاصة باجهادات خاصة اقل اعتمادا على Sty 1p وتكون معتمدة على عوامل تنظيم خاصة بها .

والخميرة مثل باقي الأحياء التي تواجه البيئة بشكل مباشر وتعاني من العديد من التغيرات خاصة وانها لا تستطيع العيش تحت ظروف مثالية . وتعريض الخلايا لمستويات واطئة من العوامل المجهدة يؤدي الى توليد مقاومة وقتية او عابرة ، والتطبع العابر يمكن ان يقود الى زيادة المقاومة لجرع اكبر وكذلك إمكانية حصول مقاومة متداخلة لاجهادات اخرى ، وهذا يشير الى ان ظاهرة الحماية المتداخلة لاجهادات مختلفة يمكن ان يحفز وينشط آليات متشابهة .

والمسار الرئيس في الخميرة المنشطرة كما ذكر انفا هو Sty 1p ويفسر بعدد من الاجهادات وتنشيط الكاينيز الذي يفسره يؤدي الى ظهور حساسية متعددة Pleiotropic sensitivity وهذا يشير الى انه يعمل في الاستجابات العامة وهو مشابه للـ MAPK و HOG في خميرة الخبز المتبرعمة ومشابهاتها في أحياء اخرى مثل JNK و P38 . ولذلك يلاحظ ان كل من Sty 1p و JNK و P38 تحفز باجهادات متعددة في حين ان HOG يحفز الاستجابة باجهاد الضغط التنافذي . ويقوم Sty 1p بتنظيم عمليات الانتساخ المعتمدة على الاجهاد (على الأقل بشكل جزئي) بعامل الانتساخ Zn-finger transcription factor (b- ZIP) او Atf 1p وهذا يشبه ما يحدث في خلايا اللبائن عندما يتم التحفيز بالعامل ATF2 ، ويقوم Sty 1p بفسفرة Atf 1p ثم ينتقل الاخير الى النواة لفتح التعبير عن الجينات الخاصة .

والاستجابة يمكن ان تساعد في التعبير عن حوالي 140 جين وكبح حوالي 100 جين . وتتفاوت درجات التعبير عن الجينات ومستوى البروتينات التي تنتجها ، والبروتينات الناتجة تؤدي وظائف تحت اجهادات مختلفة ولكن هناك بروتينات لها وظائف عامة منها :

- بروتينات تعمل في ايض الكربوهيدرات مثل تخليق التريهالوز والإنزيمات العاملة في ايض الفركتوز وتخليق الإنزيمات العاملة في تخليق المكافئات المختزلة NAD(P)H وتخليق انزيم Glucose dehydrogenase و انزيم Glycerol – 3p dehydrogenase
- المجموعة الثانية هي المسؤولة عن الوسائل المضادة للأكسدة مثل الكاتيليز و

Glutathione reductase و Glutathione S- transferase و Glutaredoxin و Thioredoxin و Metathioneine والبروتينات والانزيمات المسؤولة عن التدمير Ubiquitination .

- بروتينات الصدمة الحرارية .
- بروتينات تشارك في إصلاح DNA .

• جين يشفر لمستلم Benzodiazepine الذي يسيطر على تخليق الستيرويد في المايكوبلازما والذي يشير الى دور المستلم في مقاومة الخلايا للاجهادات ويوضح الدور المحوري للمايكوبلازما في مسارات الاستماتة المستحثة بالاجهادات .
وهناك مجموعة من الجينات العاملة في الاستجابة العامة تقوم بعمليات السيطرة على فعاليات بروتينات الاجهاد او تعمل في مجالات الاستجابات الثانوية كي تسهل عملية التطبع للاجهاد ، وهي جينات تشفر لعوامل الانتساخ وكذلك جينات الإشارة Signal stress genes ، وتشمل الجين المشفر لكيناز البروتين Protein kinase A (PKA) الذي يلعب دورا في عمليات التنظيم بعد التعرض للاجهاد البيئي .

اما الجينات التي تكبح في مسارات الاستجابة العامة (والتي تقلل بروتيناتها) تشمل حوالي 11 جين (المهمة) ، وتعد الجينات مكبوحة فيما اذا قل التعبير عنها مرتين او اكثر لثلاث من أنواع الاجهادات باستعمال طرق التقدير المعتمدة على DNA microarray والتي تقيس mRNA . ومن الجينات التي يقل التعبير عنها :

• الجينات المسؤولة عن تخليق الرايبوزومات و tRNA والبروتينات العاملة في معالجة RNA splicing وكذلك بعض البروتينات العاملة في بدء عملية الترجمة .

• بعض بروتينات النقل .

• تقليل إنزيمات الانتساخ RNAP I , II , III .

• بعض مكونات نقل الإشارات الخلوية .

• البروتينات العاملة في تنظيم الهيكل الخلوي .

ومن المقارنة بين خميرة الخبز المتبرعمة والخميرة المنشطرة وجد ان عددا من الجينات تكون ثابتة ومحافظ عليها من ناحية التعبير مما يشير الى العلاقة التطورية بين هذين الكائنين .

وتحوي الخميرة المنشطرة على استجابات متخصصة SESR المسؤولة عن مجاميع ثانوية وخاصة من الاجهادات مثل Pap 1p وهو عامل انتساخ يعمل عند الاجهادات التأكسدية مثل التعرض لتراكيز واطئة من بيروكسيد الهيدروجين ولكن عند التراكيز العالية من البيروكسيد يكون عامل الانتساخ Atf 1p هو الفعال . وازافة الى اجهاد الأكسدة فان Pap 1p يساعد في مقاومة الأدوية والمعادن الثقيلة .

واستجابات SESR المتخصصة تعمل في التطبع للاجهاد وتكون متخصصة باجهاد واحد وفي احيان اخرى تكون مشتركة بين نوعين او ثلاثة من الاجهادات ، مثل تداخل تأثير بيروكسيد الهيدروجين والحرارة ، او البيروكسيد مع الكاديوم ، او تداخل الحرارة مع الكاديوم ويمكن ان

يشترك تأثير بيروكسيد الهيدروجين مع بعض المواد المطفرة . وهذه المشاركات يمكن ان تشير الى ان الاجهاد قد تكون لها نتائج متشابهة على الخلايا مؤدية الى تحريك مجموعة جينات الدفاع نفسها . وبصورة عامة فان الاجهادات بالإضافة الى تأثيرها في التعبير عن الجينات فهي تؤثر على حركات التعبير فالبعض تكون سريعة ولمدة قصيرة او غيرها من الأنماط .

الإجهاد الحراري والمعادن الثقيلة

يحث الاجهاد الحراري الخميرة المنشطرة على تخليق بروتينات الصدمة الحرارية والتي تساعد في الحد من الآثار المدمرة للحرارة وذلك بإصلاح البروتينات المتضررة او احتجاز البروتينات التي لا يمكن تصحيحها ، وتحتوي الخميرة على حوالي 17 من بروتينات الصدمة الحرارية التي تعود الى عوائل مختلفة . والاجهاد الحراري يؤدي الى حث حوالي 31 جين بشكل كبير ويكبح اخرى ويكون ذلك معتمدا على الحرارة والتي يزيد من حثها مشاركة الكادميوم السام للخلايا وتعمل الجينات المستحثة بالحرارة في تخليق بروتينات الصدمة الحرارية ومنها :

• جينات تعمل في المسار المدمر للتخلص من البروتينات المتضررة .

• حث الجين المسئول عن تخليق Cyclophyllin .

• حث بعض الإنزيمات مثل Dipeptidyl peptidase .

وهذه كلها تعمل اما في طوي البروتينات ومعالجة مسخها او تدمير البروتينات التي لا يمكن إصلاحها .

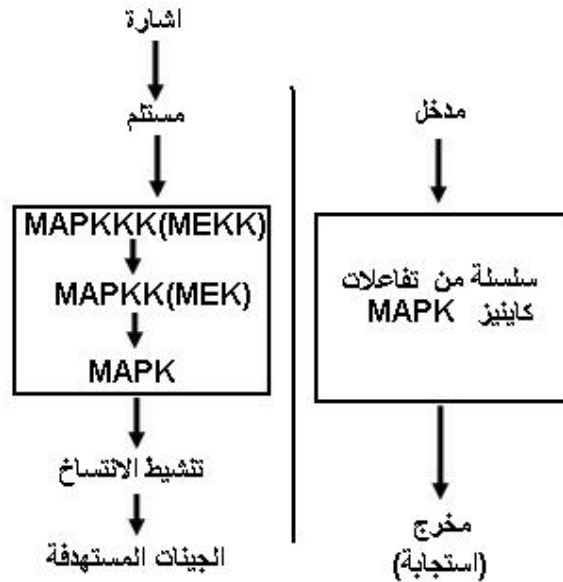
وكما ذكر أعلاه ان الكادميوم والذي يعد من المعادن السامة يمكن ان يحث بروتينات الصدمة الحرارية إضافة الى ذلك فانه يحث انزيم Glutathione reductase ولذلك فالطفرات التي تخلو من الإنزيم تكون حساسة جدا للكادميوم ، ويكون حث الجينات المسئولة عن الحوامض الامينية الحاوية على الكبريت والتي تستعملها الخلايا لمواجهة إجهاد المعادن الثقيلة يكون بشكل اقل من خميرة الخبز التي سبق ذكرها .

إضافة الى ذلك فان الخميرة المنشطرة وعند وجودها تحت إجهاد الكادميوم تحفز الجينات المسئولة عن ناقلات الزنك (Zn) وذلك لان الكادميوم يمكن ان يحل محل الزنك في بعض الإنزيمات والذي يكون سببا في سمية العنصر بعد استنزافه للزنك ، وللكادميوم تأثيرات اخرى في الجينات ذات العلاقة بالزنك .

الاجهادات في خلايا حقيقيات النواة الراقية

معظم دراسات الاجهادات التي تجري في احياء أخرى تستهدف فهم تصرف الخلايا تحت ظروف مختلفة لمقارنتها مع الاجهادات في الاحياء المجهرية بغية الوصول الى أهداف يمكن استعمالها في اكتشاف الأدوية ومعالجة الأمراض الناتجة عن الاجهادات .

خلايا اللبائن تقع ضمن أنسجة وأعضاء لذلك يتوقع ان تكون الخلايا من النوع ذات التحمل الضيق Steno . وفيها يكون MAPK اللاعب الرئيس في نقل الإشارات المستلمة عند سطوح الخلايا ويعد مساره من المسارات الثابتة ويتكون من ثلاث مكونات رئيسة وهي MAPK ويعرف أيضا بـ Extracellular signal – regulated kinase (ERK) والمكون الثاني MAPKK ويعرف بـ ERK – activating kinase (MEK) و MAPKKK ويعرف بـ MEK kinase وهي تعمل بشكل متسلسل كما موضح في الشكل (56)



شكل 56 : أنظمة الاستجابة للاجهادات في خلايا اللبائن

ويتم استلام الاشارات بواسطة المستلمات مثل G – protein receptor و Receptor – tyrosine kinase و His – Asp phosphrylay او بواسطة البروتينات الأساسية في الأغشية الخلوية ، وهذه المستلمات تختلف باختلاف الاحياء . وسلسلة تفاعلات MAPK تؤدي في النهاية الى فسفرة عوامل انتساخ معينة مما يزيد من ألفتها للارتباط بالجينات المستهدفة . والفسفرة تؤدي ايضا الى إمكانية تغير الموقع مثل الانتقال من السايوبلازم الى النواة ، والنتيجة النهائية زيادة انتساخ الجينات المطلوبة وزيادة نواتجها . وعمليات التنشيط بسلسلة تفاعلات MAPK بالفسفرة يمكن ان توهن وتقلل الاشارات بواسطة الفوسفيتيزات مثل Tyrosine phosphatase بعد الوصول الى الاستجابة المطلوبة .

استجابة خلايا اللبائن للإجهاد الحراري

تستجيب مزارع خلايا الإنسان واللبائن الأخرى للحرارة وغيرها من الاجهادات وتقوم بتخليق مجموعة من البروتينات كما هو الحال في الخلايا حقيقية النواة الأخرى مثل الاستجابة في خلايا ذبابة الفاكهة *Drosophila* ، اذ تنشط مجموعة من الجينات وتعطل أخرى ، أي يحصل تغيير في نمط تخليق البروتينات وهذا يعكس نمط اختلاف الانتساخ ، اذ تبدأ الخلايا بانتساخ الجينات المسؤولة عن تخليق بروتينات الصدمة الحرارية وترجمة جزيئات mRNA الخاصة بها . واهم هذه البروتينات في حقيقيات النواة Hsp70 وهو تقريبا ثابت في كل الاحياء وهذا الاستنتاج جاء من دراسة بعض صفاته

- حجمه ثابت تقريبا .

- له نقطة تعادل كهربائي Isoelectric point (Ip) متشابهة .
- له نمط متشابه من البيبتيدات عند هضمه بالترسين .
- الأجسام المضادة المنتجة ضد Hsp70 في الأفراخ لها تفاعلات متداخلة او متقاطعة مع البروتينات المأخوذة من الخمائر والفئران والإنسان والرميح *Xenopus* وذبابة الفاكهة .
- وفي ذبابة الفاكهة تكون عائلة جينات Hsp70 مكونة من بروتينين من بروتينات الصدمة الحرارية Hsp70 و Hsp68 وبروتينات أخرى مرافقة ، والمرافقة لا تستحث كلها بالحرارة وانما ينتج بعضها بحرارة ليست مرتفعة بالنسبة لدرجة الحرارة التي تعيش بها الذبابة .
- وتختلف الأحياء في عدد نسخ الجينات المسؤولة عن تخليق بروتينات الصدمة الحرارية فمثلا في خميرة الخبز تحوي على نسختين في حين تحوي ذبابة الفاكهة على 5 نسخ اضافة الى احتوائها على تواليات تنظيم تقع Upstream بالنسبة للجينات الخاصة بـ Hsp70 وفي الإنسان تكون نسخ Hsp70 مضاعفة ولا تحوي على مناطق اعتراضية Introns ويشاركه في هذه الصفة جينات الهستونات والجين المسؤول عن تخليق $INF-\alpha$ ، وهذه حالة غير اعتيادية في جينات حقيقيات النواة والحالة موجودة ايضا في جينات Hsp70 و Hsp68 في ذبابة الفاكهة ، وربما كان ذلك ان جينات حقيقيات النواة تحتاج الى وقت لظهور نواتجها فيما اذا كانت حاوية على الانترونات .

وفي الإنسان فان الجينات *hsp70* تحاط بتواليات متكررة Repetitive sequences والتي تمثل مناطق ساخنة لعمليات التأشب وحدوث إدلاف للاكسونات Exon shuffling وكذلك حدوث عمليات اعادة ترتيب للجينات .

وعلى العموم عند تعرض خلايا الانسان المزروعة للحرارة او الإصابة بالفيروسات مثل الفيروسات الغدية Adenoviruses يمكن ان يؤدي الى إنتاج بروتينات من عائلة Hsp70 ، والبروتين المنتج يكون بوزن جزيئي Hsp72 وتنتج الخلايا بروتينات أخرى قليلة الوزن الجزيئي Hsp27 اضافة الى تنشيط كينيزات البروتين التي تساعد في نقل الإشارات ، وكذلك يتم تنشيط Akt

وفسفرة Hsp27 وكذلك تنشيط كايينيزات الاجهاد مثل c-jun NH₂-terminal kinase . وعند عدم إمكانية مواجهة الخلايا للاجهادات الحرارية يمكن ان تحفز مسار الاستماتة وكذلك مسار موت الخلايا غير طريق الاستماتة Non-apoptotic cell death .

وتحفز الحرارة عددا من الكايينيزات التنظيمية التي تساهم في تخليق وتنظيم الوصيفات الجزيئية وهذه يمكن ان تساعد في تحويل مسار الاستماتة وتحاول الإبقاء على الخلايا حية . وعليه فان معاملة الخلايا بالحرارة يمكن ان يؤدي الى بقاء بعض الخلايا ويسهل بدء عملية الموت للاخرى والمحصلة من ذلك ان الخلايا التي تبقى حية تكون قد حصلت على صفة تحمل الحرارة إضافة الى تحمل اجهادات اخرى .

واول المسارات التي تساعد في بقاء الخلايا حية بعد الصدمة الحرارية هو مسار الاستجابة للصدمة الحرارية والتي تؤدي الى حث Hsp27 , Hsp72 , Hsp40 , Hsp90 وتكون تحت سيطرة عوامل انتساخ الصدمة الحرارية HSFs . وبروتينات الصدمة الحرارية عند تكونها تساعد الخلايا لمقاومة اجهادات اخرى مثل الكحول الايثيلي ، المعادن الثقيلة ، والاجهاد التاكسدي و الاسكيميا وتأثير عامل النخر TNF .

وبما ان التعرض للحرارة يؤدي الى مسخ البروتينات وتجمعها ، لذلك استهدفت الدراسات المبكرة البحث عن البروتينات الحساسة للحرارة والمهمة والتي تؤدي الى موت الخلايا ، وأسفرت الدراسات الى ان مثل هذه البروتينات هي بروتينات الأرضية في النواة Nuclear matrix proteins وبروتينات الهيكل الخلوي . وتقوم بروتينات الصدمة الحرارية بإعادة طوي البروتينات وإطلاقها من التجمعات وكذلك تفكيك الممسوخ منها والذي لا يمكن إصلاحه . ويكون تجمع البروتينات النووية قليل في الخلايا المتحملة للحرارة والحاوية على بروتينات الصدمة الحرارية ، اذ تظهر هذه الخلايا القابلية على إعادة اذابة البروتينات المتجمعة بعد تعريض الخلايا للحرارة اثناء مدة الشفاء وان وجود Hsp72 يكون كافيا لتقليل تجمع البروتينات النووية ويسرع العمل من إعادة طوي البروتينات بعد الصدمة الحرارية ، وتساعد في ذلك بعض العوامل الاخرى .

وتدمير البروتينات في خلايا اللبائن وكذلك الإنسان يحصل عند ارتفاع الحرارة الى 43 – 45 °م وتقتل الخلايا تحت هذه الدرجة الحرارية ليس عن طريق الأضرار غير قابلة للرجوع وانما عن طريق سلسلة من التفاعلات المبرمجة تؤدي الى موت الخلايا ، وفي هذه الحالة تقوم بروتينات الصدمة الحرارية بحماية الخلايا من القتل بالحرارة وذلك بالتداخل مع برنامج موت الخلايا . فموت الخلايا تحت ظروف غير متطرفة هو ما يعرف بالاستماتة ، اما الخلايا التي تتعرض الى ارتفاع بسيط بدرجات الحرارة والتي تكون غير مميتة لكنها تموت بعد عدة انقسامات وتصبح غير قادرة على تكوين مستعمرات فيعرف بموت التكاثر Reproductive cell death او Colonogenic death وهذا

المسار يختلف عن الاستماتة ولكنهما يشتركان في الأحداث الأولى لنقل الإشارات مثل زيادة ميوعة الأغشية الخلوية بالحرارة وغيرها

مسارات الموت والحياة بالصدمة الحرارية

في حقيقيات النواة الراقية فان الاجهاد الحراري بالاضافة الى حثه الاستجابة للصدمة الحرارية فانه يحث مسار الموت عن طريق تحفيز c- Jun - NH2 - terminal (JNK) وكذلك مسار البقاء عن طريق تحفيز Akt و ERK (المذكور اعلاه) . ومدى تحفيز هذه المسارات ونشاطها هو الذي يحدد مصير الخلايا المعرضة للحرارة . فتنشيط المسار JNK يؤدي الى إخماد الاستماتة ، اما تنشيط مسار Akt و ERK فيفقد الخلايا الى الاستماتة ، ويمكن لمكونات المسار التداخل مع مسار الاستماتة وتعطيلها والإبقاء على الخلايا حية .

ويمكن للـ Hsp72 ان يمنع موت الخلايا من خلال إصلاحه للبروتينات الأساسية الحساسة للحرارة ، كما انه يمنع الاستماتة بتنشيطه لبعض مكونات أجسام الاستماتة Apoptosomes . ومن جهة اخرى يلاحظ ان الوصيفات وبروتينات الصدمة الحرارية من عائلة Hsp70 و Hsp90 تزداد في الخلايا التي هي ليست تحت الإجهاد وإنما في حالة تكاثر ودورها تسير بشكل عادي ، وهذه البروتينات يمكن ان ترتبط بشكل وقتي مع الجزيئات الرئيسة العاملة في أنظمة السيطرة في دورة الخلية مثل Cdk4 , Wee-1 , pRb , p53 , P27/kip1 وتساهم في تعيين مواقع البروتينات ، كما انها يمكن ان ترتبط بالبروتينات الفيروسية التي تصيب الخلايا . إضافة الى ان الوصيفات الجزيئية تعد من الوسائل الأساسية أثناء عمليات التخليق الحيوي للميتوكوندريا .

لذلك فبروتينات الصدمة الحرارية والصغيرة منها على الأخص والتي تكون بحالة فسفرة مختلفة وتجمع قليل Oligomerization تساهم في ادوار معينة من عمليات تكاثر وتمايز الخلايا وتؤدي أدوارا مهمة في دورة الخلية . وكذلك البروتينات عالية الوزن الجزيئي مثل Hsp70 و Hsp90 ترتبط ببروتينات أنظمة نقل الإشارات MAPK وبشكل خاص كينيز Scr وترتبط بـ MEK . وتشارك في تكوين المعقدات غير المتحركة لجزيئات نقل الإشارات وهي تكوين المنصات Scaffolds التي تحدد وظيفة بعض البروتينات في مسارات نقل الإشارات مع الجزيئات المرسية والمكيفة ، كما ان الوصيفات تعمل على طوي البروتينات بشكل يلاءم وظيفتها في كل مسار .

إجهاد الأكسدة في حقيقيات النواة الراقية

هناك تشابه كبير في الخطوط العريضة للطرق المستعملة ضد الإجهاد التأكسدي بين البكتريا وحقيقيات النواة ومن أوجه التشابه :

- تمتلك خلايا بدائية وحقيقية النواة إنزيمات تحليل البيروكسيدات و SODs لغرض تدمير مركبات الأوكسجين الفعالة .
 - جينات *sod* المنقولة من اللبائن يمكن ان يعبر عنها في البكتريا وتؤدي الى حماية كاملة للبكتريا التي ينقصها الانزيم SOD^- من تأثير O_2^- .
 - تتشابه العديد من الإنزيمات العاملة في عمليات الإصلاح للأضرار الناتجة من إجهاد الأكسدة . ولكن الاختلاف يكمن في تنظيم الاستجابة ودرجة تعقيد الاستجابة . ففي البكتريا يكون الحاث هو المادة المؤكسدة نفسها او ما ينتج عن تداخل العامل المؤكسد مع احد مكونات الخلية . اما في اللبائن فان جذور الأوكسجين لا تحت إنتاج المواد المضادة للأكسدة او الإنزيمات العاملة وإنما تحت تخليق بعض الانترلوكينات مثل TNF و IL - 1 . ومن الجدير بالذكر ان اغلب خلايا اللبائن توجد في بيئات لا يتذبذب فيها تركيز الأوكسجين ويبقى بحدود 4 % في مصل الدم ، ما عدا حالات تنشيط العدلات Neutrophils لإنتاج مركبات الأوكسجين الفعالة عند قتل الاحياء المرضية ، وتنشيط العدلات يؤدي الى حث المواد المضادة للأكسدة ويكون TNF من المواد الحاثة القوية .
- عوامل الإجهاد التأكسدي :** يحدث الإجهاد عند التعرض للإشعاع القريب او القصير من أطوال الأشعة فوق البنفسجية او التعرض للإشعاع المؤين ، او من ابتلاع مواد مولدة للجذور أي النشطة من ناحية الأكسدة والاختزال مثل الدواحر النباتية كما في مركب Psoralen في نبات الكرفس (Celery) او غيره من الاسباب .
- وفي خلايا اللبائن ينتج عددا قليلا من البروتينات عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية ومنها إنزيمات Heme – oxygenases , Glutathione transferase او غيره ، ولكن بما ان الخلايا داخل أعضاء وأنسجة فهي لا تتعرض للأشعة فوق البنفسجية ولكنها تنتج هذه الإنزيمات او البروتينات وهذا قد يشير الى ان المركبات الناتجة من التشعيع مثل بيروكسيد الهيدروجين او مركبات الأوكسجين الأخرى هي التي تكون من المواد الحاثة .
- ومن المركبات الخطرة في الإنسان O_2^- الذي هو مادة مسرطنة قوية ويقوم بتنشيط وحث الجينات ذات العلاقة لتكوين المركبات الواقية ومن الجينات المستحثة *c-fos* , *c-jun* , *c-myc* , *β -actin* . ونواتج الجينات هي عوامل انتساخ تقوم بتنظيم عمل الجينات المعنية .
- ومن الآليات المضادة للأكسدة في اللبائن هو حث الإنزيم Calmodulin kinase وزيادة ايون الكالسيوم الذي يساهم باليات مختلفة ضد الأكسدة . ان تركيز ايون الكالسيوم يزداد عندما يدمر الغشاء الخلوي والذي يؤدي بدوره الى تنشيط Phosphokinase C اذ يفسفر وقوم بتنشيط إنزيم Topoisomerase I . كما ان مركبات Phospholipid hyperperoxides التي تنتج من أكسدة

دهون الأغشية الفوسفاتية تحفز إنتاج العديد من الانزيمات مثل ، Glutathione peroxidase ، Phospholipid hyperperoxide reductase ، Phospholipase II .

اما الكسور التي تحدث لأشرطة DNA من جراء الإجهاد التأكسدي فانها تحفز بعض الإنزيمات مثل Poly (ADP- ribose) polymerase ، وبروتينات أخرى مثل Topo I, Fos , Jun والوحدة الثانوية α من إنزيم DNAP . ولعل أهم البروتينات في كبح جماح الإجهاد التأكسدي هو Fos لذلك فهناك أكثر من مؤثر لتحفيزه ، وأكثر المحفزات Poly – ADP – ribosylated compounds وكذلك يحفز بعوامل وعناصر الاستجابة الموجودة في المصل إضافة الى اشتراك cAMP في التحفيز .

وبلغة الأرقام فان استجابة البكتريا لإجهاد الأكسدة يؤدي الى إنتاج حوالي 60 بروتين او أكثر في حين ان خلايا اللبائن تنتج عدد قليل من البروتينات ولكن عمليات ومسارات التنظيم معقدة وبشكل كبير جدا .

اجهاد التنافذ

قد يسلط هذا الإجهاد على مجموعة صغيرة من الخلايا في الاحياء الراقية وهي خلايا الكلى التي تقوم بتصفية السوائل الجسمية لذلك تتعرض لتراكيز عالية من المواد مما يؤثر على ثباتية كروموسوماتها مؤدية الى حث التشوهات الكروموسومية ، إضافة الى حدوث تبادل الكروماتيدات الشقيقي Sister chromatide exchange (SCE) وحدث كسور كروموسومية ولذلك فان هذا الاجهاد يمكن ان يؤدي الى تأخير دورة الخلية وحدث الاستماتة التي تحت بواسطة التراكيز الملحية العالية واليوريا خاصة في Renal medullary cells ، وتساعد الوصيفات وبروتينات الصدمة الحرارية من تخفيف الإجهاد على الخلايا الكلوية .

التوجهات المستقبلية لدراسة الاجهادات المختلفة

بعد زيادة المعلومات حول القواعد الجزيئية للاستجابات الخلوية والتي تؤدي الى إيجاد النمط البروتيني الخاص بالاجهادات والتي تتخطى حدود حث بروتينات الصدمة الحرارية ، لذلك فمن المهم معرفة مكنون البروتين للإجهاد ، وتحتاج عملية الفهم هذه الى معرفة الجزيئات التي لها دور فاعل عند نقاط تشعب شبكة الاستجابات للاجهادات وربما تكون الطريقة المثلى هو إجراء دراسات مقارنة للجينومات ، فقد تبين مما ذكر أعلاه ان الجينات والبروتينات التي تساهم في الاستجابات تعد الأساس للتكيف والتغلب على الإجهاد . فمعرفة هذه الجينات يزود بوسائل فاعلة لغرض التلاعب في تحويل مدى تحمل الخلايا للإجهاد ، فتوفر المعلومات سيؤدي الى تحديد المواد السامة في البيئة ويمكن استخدامها فيما بعد في الدراسات السريرية .

كما يمكن اجراء الدراسات لتحديد فيما اذا كانت الأحياء واسعة التحمل او ضيقة التحمل وذلك بدراسة الجينات الأساسية في الاستجابة وتحديد توالياتها . ولو انه في هذه الحالة فان التعقيد موجود مسبقا وذلك ان بعض الأنواع اكتسب بشكل ثانوي التحمل الواسع وربما باستعمال وتجنيد شبكة جديدة من استجابات الإجهاد الخلوي .

ومن الناحية التطورية والظروف التي مرت على الأرض كانت الاحياء ذات مدى التحمل الواسع هي الناجحة في التأقلم للتغيرات البيئية التي جرت ، وحفاظ الخلايا على مكنونها البروتيني يكون قد شارك في زيادة قابليتها للعيش تحت الأحداث الكارثية التي مرت على الارض وبعد مرور هذه الظروف بقيت الأحياء بدون منافس ، كما ان تطبعها للإشعاع وغيره من الظروف مكنها في البقاء في بيئات مفتوحة .

اما ضيقة التحمل فتكون أكثر تعقيدا وأكثر حساسية للتغيرات المفاجئة في الظروف الجوية على الأرض وذلك لان جينات الاستجابة عندها قد تعرضت للعديد من التغيرات أثناء التطور جعلها قادرة على العيش في بيئات ثابتة . ان بقاء الأحياء ذات التحمل الواسع من التحمل وتعرضها للانتخاب الطبيعي يكون احد العوامل المهمة ضمن عملية التطور Mega - evolution وهو الذي يفسر وجودها على الأرض بكثرة ويشير الى قدرتها العالية للاستجابة للاجهادات .

ان دراسة تحمل الإجهاد ستوضح ان الأحياء المعقدة والكبيرة توجد فيها بعض الأجزاء المهمة التي تكون فيها الخلايا ذات تحمل ضيق وتكون حرجة ومهمة كما في خلايا الكلى ، لذلك لابد من وجود قواعد معلوماتية حول المكنون البروتيني الذي يعبر عنه بشكل مستمر في الخلايا لجعلها قادرة على تحمل عالي للاجهادات وتعديل ذلك عند حصول اضطراب فيه . وقد وجد ان الخلايا في أجزاء الجسم الاخرى والتي يكون فيها الضغط التنافذي عادي لا تحوي على Stress proteome blueprint يشفر من قبل الجينوم .

ان دراسة الأحياء تحت ظروف الإجهاد وتحملها له والكشف عن آليات المقاومة والتلاؤم فيها سيزود بالأساسيات للتطبيقات العملية في التقنية الحيوية او التصنيع الحيوي وكذلك في المجالات الطبية واستغلال الكواكب الاخرى ، فمثلا الأحياء المحبة لحرارة متطرفة من البكتريا والاركية يمكن ان يقود الى تصميم وسائل تحسن من مقاومة الإنسان او النبات لاجهادات معينة مسببة للأمراض .

كما ان دراسة بروتينات الصدمة الحرارية والوصيفات والتي مر ذكر بعض تأثيراتها الصحية تكون مهمة في تصميم الأدوية . فقد مر ان الإنزيمات PPI البعض منها يثبط بالأدوية المحببة للمناعة والتي يطلق عليها بعض الأحيان Immunophilins ومنها ما له القابلية على الارتباط بـ Cyclosporine ويطلق عليها Cyclophilins والموجود بعضها في الاركية يمكن ان تستغل لتصميم الأدوية . وهناك مجموعة أخرى من الإنزيمات في الاركية التي لها القابلية على أكسدة

مركبات Dithiol والأخرى التي تختزل الجسور الكبريتيدية المزدوجة مثل PDIases وغيرها التي يوجد بعضها في حقيقيات النواة يمكن ان تستغل في تصميم الأدوية للأمراض المرافقة للشيخوخة .

التقنية الحيوية الميكروبية والبيئة

الصفحة	الموضوع
289	الأحياء المجهرية والتلوث البيئي
290	أهم الأحياء المجهرية المستعملة للتخلص من التلوث البيئي
292	مصادر الأحياء المستعملة في المعالجات البيئية
293	الدالات الحيوية في البيئة
296	الدالات الميكروبية في بيئة التربة
297	مكونات الدالات المستعملة لفحص البيئة
307	المجسات الحيوية Biosensors
309	المعادن والبيئة
309	التحمل والمقاومة لسمية المعادن الثقيلة
313	مجاميع البروتينات الناقلة للمعادن الثقيلة
319	المعادن والأنظمة الحيوية
334	أهمية وسمية المعادن الثقيلة
337	علاقة التقنية الحيوية بالمعادن الثقيلة
338	الآليات المستعملة من قبل الأحياء المجهرية
338	أساليب استخلاص المعادن والتعدين الحيوي
345	الميكروبات العاملة في استخلاص المعادن
356	المشتتات الحيوية
357	الطرق المستعملة
357	طريقة الأكوام

359	استعمال المفاعلات الحيوية
362	توجهات التعدين الحيوي المستقبلية
366	طرق المعالجة الحيوية
366	معالجة التربة الملوثة
367	استعمال المشتتات الحيوية في معالجة التربة
368	النفط
370	الايض الهوائي للـ Alkanes
375	الايض اللاهوائي للهيدروكربونات
376	إجهاد الهيدروكربونات على الخلايا
379	المعالجة الحيوية للنفط
381	تحسين إنتاج النفط
383	استعمال الإنزيمات
383	المشتتات والمكوثرات الحيوية
385	إزالة الاستحلاب الحيوي
387	معاملة فضلات الصناعات النفطية
387	المجسات الحيوية
390	العوامل المؤثرة على المعاملات الحيوية
391	المعالجات الحيوية المفتعلة
391	المعاملات الحيوية المعتمدة على البكتريا المزركة
394	التلوث الإشعاعي
395	عائلة Deinococcaceae
412	إطلاق الإحياء المهندسة وراثيا للبيئة
416	أمثلة على الأحياء المهندسة وراثيا المستعملة

التقنية الحيوية الميكروبية والبيئة

تمثل البيئة المكان الذي يعيش فيه الكائن . لذا وجب الحفاظ عليها كي يمكن الحفاظ على الحياة . وتلويث البيئة يعني بمرور الزمن القضاء على الكائنات الحية والقضاء من ورائها على الحياة . وفي القرن الواحد والعشرين ورثت البيئة العديد من مشاكل القرون الماضية التي تكاد ان تقضي على الحياة على الأرض ، لذلك كانت البيئة ومشاكلها من اهم التحديات أمام التقنية الحيوية والهندسة الوراثية . والتحديات تطالب بإعادة البيئة الى حالتها البكر الأولى كي يمكن العيش فيها . ولعل البيئة وتلوثها كانت من اهم الدوافع التي أوجدت التقنية الحيوية ورغبة الإنسان في العودة الى أحضان الطبيعة والاعتماد على عناصرها الحية بعدما لاحظ من توارث المشاكل من استعمال التقنيات الصناعية التي تدخل بها ظنا منه لتحسين الحياة وإذا بالأمور تتقلب رأسا على عقب .

عناصر وظروف البيئة

تحدد عناصر البيئة بالأحياء التي تعيش فيها والجانب الثاني من العناصر هو المكان الذي تعيش فيه الإحياء . اما الظروف فتتنوع اعتمادا على مؤشرات شتى ، ومنها الحرارة والتي تمتد على الأرض من درجات عديدة تحت الصفر المئوي لتصل الى 350° م او أكثر في البراكين وغيرها ، وتندرج الملوحة أيضا بشكل متفاوت اعتمادا على الموقع البيئي ، وكذلك الأرقام الهيدروجينية والتي يمكن ان يحصل فيها التطرف على المقياس المعتمد من صفر - 14 او ما دون ذلك . وهناك ظروف الغلاف الغازي للأرض الذي تدخل الإنسان في تغييره بشكل مباشر او غير مباشر وأدى الى ظاهرة الاحتباس الحراري وما يتبعه من كوارث بيئية وهي المشكلة التي تؤرق العالم . وهناك عدد آخر من المؤشرات التي يمكن ان تندرج في الموضوع التي ستناقش في هذا الفصل .

ونظرا لأهمية البيئة وما يتوقع من التقنية الحيوية ان تساعد في إصلاحها ظهر حقل خاص بالموضوع هو التقنية الحيوية البيئية Environmental Biotechnology الذي اهتمت به الدول وما فيها من جامعات ومراكز أبحاث بدراسته ورصدت الأموال الطائلة لمثل هذه التوجهات . وامتد تأثير البيئة ليطال الجوانب السياسية وأصبحت البيئة من مرجحات كفة السياسة في العديد من البلدان وتأسست الأحزاب والفرق لحمايتها .

وكخطوة أولى في الوقت الحاضر يتم عادة تحديد ملوثات البيئة ودراسة قابلية بقاءها في الأنظمة البيئية ، ومحاولة إيجاد البدائل الطبيعية بدلا من الصناعية للحد من التلوث ، وتعد هذه من المواضيع الحرجة والرئيسة للإبقاء على محيط الأرض الحيوي Earth's biosphere بحالة جيدة وذلك ليس فقط للحفاظ على البيئات الموضعية او على مدى منطقة معينة وإنما الحفاظ على نوعية البيئة العالمية لان التلوث اذا حصل في الغرب غدا يصل الى الشرق ولا يمكن إعاقته كما حصل ويحصل في العديد من الكوارث .

الاضطراب والمشاكل البيئية

يلاحظ في الوقت الحاضر ان المشكلة البيئية المتفاقمة هو ارتفاع تراكيز ما يسمى بغازات البيوت الزجاجية Greenhouse gases وفي مقدمتها ثنائي اوكسيد الكربون عن حدودها الطبيعية ، وارتفاع المستوى يؤثر على العديد من الفعاليات الحيوية ، والمهم بالنسبة لموضوع الكتاب هو تداخله مع الأحياء المجهرية .

فارتفاع نسبة غازات البيوت الزجاجية يؤثر على نظام تداخل جذور النباتات مع أحياء التربة المجهرية وذلك بتأثيره على محتوى التربة من الماء ونوعيته . فالأحياء المجهرية هي القوة المحركة لتزويد المغذيات في التربة وكذلك تعد المستلمات الأولى لنواتج التخليق الضوئي (Photoassimilates) من النباتات التي تثبت ثنائي اوكسيد الكربون ، لذلك تستعمل المؤشرات الميكروبية كدليل على سلامة البيئة او التربة على وجه الخصوص ويستعمل دليل الاحياء المجهرية Microbial index لغرض تقييم تعداد الاحياء المجهرية وفعاليتها والذي يعكس بصورة مباشرة دورة العناصر في البيئة وسلامة الأخيرة وإضافة الى دليل الاحياء المجهرية يمكن قياس كمية الكربون في الكتلة الحيوية كنسبة مئوية للمواد العضوية في التربة ، ويمكن قياس الحاصل الايضى Metabolic quotient كدليل على التلوث ، وذلك لان البيئة ستؤثر على أعداد وفعاليات مجتمعات الأحياء المجهرية ، ويعد حاصل او معامل ثنائي اوكسيد الكربون qCO_2 احد الدلائل الحيوية المستعملة لقياس اضطراب النظام البيئي .

ويعد قياس الدلائل الميكروبية مؤشرات حساسة للتعبير عن التغيرات التي تحصل في البيئة ومنها الاجهادات المسببة على الاحياء المجهرية لذلك تستعمل هذه الدالات Indces لتسجيل مدى تلوث البيئة بالمعادن الثقيلة او المواد العضوية السامة او الإشعاع او غيره وكذلك يمكن استعمال الإنزيمات للبحث عن الملوثات كما في استعمال المجسات الحيوية التي سيأتي ذكرها لاحقا .

الاحياء المجهرية والتلوث البيئي

في هذا المجال يمكن ان تكون الاحياء المجهرية على نقيضين متطرفة ، الأول ان تكون هي الملوثات وهذا يكون واضحا مع الاحياء المرضية وما يمكن ان تعينه من دمار في البيئات خاصة المفتوحة منها مثل الهواء او الماء وهذا ليس موضوع الكتاب ، ولكن على الجانب الثاني المشرق هي تمثل الروافد المنقذة للبيئة وقد يتضخم دورها بحيث تصبح في بعض الحالات هي المخرج الوحيد لمعالجة المشاكل البيئية .

فالأحياء المجهرية كما مر ذكره في الفصول السابقة هي أحياء ذات مرونة كبيرة للتلاؤم مع البيئة التي تعيش فيها ، فهي يمكن ان تعيش في بيئات يصعب تصور وجود أي نوع من الحياة فيها . فتوجد في البيئة سواء المائية او التربة العديد من الاحياء التي تطبعت للعيش في مناطق تكثر فيها المواد

الدخيلة Xenobiotics وذلك بتطوير إمكانيات استعمال المواد الدخيلة كمصادر للكربون والطاقة ، اذ ان هذه الاحياء أنشأت شبكة من الإنزيمات والمسارات الحيوية تساعد في تكسير المواد العضوية الى مركبات وسطية يمكن استعمالها في عملياتها الايضية ، اضافة الى إمكانية استعمال المعادن الثقيلة لإنتاج الطاقة من خلال دورات أكسدة واختزال .

وتحوي الاحياء على أجهزة تنظيم فائقة الدقة بحيث يمكنها انتساخ جينات الإنزيمات المستعملة في تكسير المواد المؤذية في الأوقات التي تحتاجها أي عند وجود المواد المراد تفكيكها فقط . وعمليات تنظيم الانتساخ تتم في اغلب الاحيان من تداخل بروتينات منشطة للانتساخ ترتبط الى ممرات الإنزيمات المراد إنتاجها أي تحوي البروتينات على أجزاء ترتبط بالـ DNA المطلوب لتسهيل انتساخه . واغلب الاحيان تعاني البروتينات المنشطة من تغييرات شكلية عند ارتباطها بالمواد المراد تفكيكها . والمعقدات الناتجة يمكن ان تساعد في انتساخ الجينات التركيبية للإنزيمات التي تقع مباشرة الى يمين Downstream الممر في المواد الوراثية .

أهم الأحياء المجهرية المستعملة للتخلص من التلوث البيئي

تحتاج عمليات معالجة التلوث البيئي بكافة أشكاله الى التنوع الحيوي للاحياء المجهرية لتخليص البيئة من التلوث ، لان التنوع الحيوي يضمن وجود عدد من الآليات لمعالجة التلوث ، إضافة الى ان الاحياء تعمل بشكل متآزر للوصول الى أفضل الحلول . وفي مجال التلوث البيئي تحتل البكتريا الدرجة الرئيسة نظرا لما لها من قابليات عالية للتطويع ، كما انها سريعة النمو ويمكن ان تنمو بظروف معتدلة نوعا ما ، ثم تليها الاركيا بالدرجة الثانية ثم تأتي الفطريات والخمائر بعد ذلك ، وربما كان طول وقت الجيل هو الذي جعل الأحياء الأخيرة في المرتبة الثانية . ولكن هذا لا يمنع كون بعض الاحياء وان كانت بطيئة النمو او كون التعامل معها صعبا ان تكون الاختيار الأول اعتمادا على المشكلة التي تعالجها .

ومن بين البكتريا التي برزت كمجموعة مهمة من الناحية البيئية ، في مجال التلوث العام بالمركبات العضوية هي بكتريا *Pseudomonas* على رأس القائمة منها *Ps. aeruginosa* , *putida* لما لها من قابليات في استعمال المواد فقد سجلت إمكانية المجموعة لاستعمال أكثر من 90 من المواد العضوية كمصادر للكربون والطاقة . والصفة المهمة الثانية هي عدم تجاوز الجينات الخاصة بمسارات التفكيك ونادرا ما توجد متجاوزة وبدلا من ذلك تكون تجمعات Supraoperonic clustering للجينات ذات العلاقة الوظيفية ، كما انها تحوي على بلازميدات خاصة لتهديم بعض المواد مثل Tol plasmid . Oct plasmid او بلازميد pWWO .

ومن الاحياء البيئية المهمة في مجال التلوث بالمعادن جنس *Acidithiobacillus* (سابقا *Thiobacillus*) اذ تستعمل بعض أنواعه في التعدين الحيوي *Biomining* وكذلك في التخلص من التلوث بالمعادن والذي سيتم تناوله فيما بعد .

وتعد بكتريا *Deinococcus* والأنواع التابعة لها المفتاح في معالجة تلوث البيئة بالإشعاع ومن الاحياء التي تعد صديقة للبيئة والتي لا يمكن تجاهلها جنس *Acinetobacter* فهي تساعد في عدة مجالات منها

- ◆ التفكيك الحيوي للعديد من المواد الضارة والفضلات الخطرة .
- ◆ تستعمل في عمليات الغسل الحيوي *Bioleaching* عند استخلاص المعادن .
- ◆ تنتج العديد من المواد الحيوية التي تكون مهمة في معالجات البيئة الحيوية *Bioremediation* .

وتنتشر البكتريا بشكل كبير في الطبيعة مثل التربة والمياه وعلى سطوح الكائنات الحية . والبكتريا سالبة لصبغة كرام ، هوائية مجبرة ، أشكالها بيضوية الى عصوية ، قد تتجمع بشكل خلايا مزدوجة ، وتستعمل العديد من المواد كمصادر كاربونية لذلك فهي يمكن ان تستعمل الملوثات كمواذ غذائية مثل *Acetonitrile* , *Biphenyl* , *Chlorinated biphenyl* والتولوين والنفط الخام ، والفينولات والبنزوات والعديد من المواد الدخيلة وتستطيع إزالة الفوسفات فهي يمكن ان تمتص 100 ملغم من الفوسفات / غم وزن جاف للخلايا عند نموها هوائيا ، وتستطيع إزالة المعادن الثقيلة ، لذلك يفضل استخدامها في إزالة الملوثات بدلا من استعمال الطرق الكيماوية وذلك لعدة أسباب :

- ◆ كون العمليات الكيماوية مكلفة .
- ◆ تستغرق العمليات الكيماوية وقت طويل .
- ◆ تؤدي العمليات الكيماوية الى تلوث أكثر .
- في حين ان المعالجة الحيوية *Bioremediation* لها ميزاتها الخاصة منها :
- ◆ رخيصة الكلفة .
- ◆ تحول المواد السامة الى مواد اقل سمية او تزيلها .
- ◆ لا تؤدي الى التلوث ولا تزيد منه .

وتستعمل البكتريا في معظم المعالجات الحيوية للمياه او التربة لإزالة فضلات المصانع او منع انتشار المواد الضارة الناتجة عن الحوادث . وتعود قابليتها المتعددة الى إنتاجها العديد من الإنزيمات حتى المحللة للخشب وكذلك إنتاجها المكوثرات والمستحلبات والمشتتات الحيوية *Bioemulsifiers*

وبإنتاجها للمواد الأخيرة فهي تعد مثالية لمعاملة مشتقات النفط ومخلفاته ، كما انها تزيل العديد من المواد المسرطنة والمسممة للجهاز المناعي البشري الموجودة في البيئة .

مصادر الأحياء المستعملة في المعالجات البيئية

بصورة عامة فان الاحياء المستعملة في معالجات البيئة هي التي تمارس ايض الإجهاد ، وذلك لان التلوث ما هو الا الانحراف عن المعدل الطبيعي للعامل الملوث لذلك تطبعت عليه هذه الاحياء للعيش تحت ظروف الإجهاد . ولذلك كانت الاختيارات الأولى لعزل الاحياء لاستعمالها في المعالجات الحيوية تركز على استعمال البينات المتطرفة للحصول على الاحياء الكفوءة . فمثلا البينات التي ترتفع فيها الحرارة وتبعاً لذلك تتطرف فيها ظروف اخرى مثل الأرقام الهيدروجينية وقلة المواد الغذائية تمثل اختيارات موفقة .

فالترب الحارة Geothermal soils والينابيع الحارة تمتاز بارتفاع درجة الحرارة التي قد تصل الى 70° م وتتنخفض فيها الأرقام الهيدروجينية الى مستويات 1 – 2 ، ومثل هذه البينات تمتاز عادة بقلة النباتات ومحدودية المواد العضوية أي ان الخلايا التي تنمو فيها تكون تحت إجهاد المجاعة . وبما ان الأحياء حقيقية النواة اقل تحملاً للتطرف في الظروف فلذلك تكون قليلة وتكثر فيها البكتريا والاراكيا . ولكن مع هذا توجد بعض الفطريات المحبة للحرارة التي يمكن ان تعيش فيها . وتعد الفطريات محبة للحرارة اذا استطاعت النمو بدرجة حرارة 50° م وعدم إمكانيتها او انخفاض نموها بدرجة حرارة 20° م او اقل .

ومن البينات التي تتطرف فيها الحرارة إضافة الى ما ذكر اعلاه هي بينات كمر الروث ومعامل انتاج المطاط ومصبات المفاعلات النووية اذا تنتج الحرارة من تفكك المواد المشعة ، وترتفع الحرارة ايضاً في مناجم استخراج الفحم وتصنيعه وكذلك أراضي وادي البحر الميت والصحاري . وهذه البينات تحدث فيها دورات حرارية يومية اذ تكون بعض الاحيان واضحة باختلاف الفصول كما ان البعض منها تكون دوراته الحرارية واضحة على مستوى اليوم الواحد ، أي بين الليل والنهار ، كما ان الحرارة تختلف باختلاف العمق سواء في التربة او البينات البحرية .

وعلى العموم هناك علاقة عكسية بين التنوع الحيوي وتطرف الظروف ، وكذلك تكون العلاقة عكسية بين التنوع الحيوي وكمية ونوعية التطبع اللازمة للعيش في بينات معينة ، وعليه يكون التنوع الحيوي اقل تعقيداً في البينات المتطرفة .

وتقل الاحياء حقيقيات النواة في البينات المتطرفة لذلك ندر عزلها ووصفها في مثل هذه البينات ، ولكن توجد بعض الفطريات المحبة للحرارة والتي يمكنها النمو بدرجة 55° م وأنواع تكون متحملة وليس محبة لها . ومنها الفطريات *Dactylaria constrictum* , *Acremonium alabamense* ، والملاحظ ان هذه الفطريات يتحسن نموها في البينات الحارة اذا كانت متعايشة مع النباتات اذ تقوم

الأخيرة بتزويدها بالمواد الغذائية عن طريق إفرازات الجذور ، او تعيش بشكل رمي عليها وذلك لان التطرف في احد العوامل يمكن ان يجعل البيئة فقيرة بالمواد الغذائية Oligotroph وهذا يعني ان التحمل الحراري للفطريات يزداد بالحياة التعايشية .

كما ان الفطريات في المناطق الحارة او غيرها من البيئات المتطرفة يمكن ان تبقى حية بتكوينها للأجسام الحجرية Sclerotia عند تعرضها للحرارة لمدة طويلة ، اذ امكن عزل بعض الفطريات من ترب تصل حرارتها الى 107°م ولكن هذه الفطريات يمكن ان تبقى حية فقط دون القدرة على النمو ، وذلك لان النهاية العظمى (المسجلة لنمو الاحياء حقيقية النواة هي 60°م) ولكن يمكن الكشف عن الفطريات وغيرها من الاحياء التي لا يمكن زراعتها ولكنها موجودة في النماذج باستخدام تقنيات PCR وكذلك Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) التي يمكن ان تساعد في الكشف عنها .

الدالات الحيوية في البيئة

الكائنات الحية في البيئة جزء لا يتجزأ منها لذلك فان أي تغير يطرأ على البيئة يؤدي الى إحداث تغييرات في الاحياء المجهرية وعلى مختلف الأصعدة . لذلك استغلت الاحياء المجهرية بشتى الوسائل لاستدلال على سلامة او تلوث البيئة .

الدالات الحيوية هي احياء توجد في البيئة مثل الاشنيات Lichens والطيور والبكتريا وغيرها تستعمل لتسجيل سلامة البيئة . اذ ان تسجيل التغيرات التي تحصل للاحياء تشير الى وجود مشاكل في النظام البيئي الذي توجد فيه الاحياء . والتغيرات التي يمكن ان تسجل هي تغيرات كيميائية او فيزيائية او تغير في تصرفات الاحياء . وبذا فان كل كائن حي في بيئته يكون قادرا على تسجيل سلامة بيئته ، وعليه فيمكن ان تستعمل المؤشرات المسجلة لعدة أغراض منها :

- ◆ الإشارة الى التغيرات الحاصلة في البيئة .
- ◆ تسجيل الملوثات وتأثيرها على النظام البيئي الذي تعيش فيه الكائنات الدالة .
- ◆ يمكن ان تستعمل لتسجيل نظافة البيئة .
- ◆ يمكن ان تستعمل لفحص بعض المواد خاصة المياه للكشف عن وجود المواد الملوثة

أنواع الدالات الحيوية

يهتم موضوع الكتاب بالاحياء المجهرية ولكن لا باس من ذكر بعض الدالات من باب العلم بالشيء بالإضافة الى انها تتداخل مع الاحياء المجهرية ومن هذه الدالات :

- ◆ الدالات النباتية : فوجود او غياب انواع معينة من النباتات في نظام بيئي يمكن ان يكون مؤشرا على سلامة البيئة .

♦ **الدالات الحيوانية :** عند زيادة تعداد انواع معينة من الحيوانات او نقصانها بشكل ملفت يمكن ان تدل على حدوث انحراف الأنظمة البيئية ، فمثلا اذا كان التلوث يسبب استنزاف المواد الغذائية المهمة فان الحيوانات المعتمدة عليها ستتعرض لنقصان أعدادها . اضافة الى وجوب تسجيل حجم وصحة الحيوانات في حال استعمالها كدالات حيوية ، كما انه لابد من تسجيل تراكيز السموم في أنسجتها ان كانت هي السبب في نقصان الأعداد ، وكذلك تسجيل وقياس التشوهات في الحيوانات وأجنحتها .

♦ **الدالات الميكروبية :** ويمكن ان تستعمل الأحياء المجهرية كدالات في الأنظمة البيئية المائية والبرية ، ويكون استعمال الاحياء المجهرية أكثر سهولة من حيث النمذجة مقارنة بالاحياء الاخرى . كما ان الميكروبات (مثل باقي الاحياء) لها القابلية على انتاج بروتينات الاجهاد عندما تتعرض للملوثات مثل الكادميوم والبنزين وغيرها ويمكن ان تستعمل هذه البروتينات كأجهزة إنذار مبكر للكشف عن مستويات التلوث الواطئة . والمستعمل من الاحياء المجهرية هي :

الاشنات Lichens وهي كائنات من مجموعة الفطريات الكيسية والطحالب التي تكون بشكل متعايش مع بعضها وتعد أهم المؤشرات على التلوث البيئي لأنها حساسة جدا للسموم خاصة التي توجد في الجو . وتوجد الاشنات على الصخور وجذوع الأشجار وتستعمل بكثرة لتسجيل التلوث في الغابات التي توجد فيها ويمكن ان تقيس تغيرات مهمة :

♦ نوعية الهواء وتسجيل التغيرات في الجو .

♦ التغير في تركيبة الغابات .

فغياب الاشنات في الغابات يشير الى حصول اجهادات بيئية مثل وجود مستويات عالية من ثنائي اوكسيد الكبريت او غيرها من المركبات المؤذية والتي تكثر عادة قرب المناطق الصناعية .

قياس فعالية الدالات الحيوية

يمكن ان تسجل التغيرات الفسلجية او التغير في تصرف الدالات الحيوية لتشير الى التغيرات الحاصلة في سلامة البيئة ، والتغيرات تختلف من كائن الى آخر . والتغيرات الوراثية يمكن ان تربط بوسائل التقنية الحيوية الحديثة لتساعد في الحصول على معلومات لا يمكن جمعها بالوسائل العادية ويكون ذلك موثقا عند الحفاظ على الأنماط الطبيعية Wild types للمقارنة ويمكن ان تعطي معلومات بشكل غير مباشر عن التغيرات البيئية ، وهناك عدة طرق لقياس الفعاليات الحيوية في هذا المجال :

♦ **الطرق التقليدية :** وفيها تضاف الاحياء الدالة الى نماذج البيئة مثل الماء او غيره ، ثم تسجل الملاحظات حول تغير الاحياء نتيجة لتعرضها للنماذج البيئية . مثل تعريض الميكروبات للبيئات تحت الاختبار لمدة محددة ثم تسجيل التغيرات التي ظهرت عليها او فيها كوجود بروتينات الإجهاد الخاصة ومن الطرق التقليدية ايضا قياس الوميض الحيوي Bioluminescence وتستعمل فيه البكتريا التي تعطي الوميض لتحديد السموم في المياه . فعند وجود مادة سامة في النموذج البيئي فان ايض البكتريا سيضطرب وبالتالي سيؤثر على كمية الضوء المنبعث وهي طريقة سريعة وتحتاج الى 5 - 30 دقيقة لإكمال الفحص ويكون الفحص مفيدا في تحديد وجود المادة السامة فقط ولكن لا يحدد نوعيتها او كميتها .

♦ **الطرق الحديثة :** هناك العديد من التقنيات الحديثة التي تستعمل الاحياء المجهرية لفحص سلامة البيئة وهي لا تعتمد على المعطيات النهائية للتفاعلات وانما تعتمد الى تسجيل وجود الجزيئات وهي بذلك تشبه الطرق الكيماوية ومنها :

▶ **تقنية استعمال DNA array** وهذه تكون على شكل رقائق دقيقة Silicon microchips مربوط إليها العديد من أشرطة DNA مفردة او أشرطة RNA وتكون الحوامض النووية مستخرجة من الكائنات المراد إجراء الفحص لأجلها . فعند وجود الكائن المجهرى في النموذج البيئي (وبعد استخلاص الحوامض النووية منه) فإنها سترتبط بالأشرطة الموجودة في الرقائق بالاعتماد على تكامل القواعد النتروجينية في الحوامض النووية وهذا يشير الى وجودها في النماذج المفحوصة . والطريقة سريعة وتحتاج الى حوالي 4 ساعات لتحديد وجود الاحياء مقارنة بـ 48 ساعة التي تحتاجها الطرق الكيماوية التقليدية .

▶ **طريقة FISH (Fluorescence in - situ hybridization)** وتستعمل لتحديد وجود جين معين في النموذج وبالتالي فانه سيحدد وجود او عدم وجود الميكروب في النموذج وذلك بالاعتماد على وجود جيناته . وفيها تحضر قطعة من DNA الكائن المراد الكشف عنه وتعلم بصبغة او واسمة متفلورة لتكوين مسبار DNA probe ثم تؤخذ نماذج بيئية وتثبت على شرائح زجاجية وتعرض للمسبار المتفلور ، فاذا كان جين الميكروب موجودا في النموذج فسيرتبط بالمسبار معطيا ضوءا عند الفحص بالضوء فوق البنفسجي باستعمال المجهر المتفلور الخاص .

▶ **قياس الحوامض النووية مباشرة من نماذج البيئة مثل استعمال DGGE .**

وقد استعيرت العديد من الطرق المستعملة لفحص المياه وخاصة مياه الشرب في المجال البيئي ولا زالت الجهود متواصلة للكشف او إيجاد طرق أكثر كفاءة وأسرع للكشف عن الملوثات البيئية . وبالنتيجة فان استعمال الدالات الحيوية واستعمال الوسائل المختلفة للوصول إليها والى حالتها من

التغيير لابد ان يشارك في منع او التقليل من تأثيرات الصناعة او تحويل الأخيرة بحيث تترك اقل ما يمكن من التأثيرات السلبية .

الدالات الميكروبية في بيئة التربة

اكثر الاحياء المجهرية فائدة في مجال خدمة البيئة هي احياء التربة اذ انها تعد الماكنة الحيوية للأرض وذلك من خلال العديد من الفعاليات منها :

- تحافظ على دايناميكية تركيب التربة .
- تساعد في تدوير المواد الغذائية وإكمال دورة العناصر في البيئة .
- تساعد في تفكيك الملوثات .

ولذلك عدت صحة الأنظمة البيئية في التربة دليلا على صحة الأنظمة البيئية الأخرى ، أي ان صحة بيئة التربة تعد مؤشرا لصحة البيئة العامة . والدالات المستعملة يجب ان لا يقتصر دورها على تسجيل المؤشرات السلبية للبيئة وإنما يجب ان تكون قادرة على عكس التغييرات في التركيب والوظيفة في الأنظمة البيئية ، ولذا يجب ان تكون حساسة وسهلة التداول ، وان يكون بالإمكان تطبيقها على نطاق عالمي .

فمن الدلائل الفيزيائية والكيمائية المستعملة في التربة مثلا قياس الرقم الهيدروجيني او تركيز الملوحة (EC) ، توفر الأغذية ونسبة المواد العضوية او الكربون العضوي ، ولكن هذه لا تعد حساسة بما فيه الكفاية للتنبؤ بالتغيرات المبكرة في بيئة التربة .

ومن جهة ثانية فان أحياء التربة المجهرية تستجيب بشكل سريع لأي ضرر يصيب التربة ، لذلك فان التغييرات تحتاج الى تسجيل كمي وليس نوعي كي تمكن العاملين من تحديد مستوى الخطر . ويمكن تحديد الضرر على البيئة من تسجيل أحوال الاحياء المجهرية من تسجيل :

- ◆ تغير اعداد الاحياء المجهرية .
- ◆ تحديد معدل التنفس كأحد الفعاليات الحيوية المهمة .
- ◆ تحديد الفعاليات الإنزيمية .

ومثل هذه المؤشرات لا تكون دلائل حساسة جدا وذلك لكثرة الوظائف والفعاليات التي تقوم بها الاحياء المجهرية وكذلك التداخلات المعقدة بين مجاميعها في التربة . لذلك فان دراسة مجتمعات الاحياء المجهرية المكونة من أجناس وأنواع مختلفة يجب ان يكون على ضوء الاختلاف في نسبها وتحديد نسب الأنواع والأجناس في الحالة الطبيعية لتقارن بها نتائج حالة الانحراف نتيجة الاجهادات للوصول الى صورة حقيقية واضحة عن النظام البيئي ، ومن ذلك يمكن ان يلاحظ زوال مجموعة من الاحياء نتيجة اضطراب النظام البيئي لمدى طويل الامد .

والتنوع البكتري يمكن ان يحلل باستعمال مقاييس شتى مثل القياسات المظهرية والوظيفية وكذلك المقاييس الوراثية للكائنات التي تمثل المجتمعات الميكروبية في التربة وهي عمليات تحتاج الى وقت طويل . ولكن الطرق الحديثة سهلت من هذه المهمة ومنها استعمال الطرق الجينية المباشرة وذلك باستخلاص DNA او RNA للمجتمعات الميكروبية من نماذج التربة وتحليلها بواسطة DGGE او Temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) او Terminal – restriction fragment length polymorphism analysis (T-RFLP) .

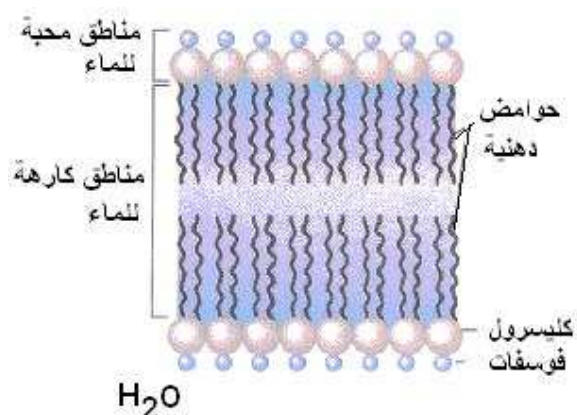
هذه التقنيات أدت الى تسهيل دراسة المجتمعات الميكروبية ، وكما هو متوقع فان التقنيات المعتمدة على DNA لها فاعلية اكبر في الدراسات الا انها معقدة ويمكن ان تتأثر نتائجها بخطوات استخلاص الحوامض النووية وكذلك الانتقائية المطبقة في خطوات التضخيم بتقنية PCR . كما ان التحليل الوراثي يعطي التنوع الكلي وليس المعبر عنه أي لا يعطي تنوع النمط المظهري وبذا يكون التنوع الوراثي اكبر من المقياس الذي له التأثير والذي يحتاجه التسجيل الروتيني وبذا وبالرغم من سرعة التحليل الوراثي فانه لا يمكن ان يعطي إنذارا مبكرا واضحا .

مكونات الدالات المستعملة لفحص البيئة

فيما تقدم تبين ان المؤشر الوراثي او تسجيل الحوامض النووية لا يمكن ان يعد ملائما للتعامل مع البيئة ، ولذلك تم استعمال مقاييس أخرى للتغلب على المعوقات اعلاه ومنها استخدام الدهون الفوسفاتية في الأغشية الخلوية .

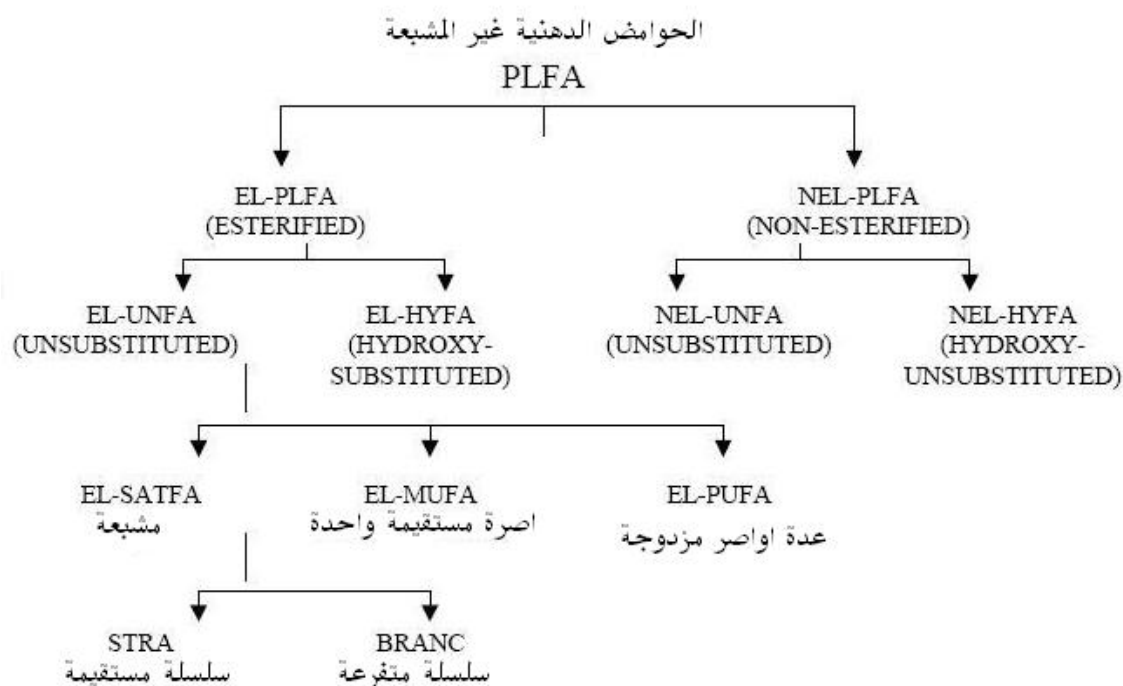
استعمال الدهون الفوسفاتية في الأغشية الحيوية

تعد الحوامض الدهنية من المكونات الأساسية للأغشية الخلوية في الخلايا الحية ، وتتكون الدهون الفوسفاتية (PLFAs) Phospholipid fatty acids من جزيئة واحدة من الكليسرول (3 ذرات كاربون) وتكون مجموعتين من OH من جزيئة الكليسرول متصلة بسلسلتين من الحوامض الدهنية والتي تمثل الجزء الكاره للماء ، ومجموعة الاخرى من OH الكليسرول تتصل بمجموعة الفوسفات وهي الجزء المحب للماء ، لذلك تكون الدهون غير متناظرة لانها مكونة من جزء محب للماء وآخر كاره للماء ، وتتجمع هذه الدهون بشكل طبقتين يكون الجزء المحب للماء الى الخارج والكاره للماء مدفون في الداخل كما موضح في الشكل (57) (ويراجع الشكل 4 / الفصل الاول)



شكل 57 : التركيب الاساسي لتجميع الدهون في
الاعشية الخلوية

وتقسم الدهون الفوسفاتية الى عدة مجاميع وفق المخطط الموضح في الشكل (58)



شكل 58 : تقسيم الحوامض الدهنية الموجودة في الاحياء المجهرية

الاختصارات :

PLFA : Phospholipid fatty acid , EL- PLFA : Ester – linked phospholipid fatty acid , NEL – PLFA : Non - ester – linked phospholipid fatty acid , EL – UNFA : Ester – linked unsubstituted fatty acid , EL – HYFA : Ester – linked

hydroxyl substituted fatty acid , NEL – UNFA : Non - ester – linked unsaturated . NEL – HYFA : Non - ester – linked hydroxyl substituted fatty acid , EL – SATFA : Ester – linked saturated fatty acid , EL – MUFA : Ester – linked monosaturated fatty acid , EL – PUFA : Ester – linked polysaturated fatty acid , STRA : Straight chain fatty acid , BRANC : Branched chain fatty acid

وتوجد المجموعة NEL- HYFA في البكتريا السالبة لصبغة كرام في الجزء LPS في الغشاء الخارجي وتسمى او تمثل HYFA - LPS السموم الداخلية (يراجع الفصل الاول) وتستعمل الحوامض الدهنية كواسمات حيوية Biomarkers في الدراسات البيئية كما موضح في الجدول (12)

جدول 12 : بعض الواسمات الحيوية من الحوامض الدهنية الموجودة في مجاميع مختلفة من الأحياء المجهرية

المجموعة		الواسمة الحيوية
البكتريا		
الموجبة لصبغة كرام	الحوامض المتفرعة	17 : 0, 18 : 0, i17 : 0, a17 : 0, i16 : 0, i16 : 1, 10Me16 : 0, 10Me17 : 0
	الحوامض غير المتفرعة	16 : 1ω9, 16 : 1ω7c, 16 : 1ω5, 18 : 1ω7, 19 : 1
	الحلقية	cy17 : 0, cy19 : 0
السالبة لصبغة كرام	الحوامض الأخرى	1ω9, 16 : 1ω7c, 16 : 1ω5, 18 : 1ω7, 19 : 116 :
	الفطريات	PUFA 18 : 2ω6 (linoleic acid)
الاكتينومايسيتات		*10Me16 : 0, 10Me17 : 0 and 10Me18 : 0
البكتريا اللاهوائية		**NEL-PLFA
البكتريا المختزلة للكبريتات (Desulfobacter sp.)		cy17 : 0 and 10Me16 : 0 10Me 18 : 0
البكتريا المولدة للميثان	المجموعة الأولى	16 : 1ω8
	المجموعة الثانية	18 : 1ω8

* Me مجموعة ميثيل

** NEL – PLFA = Non – esterlinked phospholipid fatty acid

وبالرغم من ان PLFAs تكون ذات تراكيب مختلفة ولها وظائف متخصصة إلا ان بعض الحوامض الدهنية يمكن ان توجد في اكثر من مجموعة منها :

♦ الحوامض الدهنية المتفرعة وتعد واسمة حيوية للبكتريا الموجبة لصبغة كرام ولكنها يمكن ان توجد في البكتريا السالبة لصبغة كرام اللاهوائية المختزلة للكبريت وأنواع من *Cytophaga* و *Flavobacterium* .

♦ الحوامض الدهنية الحلقية Cyclopropyl توجد في البكتريا السالبة لصبغة كرام ولكنها توجد في بعض البكتريا الموجبة لصبغة كرام اللاهوائية .

♦ LPS - HYFAs تكون علامة مميزة للبكتريا السالبة لصبغة كرام ولكن لوحظ وجودها في بعض الفطريات .

♦ الحامض الدهني 2ω6 : 18 يعد دليلا للفطريات ، ويوجد بشكل كبير في النباتات ولكنه يعد دليلا قويا على وجد الفطريات عند غياب النباتات .

أهمية تحليل PLFAs

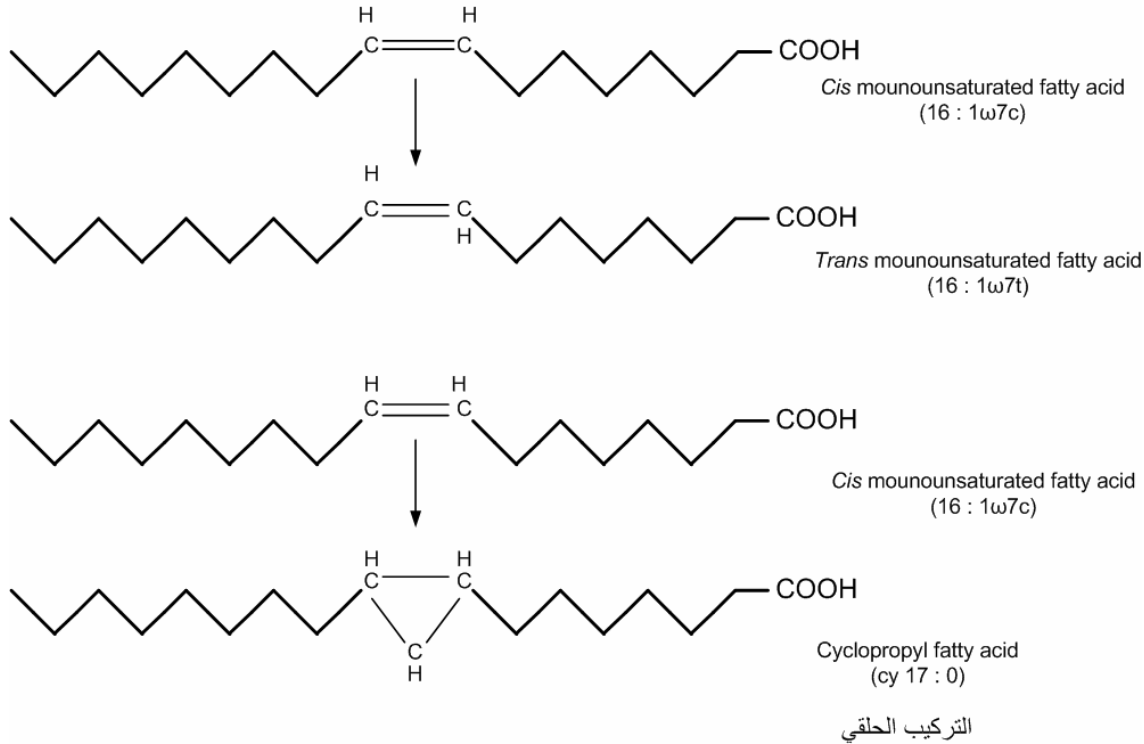
ان تحليل نماذج التربة بالنسبة لهذه المواد يعطي فكرة عن المحتوى الكمي للميكروبات الحية النشطة وكذلك الكتلة الميكروبية وذلك لعدة أسباب :

- الدهون الفوسفاتية تتحلل بسرعة بعد موت الخلايا ، كما انها لا توجد في المواد المخزونة في الخلايا .
 - لها علاقة وثيقة مع المؤشرات الأخرى المستعملة لتحديد الكتلة الحيوية للميكروبات مثل استعمال Acridine orange .
 - لها علاقة وثيقة مع محتوى الخلايا من ATP .
- وتتملك هذه المركبات العديد من الصفات مما يجعلها تفرض نفسها للاستعمال كدلائل حيوية للاجهادات البيئية وذلك لان :
- o هي مركبات أساسية في الأغشية الخلوية للميكروبات وتساعد الاحياء في الاستجابة للظروف الخارجية والداخلية .
 - o تغيير نوعية المجتمع الميكروبي في النظام البيئي يؤدي الى تغيير PLFAs .

لذلك يمكن ان تستعمل لتسجيل التغيرات والاجهادات البيئية .

ومن المؤشرات المستعملة بالنسبة للـ PLFAs هو تغير نسب النظير Cis الى Trans في الحوامض الدهنية الحاوية على أصرة مزدوجة واحدة Monounsaturated عند تسليط الاجهادات ، ووجود الحوامض Polyunsaturated يكون نادرا في البكتريا ولكن بعض بكتريا الكرش Rumen

bacteria تستطيع إنتاج النظير Trans من هدرجة Polyunsaturated الخارجية المنشأ مثل هدرجة Linoleic (18 : 2ω6 , 9) او Linolenic (18 : 3ω3 , 6 , 9) لتكوين 18 : 1ω7t . ومن المعروف ان أكثر الاجهادات البيئية تؤدي الى تغيير ميوعة الأغشية وزيادة الميوعة تؤدي الى تكوين تراكم غشائية غير مزدوجة الطبقة ويؤدي بدوره الى حصول نضوحية غير متخصصة تؤثر على أنظمة النقل اذ تقوم بتنشيطها او زيادة فعاليتها . وعليه ولأجل ان تواجه الخلايا هذه الاجهادات لابد من تغيير مكونات PLFAs لغرض مواجهة ميوعة الأغشية والتي تعد احد آليات التطلع . ومن التغيرات هو حصول المزامرة ، أي تحول الوضع من Cis الى Trans مثل تحول 18 : 1ω7c الى 18 : 1ω7t وتحول 16 : 1ω7c الى 16 : 1ω7t وبذا يتكون النظير Trans من النظير Cis المقابل له بدون ان يحصل تغيير في موقع الأصرة المزدوجة وهو ما يطلق عليه معامل الإجهاد الدهني Stress lipid index والتغيرات موضحة في الشكل (59) .



شكل 59 : مزامرة الحوامض الدهنية الحاوية على اصرة

مزدوجة واحدة من دهون اغشية الاحياء المجهرية

ونظرا للاختلاف في التوزيع الفراغي للمركبات فان Trans يقلل من ميوعة الاغشية ويزداد الإجهاد . ان التزامر يحدث فقط عند تغير ميوعة الأغشية ولا يحدث عند ظروف تمنع نمو الكائنات . وتتغير نسب Cis الى Trans عند ارتفاع درجات الحرارة ووجود المواد الكيماوية العضوية السامة والجوع ، وزيادة الضغط التنافذي ، وانخفاض الرقم الهيدروجيني ووجود المعادن الثقيلة السامة .

وتسبب الحرارة العالية زيادة نسبة Trans الى Cis للحوامض الدهنية الحاوية على أصرة مزدوجة واحدة من 0.1 الى 0.4 عند ارتفاع درجة الحرارة من 25 الى 45 °م في مزارع نقية للبكتريا *Ps. putida*. اما عند تسخين نماذج التربة والدبال الى 160 °م فقد وجد ان النسبة للحامض الدهني 16 : 1ω7 تزداد من 0.12 الى 0.21 ، وهناك علاقة خطية بين انخفاض النظير Cis للحوامض الدهنية 16 : 1ω7 و 18 : 1ω7 بارتفاع درجة الحرارة .

وتؤدي المركبات العضوية السامة وزيادة الضغط التنافذي الى زيادة النظير Trans في دهون البكتريا التي تعد نموذجا دراسيا لمثل هذه الأغراض وهي *Ps. putida* .

كما ان إجهاد الجوع يؤدي أيضا الى زيادة النظير Trans الى Cis من 0.02 الى 1.56 عند تجويع البكتريا *Vibrio cholerae* لمدة 30 يوم ، وتحدث زيادة مماثلة للعديد من العزلات البكتيرية البحرية بعد مدة تجويع قصيرة تمتد الى 24 ساعة . فعند نفاد المواد الغذائية يحصل استهلاك للنظير Cis ولذا تزداد نسبة Trans الذي يكون أكثر ثباتا ويصعب استهلاكه من قبل البكتريا وبذا تقل نضوحية الأغشية وتحافظ الخلايا على سلامة وفعالية أغشيتها .

وتزداد نسبة النظير Trans الى Cis عند انخفاض الرقم الهيدروجيني سواء في المزارع النقية للإحياء أو في الدراسات الحقلية ، وتحدث زيادة مماثلة عند زيادة تراكيز المعادن الثقيلة ووصولها الى مستويات سامة ويمكن إجمال التأثيرات المذكورة في الجدول الاتي (جدول 13)

جدول 13 : تأثير الظروف المختلفة على نسب النظير trans الى cis في الحوامض الدهنية غير المشبعة

العامل المجهد	نسبة trans الى cis تحت الظروف العادية	نسبة trans الى cis تحت ظروف الاجهاد
ارتفاع الحرارة 45 °م 165 °م	0.1 0.12	0.4 0.21.
مواد عضوية سامة	اقل من 0.1	اكبر من 0.1
المجاعة	0.02	1.56
زيادة الضغط التنافذي	0.07	0.12
انخفاض الرقم الهيدروجيني	0.1 0.07	0.16 0.3
وجود المعادن الثقيلة زنك كادميوم كروم نحاس	اقل من 0.1	0.67 0.76 0.63 0.28

ويبدو ان المعادن الثقيلة والتي توجد في العديد من البيئات الملوثة تتداخل مع بروتينات الأغشية للخلايا الميكروبية مؤدية الى اضطراب توزيعها الفراغي ثم اضطراب وظائفها ، لذلك تلجأ الخلايا الى زيادة النظير Trans لانه يمثل الوضع الأكثر ثباتا مقارنة بالوضع Cis .

اما الحوامض الدهنية الحلقية Cyclopropyl fatty acids مثل Cy17 : 0 , Cy19: 0 فتزداد نسبتها بشكل مرافق لزيادة النظير Trans على حساب النظير Cis تحت أكثر ظروف الاجهاد المذكورة اعلاه ، اضافة الى حصول الزيادة عند استعمال المبيدات والاجهادات الميكانيكية المتمثلة بحرثة التربة كما موضح في الجدول (14)

جدول 14 : تغير الحوامض الدهنية الحلقية تحت ظروف الاجهاد

النسبة المئوية للزيادة عن الوضع الطبيعي		الاجهاد
Cy19 : 0	Cy 17 : 0	
150	66	ارتفاع الحرارة
28.7	5	25 °م
390	100	165 °م
33		المجاعة
86	70	انخفاض الرقم الهيدروجيني
33	25	الحرثة
		المبيدات

ويتكون المركب الحلقي من إضافة مجموعة مثيل CH_3 الى النظير Cis وهذا يحدث بشكل طبيعي عند دخول الخلايا الى طور الاستقرار من أطوار النمو والذي يمثل احد مظاهر الاجهادات على الخلايا عند زيادة الزحام وقلة المواد الغذائية وزيادة الفضلات وغيرها من الظروف التي تمت مناقشتها سابقا . فتحول النظير Cis الى الشكل الحلقي يعني ان الخلايا لا تستطيع استهلاكه ، كما ان وجوده يضيفى الثباتية على الأغشية الخلوية وذلك بتقليل ميوعة الاغشية وعدم تفككها ، اضافة الى ان تحول أصرة النظير Cis المزدوجة الى الشكل الحلقي يقيد الحركة ويقلل من حدوث التفاعلات المؤكسدة التي يمكن ان تحدث تحت ظروف الإجهاد .

الفطرية PLFAs

تلعب الفطريات أدوارا مهمة في الأنظمة البيئية بفعاليتها المتعددة ومشاركتها في الحفاظ على جودة التربة والمساعدة على تكاثر وتجمع حبيبات التربة ، وتزيد من المواد الغذائية بإطلاقها للإنزيمات لتفكيك بقايا النباتات . وهناك علاقة واضحة بين اضطراب التركيب الفيزيائي للتربة مع الواسمات الحيوية الفطرية كما يلاحظ عند الرعي وحرثة التربة وحرقتها ، اذ تؤدي هذه المعاملات الى نقصان النسبة المئوية للحامض الدهني المميز لها 2ω6 : 18 بنسب تتراوح بين 15 – 48 % ، ويمكن عزو

ذلك الى ان الخيوط الفطرية تكون حساسة للاضطرابات الفيزيائية اكثر من الاحياء وحيدات الخلايا ، وعليه يكون من الأفضل استعمال الاحياء وحيدات الخلايا كدالات في البيئة أكثر من الفطريات . ويكون المؤشر الفطري حساس ايضا لوجود المواد الكيماوية مثل المعادن الثقيلة والمبيدات ولكنها من نواحي مختلفة تأتي بالدرجة الثانية بالنسبة لوحيدات الخلايا .

ويمكن استعمال المحتوى الدهني لقياس مؤشرات اضطراب أخرى مثل استعمال المبيدات ووجود المعادن الثقيلة بتركيز عالية سامة فتحت مثل هذه الظروف تزداد PLFAs الخاصة بالبكتيريا السالبة لصبغة كرام وتقل تلك الخاصة بالبكتيريا الموجبة لصبغة كرام ، وهذا يعود الى زيادة وجود الحوامض الدهنية الحلقية في السالبة وكذلك وجود طبقات الغشاء الخارجي الذي يكثر فيه LPS والتي تساعد في مواجهة الاجهات الخارجية بشكل أفضل فمن المعروف بشكل عام ان البكتيريا السالبة لصبغة كرام تسود البيئات الملوثة بالمعادن مقارنة بالبكتيريا الموجبة لصبغة كرام .

ويفيد تسجيل المحتوى الدهني في تحديد سبات الاحياء أيضا فمثلا البكتيريا *V. cholerae* تستطيع العيش في ظروف المجاعة في المختبر لعدة أشهر بتكوينها خلايا صغيرة جدا يصل حجمها الى 0.2 – 0.4 مايكرومتر بحيث تكون قابلة للترشيح بالمرشحات المستعملة للتعقيم وتستطيع الرجوع الى الحالة الطبيعية بعد ساعتين من تزويدها بالمواد الغذائية . وتجد أنواع عديدة من *Vibrio* في المياه الساحلية بشكل صغير ، وتكون هذه الخلايا القزمة ظاهرة شائعة عند المجاعة في البيئات المائية ، ويتغير نسق الحوامض الدهنية عند المجاعة في العديد من البكتيريا لذلك يمكن تسجيل معامل الإجهاد Stress index لتحديد وضع البيئة الغذائي ، اذ تحصل زيادة في الحوامض غير المشبعة خاصة 1 : 16 ونقصان في الحوامض الدهنية المشبعة خاصة في الأيام الأولى من المجاعة وتحت درجات حرارية منخفضة كما في البيئات البحرية .

معوقات استعمال PLFAs

بالرغم من ان الدهون الفوسفاتية يمكن قياسها كما ونوعا الا ان الاستعمال المطلق يواجه بعض المعوقات ، وذلك لأنها لا تعطي معلومات على مستوى النوع للاحياء مثل الاركيا او البكتيريا اذ لا يمكن ان تحدد بهذه الطريقة . كما ان القواعد المعلوماتية الموجودة مبنية على معلومات لأحياء نقية المزارع ، ولكن عند توسيع قواعد المعلومات يمكن ان تزيد أهمية هذه الواسمات الحيوية . وقد تم البدء بوضع Biochemical libraries لتشخيص الأحياء المعزولة من البيئة ومعرفة وضع البيئة . ومن المعوقات الأخرى ان تحديد PLFAs هي طريقة غير متخصصة لانها لا تعطي الانواع الحقيقية ولكن تعطي صورة عامة عن المجاميع المكونة للمجتمعات الموجودة في البيئة .

استعمال الكتلة الحيوية كمؤشر بيئي

تستعمل الكتلة الحيوية البكتيرية او الفطرية كمؤشر على سلامة البيئة ، وتؤخذ النسبة بين الكتلة الفطرية والكتلة البكتيرية كمقياس ، فعند تسميد التربة تزداد الكتلة الفطرية بالنسبة للكتلة البكتيرية ، اما تحت ظروف الاضطراب مثل الرعي وحرق التربة وقطع الأشجار فتقل الكتلة الفطرية : الكتلة البكتيرية .

استعمال البروتينات الوصيفة للأغراض البيئية : مر ذكر ان جينات الوصيفات وبروتينات الصدمة الحرارية يتم التعبير عنها بسرعة عند تعرض الخلايا للجهودات وقد استعملت هذه الجينات للكشف عن الملوثات بعد ربطها بـ *Lux genes* من البكتريا البحرية *Photobacterium phosphoreum* (سابقا *Vibrio fischeri*) وبهذا أمكن الكشف عن العديد من المواد العضوية والمبيدات المستعملة لحماية النباتات والمعادن والمذيبات . وقد امكن إجراء تحسينات كثيرة مثل استعمال طفرات *tolC* (البروتين الموجود في الغشاء الخارجي للبكتريا) لزيادة حساسية الخلايا ، اذ ان البروتين يؤثر على نضوحية الأغشية الخارجية الكارهة للماء ، ففي الخلايا الطبيعية *tolC*⁺ تتحسس لـ 38 جزء بالمليون من المادة المختبرة في حين ان *tolC*⁻ تتحسس 1.2 جزء بالمليون ويمكن ان تصل الى 37 جزء بالمليون ، والتحويل على غرار استعمال طفرات *raf* في بكتريا *Sal. typhimurium* المستعملة في فحص أيمس . ومثل هذه الطفرات يمكن ان تستجيب لعدد من ظروف الإجهاد كما موضح في الجدول (15)

جدول 15 : فعالية الوميض الحيوي في سلالات *E. coli* المهندسة بربط جين الوميض الحيوية مع جينات الصدمة الحرارية تحت ظروف إجهاد متغيرة

السلالة TV1076 <i>grpE':::luxCDAB</i>		السلالة WM1302 <i>dnaKp::luxCDAB</i>		المادة الكيماوية
الاستجابة	التركيز (جزء بالمليون)	الاستجابة	التركيز (جزء بالمليون)	
1.3 1.8 5.5 1.2 0.0	250 500 1,000 2,000 4,000	0.9 0.8 8.4 0.6	93 278 833 2,500	كبريتات النحاس
1.6 2.0 3.6 6.3 9.3 1.8	1.6 S 15 44 133 400	1.1 1.5 17.8 108 4.5 0.4	12.5 25 50 100 200 400	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
1.3 1.8	2,000 4,000	1.2 1.5	2,500 5,000	Methanol

3.2 8.2 17.3 0.4 0.0	8,000 16,000 32,000 64,000 128,000	1.3 1.2	10,000 20,000 40,000	
1.4 2.1 2.6 2.6	13 38 113 340	1.0 0.9 1.2 6.2	42 85 170 340	2-Nitropheno
1.4 1.9 3.1 0.09 0.07 0.0	4.2 13 37 111 333 1000	0.8 1.0 0.9 1.7	7.8 16 31 62	4-Nitrophenol
2.7 4.7 6.7 11.1 3.5 0.0	17 50 150 460 1,390 4,170	1.3 2.2 2.0 9.1 68.2 0.6	17 50 150 460 1,390 4,170	Phenol
1.4 1.7 1.8 1.4 0.2 0	310 620 1,250 2,500 5,000 10,000	0.7 0.6 0.6 0.5 0.3 0.3	310 620 1,250 2,500 5,000 1000	Xylene

ويمكن تتبع وجود المواد السامة او الظروف المجهدة بمتابعة الوميض ، وذلك لان وجود الاجهادات يؤدي الى تقليل الفعاليات الحيوية لغرض صرف الطاقة والوصول الى التوازن الخلوي . وهذا يؤدي الى تغيير التعبير الجيني ومنها جينات البروتينات الوصيفة ، ومن المعروف انه في البكتريا مثل *E. coli* تتم عملية تنظيم الانتساخ بشكل ايجابي على وحدات إنزيم الكوثر RNAP بالعامل سيكما -32 والذي يؤثر على حث بروتينات الصدمة الحرارية التي تزيد جيناتها على 20 جين . والصفة المميزة للاستجابات التي يتوسطها العامل سيكما - 32 انها تكون سريعة وعابرة وفي هذه الحالة تزيد من تخليق بروتينات الصدمة الحرارية .

وقد استغلّت هذه البروتينات نظرا لان بعضها يحث بعدد من الاجهادات مثل التغير من الظروف اللاهوائية الى الظروف الهوائية والتعرض للمواد الكيماوية مثل الكحول او بيركسيد الهيدروجين ، والمعادن الثقيلة ، ومضاهيات الحوامض الامينية وأزيد الصوديوم Na - azide و - 2,4 dinitrophenol والمجاعة والإصابة بالفيروسات ، وتحث بروتينات الصدمة الحرارية عندما تكون العوامل المحفزة دون المستويات المميّنة وهذه تكون مهمة لحياة وبقاء الأحياء في بيئات لا تلائم ظروف معيشتها ولذلك فان نسق حث البروتينات يكون ملائما لتسجيل وكشف الملوثات البيئية .

وباستعمال تقنيات الهندسة الوراثية يمكن دمج الجين الممهد المسئول عن تخليق بروتينات الصدمة الحرارية مع جينات اعلان *Reporter genes* ومنها اوبرون الوميض الحيوي *LuxCDABE* الموجود في البكتريا المذكورة ولهذا النظام ميزات تجعل استعماله مفضلا ومنها :

- سريع الاستجابة .
- ذات حساسية عالية وممتازة .
- يمكن جعل المجس يعمل بشكل آلي .

وينتج الضوء من الخلايا النشطة بدرجة حرارة 30 °م . وقد تم تحضير خلايا *E. coli* مهندسة وراثيا لتسجيل التلوث بالوميض الحيوي ، اذ استعمل البلازميد pUCD 615 لربط جينات الوميض الحيوي وهي *luxE* , *luxB* , *luxA* , *luxD* , *luxC* بدون مهادتها ولكن الممهدات كانت من الجينات *dnaK* او *grpE* لتكون بالترتيب *dnaK::luxCDABE* و *grpE::luxCDABE* وأدخلت الى الخلايا بطريقة التحول . وعند استعمال الخلايا المحولة تحت إجهاد الكحول الايثيلي ازداد الوميض بشكل طردي مع تزايد تراكيز الكحول اذ وصل الى 1900 مرة عند إضافة 4 % من الكحول الايثيلي . والممهدات وفرت فرصة لتحقيق الاستجابة في مدة 40 – 60 دقيقة ، ويمكن زيادة حساسية الخلايا بزيادة قابلية المواد على الدخول الى الخلايا كما ذكر أعلاه باستعمال طفرات *tolC* (جدول 15) . ويمكن ان تستعمل في مجالات اخرى مختلفة مثلا في العمليات الإنتاجية المستمرة عند استعمال Chemostat وجعل الكاربون العامل المحدد ، لذلك فان الخلايا الجائعة تنتج بروتينات الصدمة الحرارية لتعلن عن الظروف داخل المفاعل الحيوي .

المجسات الحيوية Biosensors

تعد المجسات الحيوية من أهم الوسائل التي قدمتها التقنية الحيوية الى عالم البيئة وكذلك لمجالات أخرى . والتوجهات تميل الى استعمال الاحياء المجهرية وبشكل خاص البكتريا في تحضير وسائل للكشف عن التلوث البيئي وذلك لأنها :

- سريعة الاستجابة .
- منخفضة الكلفة .
- تعطي نتائج متطابقة عند الإعادة .

وقد استعملت تقنيات الهندسة الوراثية في تحضير المجسات الحيوية . والمجسات تحتاج الى ان تكون الخلايا فيها في حالة نشاط فعاليتها الحيوية . وقد استعملت تقنية دمج ممهدات بروتينات الصدمة الحرارية مع جينات الإعلان (Fusion based sensor) مثل ظاهرة الوميض الحيوي وتحتاج

النتائج الى وقت لحين ظهورها وقد طورت هذه المجسات بتحويل الخلايا للسماح للمواد بالدخول الى الخلايا والتي تعد خطوة ضرورية لتقوم الخلايا بالعمل عليها كما ذكر انفا .

ويمكن استعمال المجسات الحيوية المعتمدة على الضوء بطريقتين : الاولى الاعتماد على انبعاث الضوء والذي يحتاج الى بعض الوقت ، والطريقة الثانية وهي طريقة آنية وتعتمد على تثبيط انبعاث الضوء .

وتكون المجسات صالحة لمدى معين من التراكيز وهي دون المميتة ، وعند ارتفاعها تصبح سامة للخلايا وتقل الاستجابة وذلك لوجود الموازنة بين الاستجابة للإجهاد والتأثير السام للمادة الحاثية . وتكون المجسات أكثر كفاءة وفائدة عندما تكون خلاياه معزولة من البيئة المستهدفة .

وقد تم تصنيع العديد من المجسات الحيوية البكتيرية باستعمال خلايا كاملة مهندسة وراثيا لإنتاج إشارات يمكن قياسها عند الاستجابة لعوامل الإجهاد . وتشمل عملية الهندسة وضع الجينات المعنية مع جين إعلان مثل استعمال الجينات المطلوبة مع جين إعلان مثل بروتين الوميض من البكتريا البحرية الموضحة أعلاه كما في استعمال Green fluorescent protein و Luciferase . فقد أمكن تحضير مجسات من بكتريا *Acinetobacter* للكشف عن التلوث بالفينول وذلك بوضع الممهد الخاص بإنزيم نزع هيدروجين الفينول Phenol 3 - hydroxyacyl - CoA - dehydrogenase (*hcd*) الى يسار جينات الوميض الحيوي *luxCDABE* وأعطت السلالة وميضاً عند وجود تراكيز من الفينول تصل الى 5 - 100 جزء بالمليون . ويمكن استعمال جينات إعلان اخرى مثل جين الإنزيم β - galactosidase والذي يمكن قياس نواتجه لونياً عند التعبير عنه .

والمجسات المعتمدة على الخلايا الكاملة تسجل الملوثات بمستوى قريب جداً من تلك المسجلة بالطرق التقليدية ، كما انها كفوءة في تسجيل التلوث بمادة ما عندما تكون ضمن خليط من المواد . ومن المجسات التي حضرت باستخدام الخلايا الكاملة مجسات لتحديد النفثالين ، اذ أمكن إدخال جين الإعلان *lux* (Luciferase) أمام الجين المسئول عن هدم النفثالين *nahG* في البكتريا *Ps. fluorescens* . وكذلك للكشف عن التلويين وغيرها من المركبات التي سيأتي ذكرها لاحقاً عند مناقشة التلوث بمشتقات النفط . وبذلك تحقق المجسات الحيوية التوجهات التي يطلق عليها Nano - technology .

وتحضر المجسات ايضاً باستعمال مشتقات الخلايا او الأنسجة وليس بالضرورة استعمال الخلايا كاملة ومنها استعمال الإنزيمات او الأجسام المضادة او مشتقات الأنسجة لتكون عناصر حيوية لتمييز الملوثات .

المعادن والبيئة

تتداخل الجوانب الايجابية والسلبية بين المعادن والتقنية الحيوية البيئية ، فمن جهة فان تراكم المعادن وخاصة الثقيلة تعد ذات مؤثرات سلبية على البيئة ، في حين ان عمليات التعدين والاستخلاص الحيوي يوفر فرص كبيرة للحصول على المعادن التي لا يمكن الحصول عليها بالطرق اللاحوية . ويتناول الجزء الحالي من الكتاب العلاقات المتداخلة في هذا المجال .

يوجد أكثر من 90 عنصر والقائمة في ازدياد ، منها 21 عنصر من المواد الالمعدنية ، و 16 من المعادن الخفيفة ، بينما 53 منها هي العناصر الثقيلة والتي اغلبها من العناصر الانتقالية التي يكون المدار الخارجي d غير ممتلئ بالالكترونات ، وتعد المعادن ثقيلة فيما اذا زادت كثافتها الكتلية عن 5 غم / سم³ . والمدار d هو الذي يعطي المعادن الثقيلة قابلية تكوين الايونات الموجبة القادرة على تكوين المركبات المعقدة ، وفيما اذا كان العنصر فعال من حيث جهد الأكسدة والاختزال ام لا . ولذلك تلعب العناصر الثقيلة أدورا مهمة في العمليات الحيوية المعقدة التي تتم على الأرض مثل تثبيت النتروجين وفلق جزئية الماء أثناء عمليات التخليق الضوئي والتنفس الهوائي واللاهوائي . وكذلك في عمليات توزيع الأواصر بين ذرات الكربون C - C وتمثيل الهيدروجين واليوريا والكثير من العمليات الحيوية الأخرى .

وتلعب المعادن الثقيلة أدوارا مهمة في انتساخ الجينات وتخليق الحوامض النووية . وعند التراكيز العالية تظهر تأثيرات غير متخصصة وبالتالي تسمم الخلايا . ومن الايونات السامة للأنظمة الحيوية بشكل كبير ايونات الفضة Ag^+ وايونات الكاديوم Cd^{++} وايونات الزئبق Hg^{++} لذلك وجب ان تكون الخلايا خالية من معظم الايونات الثقيلة واحتوائها على البعض بتركيز واطئة جدا لغرض ان تبقى حية ولكن دون إجهاد .

التحمل والمقاومة لسمية المعادن الثقيلة

كي تظهر المعادن الثقيلة تأثيرها الايجابي او السلبي على الخلايا لابد ان تدخل الخلية فالايونات الثنائية الشحنة مثل Mn^{++} , Fe^{++} , Co^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} والتي تكون أقطارها 138 – 160 بيكومتر (Pico meter) تنقل بطرق خاصة . اما الايونات السالبة الاوكسجينية Oxyanions مثل الكرومات CrO_4^{--} والفوسفات PO_4^{3-} والكبريتات SO_4^{--} والزرنيخات AsO_4^{3-} والتي يكون فيها الايون مختلف تماما عن العنصر الاساسي وتحمل اغلبها شحنتين سالبة فعلى الخلايا زيادة الارتباط مع الايون المطلوب عند وجود تشابه بينهم وهذا الارتباط يكلف وقت وطاقة بالنسبة للخلايا ، ولذلك طورت الخلايا آليات لحل هذه المشكلة المحيرة ووجد نوعين من الأنظمة لنقل المعادن الثقيلة وايوناتها :

• أنظمة سريعة وغير متخصصة وتستعمل لنقل العديد من المواد ويتم التعبير عنها باستمرار وبدون حث .

• أنظمة بطيئة ومتخصصة تعتمد على تحليل ATP مصدرا للطاقة وبعض الأحيان تستعمل الضخ الكيماوي إضافة الى تحليل ATP ، وتخلقها الخلايا فقط عند الحاجة لأنها مكلفة من حيث الطاقة وتتكون عند المجاعة وحالات الايض الخاصة وتكون مستحثة .
والجدول (16) يوضح بعض الناقلات في الخلايا والايونات التي تقوم بنقلها .

وبصورة عامة فان ايونات النيكل والكوبالت والزنك والمنغنيز والمغنيسيوم تنقل بأنظمة النقل السريع إضافة الى وجود أنظمة نقل بطيئة لنقلها ولكنها تستعمل بشكل قليل ، اما الزرنيخات والكرومات فتتقل بأنظمة نقل خاصة قد تكون سريعة او بطيئة اعتمادا على الكائن وكذلك العملية الفسلجية التي يقوم بها . ولكن عند زيادة تراكيز المعادن الثقيلة قد يلغى التخصص وتنقل وتتجمع بأنظمة النقل السريع .

جدول 16 :انواع ناقلات الايونات في الخلايا ودورها في النقل

عائلة الناقلات	الدور الوظيفي المعادن	مصدر الطاقة	المكونات
ABC	قبط المعادن Mn^{++} , Zn^{++} Ni^{++} , Fe^{++}	تحلل ATP	اثنان من البروتينات الغشائية الاساسية واثنان من البروتينات المحللة ATPases مع بروتينات رابطة في الفسحة المحيطة
ABC	لدفع المعادن الى الخارج	تحلل ATP	بروتينات ABC الغشائية مندمجة مع بروتينات الغشاء الخارجي
انظمة p- type	قبط المعادن ودفعها Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} , K^{+} , Cu^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} , Pb^{++} , Ag^{+}	تحلل ATP	بروتين واحد اساسي مرتبط بالغشاء لكل ايون
أنظمة A- type	دفع الايونات (الزرنيخيد)	تحلل ATP	بروتين غشائي اساسي
أنظمة RND	دفع المواد والايونات Co^{++} , Zn^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} , Ag^{+}	تدرج البروتونات	أنظمة النقل المتعكس للبروتونات والايونات الموجبة مع بروتينات مندمجة في الغشاء

الخلوي			
بروتينات غشاء أساسية	الضخ الكيميائي	قبط المعادن Co^{++} , Ni^{++}	عائلة HoxN
بروتين غشائي أساسي خاص بالكرومات	الضخ الكيميائي	النقل المتعاكس للكرومات	عائلة CHR
بروتين غشاء أساسي (CorA)	الضخ الكيميائي	قبط أكثر الأيونات الموجبة	عائلة MIT
بروتينات غشائية أساسية (CzcD, ZRC1p, ZnT 1)	الضخ الكيميائي	دفع أيونات Zn^{++} , Cd^{++} , Co^{++} , Fe^{++}	عائلة CDF

ان أنظمة النقل غير المتخصصة في بعض الكائنات تكون غير مستحثة وتنقل المعادن بغض النظر عن تراكيزها لذا يطلق عليها البوابات المفتوحة وهي السبب في كون المعادن سامة للخلايا . وعند حصول طفرات في جينات هذه الأنظمة تصبح الطفرات متحملة للمعادن كما في طفرات CorA في البكتريا *E. coli* المتحملة للكوبالت و Pit المتحملة للزرنيخ ، ومثل هذه الطفرات غير ثابتة وتتلاشى من المجموع البكتيري بحدوث طفرات راجعة .

وعند وجود المعدن الثقيل داخل الخلية وخاصة الأيونات الموجبة للعناصر ذات الوزن الذري العالي مثل أيونات الزئبق والكاديوم والفضة فإنها ترتبط الى مجاميع الثايول (-SH) وتؤدي الى منع فعالية الإنزيمات المهمة والحساسة . ويمكن ان تتداخل المعادن مع بعضها مؤدية الى اضطراب المعدن الثقيل الذي يؤدي وظيفة مفيدة للخلايا عندما يكون لوحده كما في تداخل عدد من الأيونات مع أيون الزنك . كما ترتبط المعادن الثقيلة مع مركب الكلوتاثايون وتؤدي الى ربطه . لذا يلاحظ لهذا السبب وغيره ان اجهاد التراكيز العالية من المعادن الثقيلة يمكن ان يؤدي الى إجهاد أكسدة .

اما الأيونات الاوكسجينية السالبة للمعادن الثقيلة داخل الخلايا يمكن ان تتداخل مع ايض الأيونات المشابهة مثل تداخل الكرومات مع الكبريتات ، والزرنيخات مع الفوسفات ، كما ان اختزالها يمكن ان يؤدي الى إنتاج الجذور الحرة كما في اختزال الكرومات . ويوضح جدول (17) التراكيز السامة من المعادن للـ *E. coli* كنموذج دراسي .

جدول 17 : التركيز المثبط الأدنى (MIC) من المعادن الثقيلة للبكتريا *E. coli*

التركيز المثبط الأدنى (ملي مول)	ايونات المعادن الثقيلة
0.01	Hg ⁺⁺
0.02	Ag ⁺ , Au ³⁺
0.2	CrO4 ⁼ , Pb ⁺⁺
0.5	Pt ⁴⁺ . Cd ⁺⁺
1.0	Co ⁺⁺ , Ni ⁺⁺ , Cu ⁺⁺ , Zn ⁺⁺
2.0	UO2 ⁺⁺ , Al ³⁺
5.0	Pb ⁺⁺ , Ir ³⁺ , Os ³⁺ , Sb ³⁺ , Sn ⁺⁺ , Ga ³⁺ , Cr ³⁺ V ³⁺ , Ti ³⁺ , Be ⁺⁺
10.0	Cr ⁺⁺
20.0	Mn ⁺⁺

والسمية القوية للمعادن الثقيلة ووجودها في البيئة وعدم إمكانية انتقالها الى الخلايا أجبرت الأحياء خلال مراحل التطور الأولى الى تطوير آليات للحفاظ على التوازن الأيوني للمعادن الثقيلة وتكونت في بعض الخلايا محددات وراثية تشفر لبروتينات لها تفاعلات تستهدف المعادن الثقيلة موجبة الشحنة ، ولذا كانت المقاومة تختلف عن التحمل ، وبما ان المعادن لا تتحلل مثل المواد العضوية لذلك اختلفت آليات مقاومتها ومن هذه الآليات :

• منع تراكم الايونات داخل الخلية باستعمال آلية الدفع الخارجي Efflux بواسطة مضخات فعالة .

• الايونات المحبة للكبريت يمكن ان تحجز بتكوين معقدات جزيئية حاوية على الثايول .

• إمكانية اختزال ايون المعدن الثقيل الى درجة اختزال اقل سمية .

ويمكن للخلايا استعمال أي من الآليات او الجمع بينها ويكون ذلك اعتمادا على المعدن وعلى نوع الكائن الحي . وعند استعمال آلية الاختزال لإزالة السمية فان ذلك يعتمد على جهد الأكسدة والاختزال Redox potential للمعدن والتي يجب ان تكون القيم لها واقعة بين صفر فولت (الخاص بـ

Oxygen / proton) و 1.229 فولت الخاص بمزدوج الأوكسجين والهيدروجين (Hydrogen / proton) ، وهي القيمة الموجودة في العديد من الخلايا تحت الظروف الهوائية ، وعليه فان كل من ايون ألزئبيك (0.85 فولت) ، والزرنيخات (0.56 فولت) وايون ألنحاسيك (0.153 فولت) يمكن ان تختزل من قبل الخلايا . اما ايونات الزنك (0.762 - فوات) ، ايونات الكادميوم (0.403 - فولت) ، ايونات الكوبالت (0.28 - فولت) ، ايونات النيكل Ni^{++} (0.257 -) لا يمكن ان تختزل في الخلايا .

والمعادن التي تختزل في الخلايا يجب ان تكون قادرة على الخروج منها والانتشار الى الخارج والا أعيدت أكسبتها داخل الخلايا ، ولكن بعض الاحيان فان المركبات الناتجة من الاختزال قد تكون غير ذائبة كما في حالة الكروم Cr^{3+} او تكون أكثر سمية كما في AsO_2^{2-} ، فالخلايا التي تختزل المعادن يجب ان تكون مزودة بأنظمة لدفعها الى الخارج ، لذلك فان ايونات ألزئبيك عندما تختزل الى Hg^0 يكون ضغط بخاره واطنا لذلك يتطاير ولذا تفضل الخلايا استعمال آلية الاختزال لإزالة سميتها . وإذا كانت الخلايا غير قادرة للقيام بعملية الاختزال او ان العملية تؤدي الى ضرر اكبر لذا سيكون الاختيار بين الدفع الخارجي وتكوين المعقدات او الاثنين معا . وعملية تكوين المعقدات تكلف الخلايا الكثير من الطاقة مقارنة بعملية الدفع الخارجي خاصة في الخلايا سريعة النمو ، وتكوين المعقدات تستعمله الخلايا سريعة النمو وذلك لأنها تعود وتقبط الايون من المحيط الخارجي وبذلك تدخل الخلايا دورة لا جدوى منها .

مجاميع البروتينات الناقلة للمعادن الثقيلة : اغلب البروتينات الناقلة تنقل الايونات المشحونة والتي يعتقد انها نشأت أثناء عمليات التطور المبكرة والجدول (16) المذكور يوضح اكثر البروتينات الناقلة والطاقة اللازمة لها . ومن اهم النواقل :

ناقلات ABC : وهي ناقلات بروتينية ترتبط بالـ ATP (ATP – Binding Cassette) وتوجد الناقلات في أشكال الحياة الثلاثة كما موضح في الجدول (18) .

جدول 18 : وجود ناقلات ABC في الأحياء المختلفة

عدد الناقلات / الخلية	حجم الجينوم (زوج قاعدة)	النوع الميكروبي الممثل	المجموعة الخاصة	مجاميع الأحياء الرئيسة
40	2178400	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Euryarchaeota	الاركيا

77	4214807	<i>B. subtilis</i>	Firmicutes	البكتريا الحقيقية
79	4639221	<i>E. coli</i>	Proteobacteria	البكتريا الحقيقية
29	12069313	<i>S. cerevisiae</i>	Fungi	حقيقيات النواة

ومنها يتخصص بقبط المعادن والأخرى لنقل المواد الأخرى الى داخل الخلية او دفعها الى الخارج ولكنها لا تنقل في كلا الاتجاهين في الوقت نفسه .

ويتكون الناقل من 4 وحدات فرعية ، اثنين في الغشاء ، قد تكون متماثلة ، واثنين من جهة الساييتوبلازم قد تكون أيضا متشابهة او مختلفة ، وعليه يتوقع ان تكون هناك 4 جينات تشفر لها ، او وجود جين واحد يكون سلسلة بيبتيديية مكونة من 4 أجزاء . وفي البكتريا السالبة لصبغة كرام توجد بروتينات إضافية تكمل العمل اعتمادا على اتجاه النقل . ففي حالة القبط تتعاون البروتينات مع بروتين في الفسحة المحيطة يرتبط بالمادة المنقولة . وفي حالة التصدير الى الخارج يرتبط بروتينين آخرين من البروتينات المدمجة في الغشاء الخارجي من عائلة Membrane fusion proteins family (MFP family) ، وتتعاون مع بروتينات الغشاء الخارجي OMF لذلك فان بروتينات OMF ، MFP تنقل المواد من الساييتوبلازم الى خارج الخلايا . وفي البكتريا تستعمل ناقلات ABC لنقل ايون المنغيز في *St. gordonii* وايونات الزنك والنيكل في *E. coli* . وتعمل الناقلات في أنواع أخرى من الخلايا لإدخال المواد او دفعها الى الخارج ، وفي خلايا الإنسان الورمية تعرف بـ MDR (Multi drug resistance) . وترتبط الناقلات وتلعب دورا مهما في العديد من الأمراض مثل التحوصل الليفي Cystic fibrosis والسكري ومتلازمة Zellweger وتلعب دورا مهما في مقاومة Chloroquine في طفيلي الملاريا .

وتعد عائلة ناقلات ABC من اكثر البروتينات التي تحصل فيها التغيرات اذ تصل الى 10 أضعاف ما يحصل في البروتينات الاخرى ويكون ذلك معتمدا على الكائن الحي ، ويحصل التغيرات في المناطق الثابتة من البروتينات التي تسمى مناطق Walker A و Walker B ويوجد بينها مناطق يطلق عليها ABC signature .

تنقل ABC مواد بروتينية يصل وزنها الجزيئي الى 107 كيلو دالتون وتنقل مواد أخرى حتى الايونات مثل ايونات الكلور . وفي خميرة الخبز تكون مسؤولة عن نقل فرمونات التزاوج ، وفي

البكتيريا يساهم نوع منها *Specific drug resistance (SDR)* في مقاومة الأدوية والمضادات الحيوية . و ABC بالإضافة الى عملها كناقلات فإنها تعمل كقنوات او منظمات للقنوات .

الوظائف الفسلجية للناقلات ABC

في البكتيريا تقسم الناقلات الى قسمين رئيسية :

• **الموردات Importers** وهي المسؤولة عن نقل المواد الغذائية وتسمى ايضا Periplasmic permeases وتكون متعددة الوحدات وتتشابه في ترتيبها في بدائيات النواة ولكن تختلف عن الموجودة في حقيقيات النواة في الترتيب ، ومن المدروس منها البروتين المرتبط بالهستيدين His J في البكتيريا *Sal. typhimurium* ويعمل كمستلم على سطوح الخلايا ويوجد منه نوعان مرتبطة بالغشاء الخلوي .

• **المصدرات Exporters** وتعمل في عمليات إفراز البروتينات والبيبتيدات والمركبات اللابروتينية وهي مشابهة لما موجود في الخلايا حقيقية النواة . وتوجد منها أنواع متخصصة في البكتيريا السالبة لصبغة كرام لنقل بعض المواد ، كما توجد أنواع متخصصة بنقل البروتينات في البكتيريا الممرضة للنباتات مثل *Erwinia chrysanthemi* وأخرى متخصصة بنقل البكتريوسينات في بكتيريا حامض اللاكتيك مثل *Lactococcus lactis* ، وتوجد منها عوامل مهمة في البكتيريا الزراعية *Agrobacterium tumefaciens* لنقل الكاربوهيدرات او مكوثرات الكلوكان β -1,2 - glucan oligomers التي تساعد البكتيريا للارتباط الى الخلايا النباتية وبذلك تعد عامل ضراوة في *Agrobacterium* . وتساهم في نقل عامل تكوين العقد الجذرية (NDVA) في البكتيريا *Rhizobium meliloti* .

اما في الاحياء المجهرية حقيقية النواة مثل خميرة الخبز فيوجد منها 29 ليست كلها معروفة الوظيفة ، وتقسم الى 6 عوائل يوجد بعضها في الخميرة المنشطرة *Sz. pombe* والخميرة الممرضة *C. albicans* . وتوجد في العديد من الفطريات الخيطية ولها وظائف فسلجية مختلفة فهي تشارك في إفراز مواد الايض الثانوي ، واخرى تشارك في حماية الخلايا ضد المواد السامة الناتجة من قبل الاحياء الموجودة مع الفطريات في النظام البيئي نفسه . وتساهم في مقاومة الفطريات الممرضة للنباتات ضد أنظمة دفاع النباتات أي تعمل ضد التأثير السام للمواد الدفاعية النباتية مثل Isoflavonoids والقلويدات النباتية ، والمضادات الحيوية وتبعدها الى الخارج لتلافي تأثيرها السام . وتساهم ناقلات ABC في الفطريات الخيطية والخمائر في إفراز عوامل التزاوج .

P- type ATPases

ناقلات مكونة من سلاسل بيبتيديية متعددة تستعرض الغشاء مكونة قناة وتحتوي السلسلة على موقع للارتباط بـ ATP وموقع لتحليله . وبعض الاحيان يمكن ان تحوي على وحدات إضافية . وهذه الناقلات يمكن ان تنقل المواد باتجاهين ولكن لكل اتجاه نظامه الخاص . وتنقل الايونات الموجبة اللاعضوية مثل الايونات ثنائية التكافؤ والايونات أحادية التكافؤ والأخيرة يمكن ان تشمل البروتونات . وتنتشر في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وكذلك في الخلايا حقيقيات النواة . وقد توجد في بعض البكتريا أنواعا منها اعتمادا على التركيز كما في *Enterococcus hirae* عند نقل النحاس

وتوجد في اللبائن أنظمة مشابهة لنقل النحاس وفقدان أنظمة نقل النحاس هذه تؤدي الى أمراض وراثية مثل Menke's disease و Wilson's disease والتي تشابه الأمراض التي تحصل في الخرفان والفئران ، اذ تؤثر على نقل النحاس من الأمعاء او في خلايا الكبد .

A- type ATPases

ناقلات صغيرة الحجم ولكن أعدادها كبيرة . ومنها النوع المسئول عن مقاومة الزرنيخات وتكون جيناته في *E. coli* بلازميدية ، ولكن توجد أنواعا جيناتها كروموسومية . وتتكون الناقلات في اغلب الاحيان من وحدتين . البعض منها تستعمل الضخ الكيماوي مصدرا للطاقة وأخرى تعتمد على تحليل ATP .

وفي حالة الزرنيخات وانتقالها الى الخلايا فانها تختزل الى الزرنيخيد ، في حين ان الايون المشابه وهو الفوسفات لا يمكن اختزاله . ولحد الان فان هذه الناقلات وجدت في حالة مقاومة الزرنيخات .

ناقلات RND

ناقلات جاءت تسميتها من Resistance nodulation cell division وتوجد في البكتريا السالبة لصبغة كرام ، ويتكون الناقل من نصفين والتي يعتقد انها نشأت من تضاعف الجين المسئول أثناء تطور الأحياء . وكل نصف يتكون من جزء كاره للماء وآخر محب للماء . وهي في اغلب الاحيان أنظمة تصدير للخارج تعتمد على البروتون ، ولذلك يعتقد ان احد النصفين هو قناة لنقل البروتون والنصف الآخر هو قناة لنقل المواد ، أي تعمل في النقل المتعاكس . وتوجد هذه الناقلات في مضخات CzcA التي تنقل الكاديوم والزنك والكوبالت . والمضخات تتداخل في معظم الاحيان مع MFP , OMF المذكورة انفا لتعمل ثقب عبر الأغشية الخارجية كلها للسماح بدفق الايونات من الساييتوبلازم الى الخارج دفعة واحدة . وهذه المضخات تنقل ايونات المعادن

الثقيلة والمواد العضوية وتكون مسئولة أيضا عن المقاومة المتعددة للأدوية . ويمكن ان تكون هذه الناقلات أنظمة معقدة مع بروتينات أخرى مثل CzcCBA وهذه مضخة كبيرة (فيها CzcA وهو الناقل RND و CzcB وهو بروتين MFP و CzcC وهو بروتين OMF) ، وتقوم بإزالة سمية ايونات الكوبالت والزنك والكاديوم .

وفي بعض البكتيريا يشفر لهذه المضخة الكبيرة بالبلازميد كما في البكتيريا *Alcaligenes eutrophus* والبكتيريا هذه يمكن ان تحوي على بلازميد كبير اخر هو *cnrCBA* الذي يطرد ايونات Ni^{++} , Co^{++} . اما في البكتيريا *A. xylosoxidans* فتحوي نظام آخر يسمى NccCBA الذي يضفي المقاومة ضد ايونات الكوبالت والنيكل والكاديوم .

ناقلات HoxN

مجموعة او عائلة من الناقلات في البكتيريا *Ralstonia eutropha* (التي كانت تسمى سابقا *A. eutrophus*) ، الناقلات تحتاجها الخلايا لنقل ايونات النيكل لغرض تخليق إنزيمات Hydrogenases التي تعد إنزيمات الخطوة الأولى من خطوات تمثيل الهيدروجين في نمط الحياة ذات التغذية الكيماوية الصخرية. وتكون الناقلات ذات ألفة عالية للنيكل في البكتيريا أعلاه . في حين ان البكتيريا *E. coli* تستعمل ناقلات ABC لهذه المهمة .

والناقلات لا تعتمد على تحلل ATP وانما على الطاقة الناتجة من الضخ الكيماوي . وتكون المضخات متخصصة للايونات التي تنقلها والبعض منها ينقل الكاديوم .

ناقلات CHR

عائلة صغيرة من الناقلات مسئولة عن طرد الكرومات في البكتيريا والاركيا ، ويعتقد ان معالجتها للمعادن الثقيلة يتم بعملية الدفع الى الخارج التي تكون مفضلة بالنسبة للخلايا من ناحية حفظ الطاقة . وهي تنقل الكبريتات نظرا لمشابهتها للكرومات .

ناقلات CDF

ناقلات تساعد في النقل الميسر للايونات الموجبة Cation diffusion facilitators وتضم مجموعة من الناقلات تقوم بنقل المعادن الثقيلة في العديد من الاحياء المجهرية مثل البكتيريا والفطريات وكذلك في الديدان والبائن والنباتات ، وتساهم في نقل الكوبالت والكاديوم والزنك ، وتتكون من 6 حلزونات ألفا تستعرض الاغشية الخلوية وجزء كبير منها محب للماء وتنتشر في توالياتها ثملالات الهستيدين ، ومنها :

- CzcD موجودة في الفسحة المحيطة وتنحس بالايونات الموجبة و تعمل كمتحسس لغرض تنظيم النظام الناقل RND – type Czc المذكور اعلاه .

• 1p ZRC يساهم في توازن الزنك والكاديوميوم /Zn Cd ويشترك في تنظيم تخليق الكلوتاثايون في خميرة الخبز .

ناقلات MIT

ناقلات تعمل في نقل الايونات اللاعضوية Metal inorganic transporters ومنها CorA في *Sal . typhimurium* وهو من أنظمة النقل السريع غير المتخصصة وتساعد في نقل العديد من الايونات الثنائية للمعادن التكافؤ الثقيلة . ويوجد في العديد من الأنواع البكتيرية والخمائر مثل خميرة الخبز .

المعادن والأنظمة الحيوية

بعد دراسة الوسائل التي تصل بها المعادن الثقيلة الى داخل الخلايا يمكن دراسة تأثيرها على الخلايا او الأنظمة الحيوية ومنها :

الزرنيخ (As)

يعد من أشباه المعادن لأنه يتصرف كمعدن وليس في كل الاحيان . وهو من المركبات السامة جدا ، ويوجد بشكل رئيس بتكافؤ خماسي كما في الزرنيخات AsO_4^{3-} وقد يكون ثلاثي التكافؤ كما في الزرنيخيد AsO_2^- . الزرنيخات تشابه الى حد كبير الفوسفات التي تعد من الجزيئات الحيوية المهمة جدا ، وبسبب سمية الزرنيخ فلا يتوقع ان تكون له وظائف في الانظمة الحيوية ، ولكن بعض البكتريا يمكن ان تستعمله مستلما للالكترونات في التنفس اللاهوائي ، وتحتوي الاحياء التي تتعامل مع الزرنيخ على انزيمات Arsenate reductase ، Arsinite reductase . تدخل الزرنيخات الى الخلايا البكتيرية بواسطة أنظمة قبط غير متخصصة او أصيلة (غير مستحث) خاصة بالفوسفات ، والطفرات في هذه الانظمة تجعل البكتريا مقاومة للزرنيخات ولكن سرعان ما تعود الطفرات الى الحالة الطبيعية . ويمكن للخلايا ان تجمع كل من الفوسفات والزرنيخات بواسطة أنظمة مستحثة متخصصة مثل Pst .

وعندما تصبح الزرنيخات داخل الخلايا تحدث مشكلة نظرا للتشابه التركيبي مع الفوسفات ويجب إزالة سميتها ، وعند إزالة السمية تكون الخطوة الأولى اختزال الزرنيخات الى زرنيخيد وهذه الخطوة في *E. coli* تتم بواسطة البروتين ArsC ويكون الاختزال مرافقا لأكسدة الكلوتاثيون عن طريق Glutaredoxin اما في البكتريا *Staph. aureus* فيكون معطي الالكترونات لاختزال الزرنيخات هو Thioredoxin ، وبعد تكون الزرنيخيد يتم طرده الى خارج الخلية بنظام بسيط يعتمد على تدرج الضخ الكيماوي واستعمال بروتين واحد لدفعه الى الخارج وهو البروتين ArsB ويشفر لهذا البروتين بواسطة البلازميدات في بعض السلالات وأخرى بواسطة الكروموسوم .

ويوجد بالاضافة الى ArsB نظام اخر هو de lux ويتكون من ArsA + ArsB ويمكن للـ ArsB ان يعمل لوحده في بعض البكتريا ويزود بالطاقة من الضخ الكيماوي وتحلل ATP ، اما ArsA فيتكون من تركيب مزدوج فيه 4 مواقع للارتباط بالـ ATP ويوجد في العديد من البكتريا والاراكيا والفطريات والنباتات والحيوانات .

عمليات التنظيم

المقاومة للزرنيخ تنظم بواسطة البروتين الكابح ArsR وهو تركيب مزدوج ويسيطر على المستوى الأساسي للتعبير عن الاوبرون *asr* ، اذ يرتبط ايون الزرنيخ الثلاثي As III الى البروتين

المزدوج ويمنعه من الارتباط الى منطقة الممهد . ويوجد نظام اخر للتنظيم هو ArsD يمكنه الارتباط الى DNA للقيام بعمليات التنظيم وتكون المفاضلة بين النظامين معتمدة على التركيز .

اما في الاحياء الاخرى مثل *Leishmania* وغيرها من الابتدائيات فتكون ناقلات ABC هي المسؤولة عن مقاومة الزرنيخ وهي تقاوم الزرنيخيد والانتيمون بنوعيه الثلاثي الخماسي التكافؤ (Sb , SbIII , IV) بألية الدفع الخارجي ، كما يمكن إزالة سمية الزرنيخ بتكوين المركبات المعقدة مثل As III- glutathione conjugates ، اضافة الى وجود بروتينات سكرية خاصة p- glycoproteins لتصدير الزرنيخيد غير المقترن .

وفي خميرة الخبز والإنسان توجد ثلاث انظمة قريبة الشبه بـ ArsB لذلك يعتقد ان ايض الزرنيخ قد يكون متشابها في الاحياء عامة ويكون بالخطوات الآتية :

- قبط الزرنيخات بنظام الفوسفات .
- اختزال الزرنيخات الى زرنيخيد .
- طرد الزرنيخيد بعد تكونه بواسطة بروتينات خاصة مثل ArsB او بواسطة ناقلات ABC واستعمال ArsA – ATPases لتزويد الطاقة في بعض الاحيان .

الفضة (Ag) Silver

وهي تشابه النحاس نوعا ما وتوجد بشكل ايونات أحادية التكافؤ Ag^+ تكون مركبات قوية الارتباط بالكبريت مكونة كبريتيدات الفضة التي تكون اكثر ذوبانا من كبريتيد النحاس . ومدى ارتباطها بالكبريت مشابه لميل الزئبق لذلك يتشابه التركيز المثبط الأدنى MIC في *E. coli* وهو 20 مايكرومول .

ونظرا لسميتها فلا تعد من المعادن النادرة في الأنظمة الحيوية ولكنها تستعمل في المجال الطبي كمضاد للميكروبات ، لذا يقطر محلول مخفف من أملاحها بعد الولادة مباشرة في العيون لمنع الإصابة بسلالات من بكتريا *Neisseria* .

وتوجد بعض البكتريا المقاومة للفضة وتستطيع ربط الايون ببعض المركبات داخل الخلية مثل كبريتيد الهيدروجين والفوسفات . وفي البكتريا المقاومة *Ent. hirae* وجد ان ايون الفضة ينقل الى الخارج بأنظمة نقل النحاسوز Cu^+ ، اما في *E. coli* فان المقاومة تتم بواسطة ناقلات من نوع RND التي تنقلها بشكل تام الى خارج الغشاء الخارجي والجدار الخلوي والغشاء الخلوي الموجودة في البكتريا السالبة لصبغة كرام عادة ، اما في البكتريا الموجبة لصبغة كرام فيتم دفعها الى الخارج بواسطة p – type ATPases إضافة الى تكوين المعقدات داخل الخلايا .

الموليبدينم (Mo) Molybdenum

يوجد عادة على شكل ايون سداسي التكافؤ كما في المولبيدات MoO_4^{2-} ويشابه الكروم ، ويكون غير سام لمعظم الخلايا . تنقل المولبيدات بنظام نقل الكبريتات ولكن يوجد نظام خاص بها وهو نظام مستحث من نوع ناقلات ABC . يدخل الايون في تركيب بعض الانزيمات التي يرتبط بها من خلال العامل المساعد Mo - cofactor المتكون من مركبات Pertin أحادية او ثنائية النيوكلووتيدات . ومن اهم الإنزيمات التي يشارك بها هو نظام تثبيت النتروجين Nase المتكون من جزأين ، ويتعاون الموليبدينم مع الحديد لنقل الالكترونات لاختزال النتروجين الى الامونيا ليصبح تكافؤ النتروجين 3- وهو التكافؤ الذي يمكن به الدخول الى الانظمة الحية . ويشارك العنصر في المكون الأخير في بعض السلاسل التنفسية اللاهوائية كما في استعمال النترات كمستلم نهائي للالكترونات بدلا عن الأوكسجين او غيرها من مستلمات الكترونات .

الكادميوم (Cd) Cadimium

عنصر يشابه الزنك من ناحية التوزيع الالكتروني الذري ، ومركباته مع الكبريت أي الكبريتيدات اقل ذوبانا من كبريتيد الزنك ولذا تكون له علاقة وثيقة بالزنك ولكنه أكثر سمية منه . ويعتقد ان سميته ناشئة من :

- ارتباطه لمجاميع الثايول في الإنزيمات والبروتينات .
- يمسح بعض البروتينات .
- يتداخل مع ايض الكالسيوم .
- يتداخل مع ايض الزنك .
- له تاثير مدمر للاغشية الخلوية .

ومن أهداف الكادميوم هو البروتين DsbA الموجود في الفسحة المحيطة للبكتريا السالبة لصبغة كرام والذي تحتاجه الخلايا لتكوين الكبريتيدات الثنائية لذلك فحصول طفرة في هذا البروتين يجعل الخلايا مقاومة للايون . ويمكن للخلايا ان تراكمه باستعمال أنظمة نقل المغنيسيوم كما في البكتريا A. *eutrophus* CH34 . وفي بكتريا اخرى وخميرة الخبز فالخلايا تراكمه باستعمال أنظمة نقل المغنيز .

ويعد الكادميوم من العناصر السامة جدا لذلك تطرده الخلايا الى الخارج بشكل عام ، اما البكتريا المزرقة فتكون استثناء فهي تحوي على Metallothioneines التي يشفر لتخليقها بالجين *SmtA* ، فعند زيادة التعبير عنه تزداد المقاومة للكادميوم ، وينظم *SmtA* بواسطة الجين *SmtB* الذي ينظم ايضا أنظمة نقل الزنك Zn- transpoting p – type ATPases ، اما الانواع الاخرى من البكتريا

المزركة الحاوية على أنظمة RND و p – type ATPases فتقاوم الكادميوم بواسطة هذه الأنظمة أكثر من الاعتماد على Metallothioneines .

اما في البكتريا السالبة لصبغة كرام فازالة سمية الكادميوم تتم بواسطة الأنظمة التابعة للـ RND مثل Czc الذي هو أساسا لتصدير الزنك وكذلك Ncc (نظام تصدير النيكل) . وفي البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *Staph. aureus* فتحتوي على CadA وهو من نوع p – type ATPases لتصدير الكادميوم . ويتم تنظيم CadA بواسطة الجين *CadC* .

وفي الخميرة مثل خميرة الخبز فان الكادميوم يرتبط الى الكلوتاثايون ليكون المركب Cadmium – bis – glutathionato complex الذي ينقل بواسطة الناقل YCF 1p الى الفجوة وقد تكون هذه الآلية هي الشائعة في الخلايا حقيقية النواة .

وفي الإنسان فان البروتين المسئول عن المقاومة المتعددة للأدوية يقابل البروتين YCF 1p يساهم في مقاومة الكادميوم . اما في النباتات فتكون المقاومة بتكوين الخلابات وهي مكوثرات للكلوتاثايون ، والمعقد الناتج من الخلاب و الكادميوم ينقل بواسطة بروتين خاص من مجموعة نواقل ABC الى الفجوة داخل الخلية . اضافة الى ذلك فانه في الخلايا حقيقية النواة تشارك Metallothioneines التي ترتبط بالكادميوم مثل ZRC 1 في تايض الكادميوم وازالة سميته .

الانتيمون (Sb) Antimony

يشابه الزرنيخ لذلك فسميته تزال بشكل مشابه لإزالة سمية الزرنيخيد بواسطة الدفق الخارجي . في *E. coli* يدخل الخلايا عن طريق مسار دخول الكليسرول الميسر (Glycerol facilitator) (G 1p) (F) . ويقوم الانتيمون بحث الأنظمة التي تؤدي الى تصديره الى الخارج . ولذلك توجد له متحسسات حيوية خاصة به على سطوح الخلايا تقوم بالتحسس به واجراء عملية الحث .

التنكستن (W) Tungsten

يشابه عنصر الموليبدنم في بعض الخواص ، وله فوائد حيوية للخلايا ، وهو غير سام لخلايا *E. coli* ، ينتشر في القشرة الأرضية والبيئات المائية بشكل كبير بالرغم من كبر العدد والكتلة الذرية له ، يكثر في مياه البحر وكذلك في البيئات اللاهوائية بشكل اكبر من الموليبدنم .

يوجد في بعض انزيمات الاحياء اللاهوائية والاركية خاصة عندما تقوم بالايض اللاهوائي . ومثلما مع الموليبدنم فهو يوجد في الانزيمات بواسطة Cofactor . لم يسجل وجوده في أنظمة تثبيت النتروجين ولكنه يوجد في بعض الانزيمات الموجودة في جنس *Clostridium* ، ويمكن لهذه البكتريا ان تجمعها من البيئة المحيطة لتركزه بمستويات تعلو الآلاف المرات تركيزه خارج الخلايا وذلك بعمليات النقل الفعال التي تصرف فيها كميات كبيرة من الطاقة .

يدخل في إنزيمات السلاسل التنفسية لبعض البكتيريا البحرية تحت الظروف اللاهوائية مثل عند تنفس النترات أو غيرها من مستلزمات الإلكترونات النهائية . ويشارك في بداية إنزيمات السلاسل اللاهوائية مثل إنزيم نزع هيدروجين الفورمات *Format dehydrogenase* وكذلك في الانزيمات النهائية *Reductases* للسلاسل التنفسية ، وبذا يمكن ان يحل مكان المولبيدوم في هذه الانزيمات .

الزئبق (Hg) Mercury

من المعادن الثقيلة ذات السمية القوية . يقع ضمن مجموعة العناصر الانتقالية التي تشمل الزنك و الكاديوم المذكورة ويكون مشابه لها من ناحية التوزيع الالكتروني ، وألفته لمجاميع الثايول عالية واوى من الكاديوم . ومما يزيد من سميته قدرة أملاحه العالية على الذوبان فيكون ساما للـ *E. coli* بتركيز قليلة تصل الى 10 مايكرومول . ونظرا لسميته العالية فلا توجد له وظيفة في الأنظمة الحيوية . وتقاوم البكتيريا ايوناته السامة Hg^{++} باحتوائها على الجين *mer* . وعمليات مقاومته تعتمد على التصرفات الخاصة به ، فجهود الأكسدة والاختزال Hg^{++} / Hg^0 هو 0.851 فولت (كما ذكر سابقا) وضغط بخاره الجزئي واطئ ونقطة انصهاره واطنة (38.87° م) ، ونقطة غليانه عالية ، كل هذه الصفات تجعل الخلايا قادرة على اختزال ايوناته الى عنصر الزئبق الذي لا يبقى داخل الخلية وانما يتركها بواسطة الانتشار البسيط لان بقاءه في الخلية يجعله عرضة للأكسدة ثانية ، وعليه فان إزالة سميته تتم بعملية الاختزال ثم نقله بسرعة الى داخل الخلايا حتى لا يسمم البروتينات في الفسحة المحيطة في البكتيريا السالبة لصبغة كرام . وكخطوة أولى يرتبط الايون بالبروتين *MerP* الموجود في الفسحة المحيطة وهي أول خطوة في إزالة السمية ، ثم يسلمه البروتين الى بروتين آخر هو *MerT* الذي ينقل الايون الى الساييتوبلازم . وتوجد بروتينات اخرى لقبط الزئبق مثل *MerC* . وعندما يكون الايون داخل الخلية فانه يختزل بتفاعل يعتمد على *NAD(P)* ويتحول الى Hg^0 بواسطة البروتين *MerA* الذي له علاقة بالإنزيم *Glutathione reductase* وبروتينات أخرى

والمركبات العضوية للزئبق تكون أكثر سمية وتزال سميتها بنظام *mer* الخاص اذ يقوم *MerB* وهو انزيم *Organomercurial lyase* إضافة الى بروتينات اخرى بهذه الفعالية ، وبعد فصل ايون ألزئبق من المركبات العضوية فان الايون الناتج يختزل بواسطة *MerA* .

اما عمليات تنظيم مقاومة الزئبق فهي معقدة وصارمة وتتم بشكل أساسي بواسطة *MerR* وهو بروتين مكون من وحدتين ، يرتبط الى مهاد الجين *mer* ويمنع انتساخه عند عدم وجود ايونات الزئبق . اما عند وجود الأخير فان منطقة المهاد ترخي التوائها ويمكن لإنزيم *RNAP* بانتساخها بكفاءة عالية . ولمنع الانتساخ المفرط يقوم بروتين منظم *MerD* بهذه المهمة .

الزئبق بسميته العالية وصفاته الخاصة من ناحية الاختزال والتطاير بعد تحويله الى العنصر المتعادل يعد مثاليا لدراسة عمليات المعالجة الحيوية في البيئة . وقد قامت محاولات في هذا المجال منها :

- ادخل جين *MerA* في احياء اخرى لملاحظة إمكانية إطلاقها في البيئة .
 - تم ربط جين *MerA* مع جين الإعلان *lux* لمراقبة التلوث .
- ومثل هذه المحاولات عدت مشجعة لمعالجة البيئة من التلوث .

الرصاص (Pb) Lead

يأتي الرصاص ملوثا للبيئة نتيجة استخدام بعض مركباته في الوقود . وسميته معروفة منذ القدم ، ورغم انه ليس من العناصر الانتقالية الا انه سام جدا وينتمي الى المجموعة التي تضم الكربون والسيلكون Si ، الجرمانيوم Ge ، والقصدير Sn ، ينتشر في البيئة بدرجات متفاوتة فهو قليل في مياه البحر . ومما يقلل من سميته هو ان أملاحه قليلة الذوبان وبذا تكون جاهزيته الحيوية واطئة جدا ، وتحتاج *E. coli* الى تراكيز عالية لتصل الى حد التسمم مثل استعمال 5 ملي مول . وهو لا يعد ذات سمية غير اعتيادية ولكن الاستخدام الكبير له من قبل الإنسان هو الذي أدى الى وجود مشاكل مع الرصاص . وتحمله بعض البكتريا مثل *A. eutrophus* CH34 التي ترسب فوسفات الرصاص داخل الخلايا . والسلالات المقاومة تستعمل p – type ATPases لدفعه الى خارج الخلايا .

اليورانيوم (U) Uranium

من العناصر التي لها أعلى عدد ذري ، ويوجد بتكافؤ سداسي عادة كما في UO_2^{+2} وهذا التكافؤ قليل السمية للـ *E. coli* ، ويوجد العنصر بتكافؤات اخرى . يمكن ان يستعمل في التنفس اللاهوائي لبعض الأحياء ، ويمكن التخلص منه بربطه الى البكتريا *Pseudomonas* ، *Citrobacter* . والمشكلة مع العنصر هي في نظائره المشعة التي سيفرد لها موضوع خاص لمناقشتها .

الفناديوم (V) Vanadium

من المعادن الثقيلة واطئ العدد الذري ، يكون بعض الاحيان سام لبعض الأحياء . ونظرا لاحتواء غلافه الخارجي (3d) على 3 إلكترونات فيسمح له بتكوين ايونات متغيرة التكافؤ ، ولكنه يوجد عادة بتكافؤ خماسي على شكل Trivalent oxyanion vanadate . والفنادات تشبه الفوسفات من الناحية التركيبية لذلك يكون مثبطا للـ ATPases ، وتقبطه الخلايا بواسطة أنظمة نقل الفوسفات .

تستخدمه البكتريا المثبتة للنيتروجين حرة المعيشة *Azotobacter chroococcum* لتنشيط النيتروجين الجوي عند غياب ايونات الموليبدات في النظام البيئي . ويستعمل في حالات قليلة مستقبلا

للالكترونات في حالة التنفس اللاهوائي . وعلاقته مع الاحياء الاخرى تكون مختلفة ، فخميرة الخبز تضم سلالات مقاومة للفنادات ، اما الاركيا مثل *Sulfolobus* فتحتوي على تراكيز عالية من الفنادات تصل الى 20 ملي مول .

الكروم (Cr) Chromium

يوجد الكروم بتكافؤ سداسي في الايونات السالبة Oxyanions مثل الكرومات ، والصورة الثانية التي يوجد بها هو ثلاثي التكافؤ ، والتحول بين حالتي التكافؤ مختلفة تحت الظروف الفسلجية لذا تكون مهمة من هذه الناحية .

الكرومات اكثر سمية من Cr^{3+} وتزداد سميته عند انخفاض الرقم الهيدروجيني ، ويتربسب Cr^{3+} عند معادلة الرقم الهيدروجيني . ونظرا لسمية الكرومات فان الفائدة الفسلجية تنحصر بايون الكروم الثلاثي التكافؤ ، وفي الإنسان يرتبط ببيتيد واطى الوزن الجزيئي بأربع ذرات كروم مكونا $Cr-peptide$ تنشيط كابينيز التايروسين في مستلمات الأنسولين . ولذلك فان قلة الكروم يؤدي الى قلة تحمل الكلوكوز وتظهر أعراض تشبه أعراض داء السكري . والتناول اليومي للإنسان يكون 50 – 200 مايكر و غرام / يوم ويأتي من الأغذية فالثوم يحوي على حوالي 4 ملغم / كغم ، كما ان الحبوب واللحوم تكون مصادرا جيدة للكروم .

التراكيز العالية من الكرومات (حوالي 0.5 غرام) في الجسم تدمر الكلى والكبد ، اما التراكيز الأقل تكون مسرطنة بشكل كبير خاصة للجهاز التنفسي وأعضاء اخرى . وذلك لان الكرومات داخل الخلايا تختزل بواسطة أنظمة الأكسدة والاختزال المختلفة مؤدية الى تكوين الجذور الحرة التي تهاجم DNA وربما كانت السبب في توليدها للسرطانات ، ولذلك فان التراكيز العالية من Cr^{3+} داخل الخلايا يكون دليلا على التدمير الكبير للـ DNA .

في الاحياء المجهرية لم تسجل أي فائدة للكروم ، وفي البكتريا *A. eutrophus* تدخل الكرومات عن طريق قبط الكبريتات . والمقاومة للكرومات في البكتريا تعتمد على اختزال الكرومات ودفعها الى الخارج ، فمثلا البكتريا *Ps. fluorescens* تقوم السلالات المقاومة منها باختزال الكرومات وبالألية نفسها يمكن للعديد من الأنواع البكتيرية مقاومة الكرومات ، إضافة الى ان بعض الخلايا المقاومة تستعمل طريق طرد الكرومات الى الخارج ، في حين توجد أنواع تستعمل الآليتان .

ويكثر التلوث بالكرومات نتيجة استعمالها بكثرة في المدابغ Tanneries لذلك تكون التربة المحيطة بها ملوثة بشكل كبير اذ يصل تركيز الكروم الى عدة غرامات / كغم تربة . والمعالجة الحيوية لتلوث الكرومات يتم باستعمال البكتريا المختزلة لها ، ولكنها غير ناجحة في معظم الاحيان وذلك لان الكرومات المختزلة تؤكسد ثانية وبسرعة ، أي ان إزالة السمية لا يمكن ان تكون دائمة ، وعليه تعد النباتات الخيار الأفضل أي باستعمال Phytoremediation ، فالكرومات تختزل في الجذور الى

Cr^{3+} الذي نادرا ما ينتقل الى الأجزاء العلوية ، وهي عملية معقدة ولكن بالدراسات النشطة يمكن الوصول الى وسيلة ناجعة لمعالجة تلوث الكرومات .

المنغنيز (Mn) Manganese

الغلاف الخارجي لذرة المنغنيز (d orbital) يكون نصف ممتلئ ، ويوجد في حالات أكسدة مختلفة تمتد من التكافؤ الثنائي II الى التكافؤ السباعي VII ، وأكثر الايونات شيوعا هو التكافؤ الثنائي ، تستعمله بعض البكتيريا مستلما للالكترونات في التنفس اللاهوائي .

سميته واطئة جدا للأحياء المجهرية وخاصة البكتيريا ، ولكنه يكون ساما للجهاز العصبي المركزي في الأحياء الراقية مثل الإنسان . ونظرا لاختلاف توزيع الالكترونات في أغلفته الخارجية فهو يستطيع ان يكون عددا من المعقدات ، ويمكن في البعض منها ان يحل المغنسيوم مكانه .

أهم وظائفه هو فلق جزيئة الماء في عمليات التخليق الضوئي المنتجة للأوكسجين التي تتم في Photosystem II في النباتات وغيرها من الأحياء التي تقوم بعمليات التخليق الضوئي . ومن اهم الإنزيمات البكتيرية المهمة الحاوية على المنغنيز هي Superoxide dismutases . وتوجد أنواع أخرى من الإنزيم تحوي على الحديد Fe-SOD وأخرى تحوي على النحاس والزنك Cu/Zn-SOD ، وبعض البكتيريا تكون احد الانزيمات المذكورة اعتمادا على المواد الغذائية المتوفرة فمثلا البكتيريا *Propionibacterium shermanii* يمكن ان تحوي الانزيم الحاوي على المنغنيز او الحاوي على الحديد اعتمادا على الأوساط الغذائية التي تنمو فيها .

يقبض المنغنيز ثنائي التكافؤ في *A. eutrophus* بنظام خاص به ، اما في البكتيريا *Sal. typhimurium* السريعة النمو فتقبطه عن طريق الأنظمة السريعة غير المتخصصة الخاصة بالمعادن الثقيلة مثل CorA والذي يؤدي الى تراكم العنصر داخل الخلايا ، وإضافة الى ذلك تستعمل البكتيريا الأنظمة المتخصصة البطيئة من عائلة p-type ATPases . في الخمائر مثل خميرة الخبز فتقبط الايون باستعمال CorA تحت الظروف الطبيعية ، إضافة الى احتوائها على أنظمة خاصة لنقل الايون ، وتحت ظروف المجاعة تستعمل البكتيريا ناقلات ABC .

المغنيسيوم (Mg) Magnesium

يعد المغنيسيوم الرابع في الترتيب من حيث الوفرة في الانظمة الحيوية ويوجد بشكل اساسي كايون ثنائي التكافؤ . ينتشر في البيئة بشكل كبير ويكون متوفرا وجاهزا للأحياء في البيئات المائية واليابسة . يدخل الخلايا بواسطة أنظمة نقل خاصة مثل Cor A الخاصة به ، وهي من أنظمة النقل السريع غير المتخصصة ، ويخرج منها ايضا بمساعدة بروتينات خاصة ، كما ان انتقاله بين

الأجزاء المختلفة من الخلايا يتم بمساعدة البروتينات . ودخوله الى الخلايا الحية يعتمد على تدرج التركيز وكذلك على الجهد الكهربائي $\Delta \psi$ عبر الاغشية الخلوية .

تحتاجه الخلايا بتركيز معينة ، وزيادته Hypermagnesemia تؤدي الى تأثيرات سامة في الخلية وفي الإنسان يؤدي الى إتلاف الكلى ، في حين ان نقصانه Hypomagnesemia يؤدي في الانسان الى فقدان التوازن لضعف العضلات ، اما نقصانه بالنسبة للأحياء المجهرية مثل البكتريا والخمائر فيؤدي الى انخفاض معدلات النمو ، وفي الخمائر يؤدي نقصانه في الماييتوكوندريا الى اعتلال الخلايا وربما موتها .

تركيز الايون في السائل الخلوي يكون منخفضا لأنه يرتبط الى الخلاصات الخلوية او يخزن في بعض أجزاء الخلية خاصة في حقيقيات النواة . ويكون المرتبط منه أضعاف الشكل الحر وتصل تراكيزه الى 100 مول / لتر في اوراق النباتات الخضر لانه يشارك في عمليات التخليق الضوئي . له اهمية كبيرة في الانظمة الحية لانه يشارك في العديد من التفاعلات الحيوية ففي النبات يشارك في عمليات تثبيت الكربون من خلال عملية التخليق الضوئي لوجوده في تركيب الكلوروفيل . ويشترك الايون في كل التفاعلات تقريبا التي تؤدي الى إطلاق الطاقة من ATP ، كما ان عمليات نقله بين اجزاء الخلية الداخلية تعتمد على تنظيم فعاليات الانزيمات التي يشترك فيها ، ويرتبط الى البروتينات بشكل ضعيف لذلك تستغل الخلايا هذه الحالة في تنظيم التفاعلات الانزيمية التي يشترك فيها .

ومن مشاركاته الاخرى اشتراكه مع ايونات الكالسيوم في تثبيت الجدران الخلوية والاغشية الخلوية ، وكذلك الارتباط الى بعض مكونات الجدار الخلوي في البكتريا لغرض تثبيتها ، ويساهم في تثبيت الرايبوزومات وبروتيناتها .

يتداخل المغنيسيوم مع الحوامض النووية ويؤدي الى تثبيتها ، كما انه يشارك في عدد من الإنزيمات العاملة في مجال الحوامض النووية . ويساعد في فعاليات عددا من Ribozymes (وهي انزيمات مكونة من RNA) التي تكون معتمدة على ايون المغنيسيوم في فعاليتها كما في الانزيمات العاملة في معالجة الانترونات وإزالتها من نسخ RNA الناتجة من عملية الانتساخ في الخمائر .

يشابه المغنيسيوم ايون المنغنيز في بعض الصفات الكيماوية ولذلك يمكن لايون المنغنيز ان يحل محل المغنيسيوم في حالات خاصة وتحت ظروف خاصة . فالمنغنيز يمكن ان يرتبط الى معقدات ATPases لتحليل ATP في حالات معينة ، كما انه يمكن ان يحل المنغنيز في بعض الانزيمات ولكن في بعض الاحيان تفقد الفعالية نتيجة الإحلال . وعملية التفضيل بين ايون المنغنيز والمغنسيوم تعتمد على الكائن ، فمثلا إنزيم النسخ العكسي في بعض فيروسات RNA تفضل ايون المغنيسيوم كما

في فيروس HIV وغيره في حين ان فيروسات اخرى من مجموعة الفيروسات القهقرية نفسها تفضل ايون المنغنيز .

الحديد (Fe) Iron

يعد اهم المعادن الثقيلة من الناحية الفسلجية في الأنظمة الحية ، وهو الوحيد الذي يعد من المعادن الثقيلة الذي تحتاجه الخلايا بكميات كبيرة Macro - bio elements . وتكون كمياته كبيرة في مختلف البيئات بالرغم من كتلته الذرية العالية . الغلاف الخارجي له (3d) يحوي على 6 الكترونات لذلك يكون معقدات فريدة من نوعها . ايون الحديد Fe^{3+} متوفر في البيئة أكثر من ايون الحديدوز Fe^{2+} ولكن يكون مرتبطا بمركبات ومعقدات لذلك طورت الخلايا آليات لسحب مثل إنتاج الخلابات Siderophores . ايون الحديد غير سام للبكتريا الهوائية نظرا لقلته جاهزيته للخلايا لأنه يكون أملاح غير ذائبة .

وتساعد Siderophores في نقل كل من ايون الحديدوز والحديد الى الخلايا ، وبما ان الحديدوز يشابه ايون المغنسيوم Mg^{++} من حيث القطر والشحنة لذلك يمكن ان يراكم في الخلايا باستعمال انظمة النقل السريعة غير المتخصصة مثل CorA الخاص بالمغنيسيوم . ونظرا لأهمية العنصر طورت العديد من الأحياء أنظمة لنقله بشكل فعال إضافة الى ما ذكر ، فمثلا في *E. coli* (النموذج الدراسي) تنقل العنصر بناقلات ABC التي تكون ذات ألفة عالية لايون الحديدوز ويشفر للأنظمة بالجينات *feoABC* . ويعد وجود ايون الحديدوز وانظمة نقله مهمة بالنسبة للخلايا التي تعيش تحت ظروف لاهوائية لأنها ربما تستعمل ايون الحديد مستلما للالكترونات لذلك يكون ايون الحديدوز هو الايون الرئيس في الخلايا تحت الظروف اللاهوائية .

وفي خميرة الخبز التي تعيش تحت ظروف هوائية ولاهوائية فإنها تستعمل انظمة معقدة لنقله . ويختزل ايون الحديد فيها بواسطة الإنزيمات Ferric reductases (Fer 2p , Fer 1p) التي تكون فعاليتها مرتبطة بالأغشية الخلوية وتكون ضرورية لقطب الحديد فيها . والجينات المسؤولة عن الإنزيمات المذكورة تكون جينات مستحثة بواسطة قلة الحديد . وبعد الاختزال ينقل الحديدوز بواسطة الانزيم (Fer 3p) Copper –dependent ferrous oxidase و (Ftr 1p) Permease والبروتينات المشابه . وإضافة الى ذلك تحوي خميرة الخبز على نظام اخر لنقل الحديدوز هو Fet 4p وهو ذو ألفة واطنة للحديدوز .

وداخل خلايا الخمائر فان ايون الحديدوز ينقل الى المايكوبكتريا بواسطة انظمة نقل خاصة بها وهي من عائلة CDF المارة الذكر . ويكون نقل الحديد متعلقا بنقل الزنك ، وهناك تشابه في نقل الحديد في خمائر اخرى والنبات والإنسان . والتشابه يكون عند استعمال انظمة النقل ذات الألفة

الواطئة للحديدوز وإقرانها بنظام ذات الألفة العالية الذي يشمل نظام النقل الذي يؤكسد الحديدوز الى الحديدك باشتراك النحاس .

الكوبالت (Co) Cobalt

يحتوي العنصر على 7 الكترونات في الغلاف الخارجي (3d) ويكون ثنائي التكافؤ موجب بشكل رئيس ، اما الايون الثلاثي التكافؤ فيكون غير ثابتا . معتدل السمية للبكتريا *E. coli* . ويعمل الايون في الانظمة الحيوية من خلال العامل Cofactor B₁₂ الذي يوجد في بعض الإنزيمات ويساعد في إعادة تنظيم ذرات C - C و C - H . ويدخل في تركيب الانزيم Nitrite hydratase . يتراكم الكوبالت في اغلب البكتريا بسرعة بواسطة انظمة النقل CorA ولا توجد انظمة مستحثة يمكن ان تحفز عند قلة الكوبالت. وينقل في بعض البكتريا بواسطة انظمة النقل HoxN كما في البكتريا *Rhodococcus eutropha* و *R. rhodochrous* الحاوية على انزيمات Nitrite hydratases .

وينقل الكوبالت باستعمال أنظمة النقل CDF مثل تلك الموجودة في أغشية الماييتوكوندريا . كما انه ينقل في البكتريا *Staph. aureus* بواسطة بروتينات خاصة . وفي معظم الاحيان فان نقل الكوبالت يكون ضمن فيتامين B₁₂ الحاوي عليه بواسطة أنظمة CorA وفي حالات استثنائية ينقل بناقلات HoxN كما ان قبضه بأنظمة أخرى يكون استثنائي ايضا . مقاومة الكوبالت في البكتريا السالبة لصبغة كرام تعتمد على آلية الطرد الى الخارج عبر الأغلفة الخارجية باستعمال أنظمة RND . والمقاومة للكوبالت تكون في اغلب الاحيان ثانوية لمقاومة غيره من المعادن مثل النيكل والزنك .

تستطيع الخلايا التخلص من سمية الكوبالت بضخه الى الخارج بواسطة ناقل CDF في البكتريا الموجبة لصبغة كرام والخلايا حقيقية النواة . ويمكن تبادل الكوبالت بين الاحياء على اساس انه احد مكونات فيتامين B₁₂ .

النيكل (Ni) Nickel

يحتوي عنصر النيكل على 8 الكترونات في الغلاف الخارجي (3d) ويوجد بشكل عام ثنائي التكافؤ والايون ثلاثي التكافؤ يكون غير ثابتا . سميته قليلة ومشابه لسمية الكوبالت .

يدخل الأنظمة الحيوية من خلال دخوله في تركيب بعض الإنزيمات منها Hydrogenases فالإنزيم NiFe-hydrogenase يقوم بفلق الهيدروجين الجزيئي (H₂) الى بروتونات والكترونات ، والانزيم الآخر Urease الذي يفلق اليوريا الى ثنائي اوكسيد الكربون وامونيا . وكذلك يوجد في الانزيم CO - dehydrogenase ويوجد العنصر ايضا في العامل F₄₂₀ في البكتريا المولدة للميثان

الذي يؤدي الى تكوين الميثان CH_4 من مجموعة المثيل CH_3 . ويوجد ايضا في بعض إنزيمات البكتريا اللاهوائية .

إنزيمات Hydrogenases اهم الجزيئات الحيوية التي يدخل النيكل في تركيبها والتي تمثل الهيدروجين الجزيئي في الخلية او تطلق الهيدروجين كمغسطس للأكسدة والاختزال Redox sink في الاحياء المجهرية . وتختلف هذه المجموعة من الانزيمات فالبعض يحوي على الحديد اضافة الى النيكل ، وتختلف مواقع ارتباط النيكل فيها فهو قد يرتبط الى السستيين او الهستيديين ، كما ان عدد ذرات النيكل المرتبطة بالإنزيم تكون مختلفة في الإنزيمات المختلفة ،

يدخل النيكل الى الخلايا بشكل رئيس بواسطة نظام CorA في البكتريا وخميرة الخبز ، وتوجد انظمة اخرى تدخله الى خلايا *A. eutrophus* . وتزال سميته من الخلايا بعملية الربط وتكوين المعقدات او الاقتران او الحجز التي يمكن ان تحصل للمعادن الأخرى ، ففي البكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staph. aureus* يربط الى مكوثرات الفوسفات ، اما في النباتات التي تراكمه داخلها فيرتبط العنصر الى الهستيديين الموجود في الساييتوبلازم . وفي خميرة الخبز يدخل الى الفجوات اذ يمكن ان يرتبط هناك بالهستيديين . وهناك فطريات وخمائر اخرى تتحمل تراكيز عالية نتيجة لحصول طفرات في الانظمة الناقلة له مثل CorA . اما الاحياء المقاومة مثل البكتريا فتعتمد على طرد العنصر الى الخارج باستعمال نظام RND . ويوجد نظامان للمقاومة (Cnr Cobalt-nickel resistance) و (Ncc Nickel – cobalt – cadmium resistance) وهذه تشابه انظمة Czc للمقاومة ولكنها تختلف في عمليات تنظيمها .

النحاس (Cu) Copper

يحوي الغلاف الخارجي للذرة (3d) على 8 إلكترونات ، احدهما يستعار من الغلاف الثانوي 4s . ويوجد العنصر بتكافؤين أحادي (ايون النحاسوز Cu^+) وثنائي التكافؤ (ايون النحاسيك Cu^{++}) ونظرا لاستعارة الإلكترون المذكور فان النحاس له صفات الجذور ويمكن ان يتفاعل معها بسهولة .

يدخل الأنظمة الحيوية بعدة طرق فهو يوجد في الإنزيم Cu-Zn SOD وكذلك في إنزيمات أكسدة الساييتوكرومات Cytochrome oxidases في السلاسل التنفسية وبعض الانزيمات الاخرى ذات العلاقة ، لذلك يكون العنصر مهما للاحياء الهوائية ، ونظرا لصفاته وتصرفاته كجذر فانه يكون سام جدا ، وتوجد احياء كثيرة حساسة له . وسميته تكمن في إنتاجه للجذور Hydroperoxide radicals وكذلك تداخله مع الأغشية الخلوية ، وعليه فان تراكيزه داخل الخلايا يجب ان يكون مسيطر عليها بشكل صارم .

الاحياء المقاومة له تستعمل آليات مختلفة مثل *E. coli* تستعمل آلية الدفع الى الخارج وهي صفة بلازميدية وتعمل الآلية في مزارع الطور اللوغاريتمي . اما في طور الاستقرار فتميل الخلايا الى تكوين المعقدات التي توجد في الفسحة المحيطة . وتتم عمليات التنظيم لهذه المقاومة بشكل مشترك بين مواقع بلازميدية وكروموسومية . ومقاومة النحاس قد تضيف بعض الصفات المظهرية ، فخلايا *E. coli* المقاومة تبقى عديمة اللون اما *Pseudomonas* فعند نموها على وسط يحوي النحاس تصبح زرقاء وذلك لتجمع النحاس كمركبات معقدة في الفسحة المحيطة والأغشية الخارجية للخلايا ، اذ يقوم البروتين *CopA* بالارتباط الى النحاس ، وعند الحاجة تقوم البروتينات *CopD* , *CopC* بنقله الى الداخل .

وتتم عمليات تنظيم نقل النحاس والتخلص منه في *Pseudomonas* كما هو الحال مع *E. coli* بواسطة نظام من مكونين وهي كايينز الهستيدين الذي يعمل بدوره على انتساخ جينات *Cop* . اما في البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *Ent. hirae* فيكون التنظيم بواسطة اوبرون خاص به *Cop* operon يحوي على جينين تركيبية التي تشفر لـ *p-type ATPase* . *CopA* المسئول عن قبط النحاس من الوسط المحيط و *CopB* يكون مسئولاً عن دفعه الى الخارج وإزالة سميته عند تراكمه بتركيز غير ملائمة . ويحوي الاوبرون على بروتين منظم وهو *CopY* ويعمل بمثابة كابح ، وجين اخر *CopZ* يعمل كمنشط .

وأنظمة *p-type ATPase* الخاصة بنقل النحاس توجد في عدد من الأحياء مثل البكتريا المزرقة وأحياء حقيقية النواة . اما في خميرة الخبز فإنها تعالج النحاس باختزال ايون النحاسيك الى ايون النحاسوز قبل نقله الى داخل الخلايا بواسطة إنزيمات خاصة *Fe/Cu - specific reductases* وهي *FRE 1p* , *FRE 2p* . وايون النحاسوز الناتج ينقل الى داخل الخلية بواسطة الناقل *CTR 1p* احد افراد مجموعة من البروتينات العاملة في هذه الحالة مثل *CTR 3p* , *CTR 2p* ، كما ان النحاس يمكن ان يراكم داخل الخلية بواسطة نواقل من عائلة *CorA* وهي *ALR 2p* , *ALR 1p* . وداخل خلية الخميرة فانه يرتبط بأنواع مختلفة من المركبات منها *bis-glutathionota - complex* . كما ان الخميرة يمكن ان تحوي على *Metallothionein* مثل *Cup 1p* و *CRS 5p* لخزن النحاس . وينقل النحاس الى الماييتوكوندريا لتخليق *Cytochrome oxidase* بواسطة الناقل *Cox 1p* .

اما في البكتريا المرضية مثل *Helicobacter pylori* و *Listeria monocytogenes* فان *p-type ATPase* يقوم بتنظيم انسياب النحاس الى الخلايا ، وتحوي الخلايا على جين مسئول عن قبط النحاس وآخر لضخه الى الخارج .

الزنك (Zn) Zinc

له أهمية في الأنظمة الحيوية ، يحوي الغلاف الخارجي لذرة العنصر على 10 إلكترونات في الغلاف (3d) . يوجد في الطبيعة بشكل ثنائي التكافؤ ، ونظرا لتشبع غلافه الخارجي بالالكترونات فهو لا يستطيع القيام بعمليات الأكسدة والاختزال ، وإنما يقوم بعمل معقدات مع سلاسل بيبتيدي متعددة عندما تكون عمليات الأكسدة والاختزال غير مرغوبة . ونظرا لطبيعته الكيماوية فهو يستطيع تنشيط جزيئة الماء .

يدخل الأنظمة الحيوية من خلال اشتراكه في تركيبة عدد من الانزيمات وكذلك البروتين الذي يرتبط بالـ DNA وهو Zinc – finger protein الذي يوجد في البكتريا وعدد من الاحياء . سمية الزنك معتدلة بالنسبة للـ *E. coli* وتشابه حالة النيكل والكوبالت . ينقل الزنك الى الخلايا بواسطة بروتينات من عوائل مختلفة :

- يمكن ان يدخل بانظمة نقل المغنيسيوم السريعة غير المتخصصة كما في *A. eutrophus* CH34 دون ان يؤثر على قبط Mg^{++} اما في خميرة الخبز فهو يدخل عن طريق CorA .

- ينقل الزنك بواسطة الأنظمة العائدة الى العائلة MgtE التي تعتمد على الطاقة الناتجة من الضخ الكيماوي ويوجد النظام في عدد من البكتريا السالبة لصبغة كرام ، ولكنه اقل انتشارا من CorA .

- ينقل بواسطة MgtB من عائلة ATPase p-type في بكتريا *Sal. typhimurium* والذي ينقل الزنك بكفاءة اعلى من المغنيسيوم .

- تحوي بعض البكتريا على بروتينات رابطة توجد في الفسحة المحيطة تقوم بنقل الزنك
- بعض البكتريا وأحياء اخرى تنقل الزنك بناقلات ABC وفي *E. coli* تستجيب ناقلات هذا النظام لنقص الزنك وذلك باستعمال البروتين Zur الذي يشابه Fur الذي ينظم نقل الحديد في العديد من البكتريا .

وفي خميرة الخبز فان البروتينات الناقلة للزنك هي من مجموعة CorA ، ويوجد نظامان ZRT 1p يكون ذو ألفة عالية للزنك و ZRT 2p ذو ألفة واطئة والاثنان يعودان الى عائلة ZIP . وناقلات الزنك هذه يوجد منها عدد كبير في النباتات ، والابتدائيات والفطريات والفقرات واللافقرات .

وللتخلص من سمية الزنك تستعمل البكتريا مكونات الأنظمة RND و p-type ATPases فمثلا في *E. coli* فان ZntA الذي يعود الى p-type ATPases يكون مسئولا عن طرد الزنك

الى الخارج . اما في البكتريا المزرقة مثل *Synechocystis* فتستعمل ZiaA . كما ان الأنظمة الخاصة بمقاومة الكاديوميوم يمكن ان تقوم بطرد الزنك في معظم الحالات .

وكما أشير سابقا الى ان p-type ATPase تطرد الايونات ومنها الزنك الى خارج الأغشية الخلوية في حين ان RND فتقوم بطرد الزنك خارج الأغشية الخلوية والجدران الخلوية والأغشية الخارجية للبكتريا السالبة لصبغة كرام أي أنها تساعد في التخلص التام منه .

اما مصادر الطاقة اللازمة لدفع الزنك الى الخارج فهي ليست دائما ATP فقد تكون الضخ الكيماوي (pmf) كما في Czc ، وعملية تنظيم الأجهزة الأخيرة (Czc) تكون معقدة وتحتاج الى حوالي 6 بروتينات إضافية لكل منها جينه الخاص وتلعب عوامل سيكما δ^{70} دورا مهما في عملية التنظيم .

وتحتوي الناقلات CDF على ناقلات خاصة بالزنك وجدت في بعض البكتريا مثل *Staph aureus* التي تقاوم الزنك والكاديوميوم باستعمال آلية الدفع الخارجي . وتحتوي الخميرة على اثنين من هذه العائلة وتشارك في مقاومة الزنك والكاديوميوم بطريقة الدفع الى الخارج ، ويمكن ان تشارك في نقل الزنك خارج المايتوكوندريا . وفي اللبائن توجد عدة بروتينات من CDF متخصصة لنقل الزنك في مواقع مختلفة من الخلية .

السلينيوم (Se)

من العناصر النادرة الموجودة طبيعيا ويعد أساسيا للحياة ، يوجد في التربة والمواد الحيوية ، وتصل نسبته الى 0.5 جزء بالمليون في الترب الفقيرة ولكنه يصل في الأراضي الغنية الى 8000 جزء بالمليون والتي يمكن ان تصل الى مستويات سامة عند استعماله في تكرير النفط والنشاطات البشرية الأخرى .

نقص العنصر وزيادته تكون مؤثرة في الإنسان والذي يحصل عليه من تناوله في الأغذية . فزيادته تؤدي الى أمراض في الإنسان والحيوان ، وتجمعه يعد مشكلة تحتاج الى معالجات حيوية تشمل استعمال النباتات والأحياء المجهرية لإزالته وتطاييره . كما ان إزالة الفائض منه في المياه يؤدي الى تحسين نوعية المياه . وتستعمل النباتات للتخلص منه ولكن مشاركة الأحياء المجهرية تزيد من كفاءة المعالجة وتتم بعدة اليات .

تستطيع الاحياء المجهرية معالجة التراكيز السامة من السلينيوم بمثيلته أي إضافة مجموعة مثيل وتحويله الى مركبات اقل سمية ، اذ ان المركب المتطاير (CH₃)₂ Se (Dimethylselenide) اقل سمية ، وتقوم بهذه الفعالية العديد من البكتريا والفطريات .

اهمية وسمية المعادن الثقيلة

مما تقدم يتبين ان ليس كل المعادن الثقيلة مضره للأحياء ، اضافة الى انه ليست كل المعادن الثقيلة متوفرة في الأنظمة البيئية . ولغرض ان تكون متوفرة في الانظمة الحيوية دون إحداث أضرار يجب ان تكون متوفرة في البيئة بمستوى نانو مول ، فعند وجود تركيز نانو مول واحد في بيئة مزارع خلايا بكتيرية تعدادها 10^9 خلية / ملتر فهذا يعني ان الخلية الواحدة يمكن ان تستلم حوالي 600 ايون ، ولكن المعادن الثقيلة توجد بتركيز قليلة ، كما ان العديد منها لا يستعمل في العمليات الحيوية الأساسية وانما تستعمل لأغراض خاصة ، وتبعاً لذلك وخاصة عند وجود تراكيز واطنة فانه لا يشجع الخلايا عامة على تطوير أنظمة وجينات لإزالة سميتها والتخلص منها . والمعادن عادة توجد في القشرة الأرضية وكلما زاد العدد الذري لها وثقلت ذراتها قلت احتمالية انتشارها في القشرة الأرضية وبالتالي قلت احتمالية تطور الاحياء لاستخدامها الا بعض الاستثناءات ومنها :

- وجود الحديد بكثرة بغض النظر عن كتلته الذرية العالية .
- العناصر مثل الليثيوم Li والبريليوم Be والبورون B بالرغم من قلة كتلتها الذرية فهي قليلة الانتشار

• هناك بعض خامات المعادن الثقيلة ذات الانوية الثابتة تتكون بكميات كبيرة من معادن ثقيلة أخرى وبما ان الحياة تعتمد على الماء لذا فان المعادن الثقيلة حتى تدخل الانظمة الحيوية يجب ان تكون ذائبة في الماء ولكن أكثر الايونات ثلاثية ورباعية التكافؤ تكون قليلة الذوبان في الماء . ويقاس مستوى المعدن فيما اذا كان عاليا او واطنا بالرجوع الى مياه المحيط الذي يمثل مستقر المواد على الأرض وأهمية المعادن الثقيلة من ناحية السمية تعتمد على :

- الذوبان في الماء تحت الظروف الفسلجية .
 - الألفة للكبريت والتداخل مع الجزيئات الحيوية .
- ولذلك تقسم المعادن اعتمادا على صفة السمية الى عدة مجاميع :
- ◆ معادن لا تعد سامة ولا تؤثر على الانظمة الحيوية لأنها تكون ايونات ثلاثية ورباعية وتكون غير ذائبة في الماء مثل القصدير Sn ، الزركونيوم Zr ، الثوريوم Th .
 - ◆ معادن مهمة من الناحية الحيوية وتكون سميتها قليلة مثل الحديد والموليبدنم والمنغنيز والمغنيسيوم .
 - ◆ معادن لها أهمية حيوية متوسطة وتكون سامة بتركيز عالية مثل الكروم والتنتستن والنحاس والنيكل والزنك .

♦ عناصر ليس لها وظائف حيوية وإنما تعد سامة للخلايا ومنها الزرنيخ ، الفضة ، الانتيومون ، الكاديوم ، الزئبق ، الرصاص ، واليورانيوم .

وتؤثر المعادن الثقيلة على الأحياء العادية وتجعلها تحت ظروف الإجهاد ، وأول التأثيرات هو تدمير الأغشية الخلوية عندما تزداد تراكيزها عن MIC للكائن ، وأول التغييرات التي تحصل هو دفع ايونات البوتاسيوم الى خارج الخلايا ، وعادة يكون تأثير المعادن متداخلا مع العوامل الأخرى مثل الأرقام الهيدروجينية والحرارة المرتفعة وتكون الخلايا المتطبعة أكثر تحملا لتداخل هذه الظروف مثل *Ps. putida* . والظروف الأخرى التي تشد عن الحدود المثلى تؤدي الى زيادة النظير Trans في الحوامض الدهنية في دهون الأغشية على حساب النظير Cis في الحوامض الدهنية الحاوية على اصرة واحدة غير مشبعة في كما تم تبيانها سابقا . وتحث المعادن الثقيلة هذه الزيادة بشكل مشابه لتأثير الكحول والتولوين والمذيبات الأخرى في *Ps. putida* ، لذلك يلاحظ ان الخلايا المتطبعة لمثل هذه العوامل لا تتأثر كثيرا عند زيادة تراكيز المعادن الثقيلة ويمكن ملاحظة تأثير التلوث على الحوامض الدهنية في الدهون الفوسفاتية عند تلوث التربة في الجدول (19) .

جدول 19 : تأثير التلوث على الحوامض الدهنية في *Ps. putida*

الحمض الدهني	النماذج العادية	النماذج الملوثة	نسبة الملوثة / العادية
i14:0	0.28	0.63	2.25
14:0	1.19	1.4	1.17
i15:0	6.53	3.4	0.52
:05al	2.07	2.53	1.23
:05brl	0.88	1.14	1.3
15:0	1.55	1.15	0.74
i16:0	2.4	1.97	0.82
16:1ω9	0.79	0.9	1.13
16:1ω7c	7.48	7.6	1.02
16:1ω7t	1.19	0.75	0.63
16:1ω5	1.72	3.46	2.01

1.09	18.32	16.78	16:0
0.6	2.93	4.86	lOMel6:0
1.33	0.89	0.67	i17:0
1.57	1.52	0.97	a17:0
1.28	1.24	0.97	17:1ω8
1.76	3.01	1.71	cyl7:0
1.2	0.95	0.79	17:0
1.18	0.7	0.6	lOMel7:0
0.85	15.87	18.67	18:2ω6
0.67	7.33	10.88	18:1ω9
1.8	12.01	6.69	18:1ω7
1.2	0.75	0.63	18:1
1.3	2.63	2.03	18:0
1.82	0.83	0.43	19:1a
2.31	1.36	0.59	lOMel8:0
0.9	1.47	1.65	19:1b
0.53	2.15	4.05	cyl9:0
1.16	1.14	0.98	20:0

ويلاحظ زيادة الحامض الدهني 10Me18 : 0 في التربة وهذا يعني زيادة الاكتينومايسيتات في التربة الملوثة اذ ان هذا الحامض الدهني يخص هذه المجموعة .

اما الحامض الدهني 18 : 1ω7 و Cyc17 : 0 تكون خاصة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام والتي تزداد عند التلوث . والحوامض الدهنية 0 : i15 , 0 : 18 : 1ω9 , 0 : 10Me16 تكون خاصة بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام والتي تقل في التربة الملوثة . ومما يزيد من أهمية الحوامض الدهنية عند الأخذ بنظر الاعتبار التوزيع الفراغي لها فزيادة النظير Trans الى Cis في الحوامض الدهنية

مثل تغيير الحوامض $16 : 107$, $18 : 107$ للعديد من البكتيريا يشير الى ان هناك اجهادات بيئية مثل وجود المعادن الثقيلة او حدوث مجاعة .

علاقة التقنية الحيوية بالمعادن الثقيلة

قد تتخذ العلاقة اكثر من وجه وجانب ، اما للتخلص من المعادن التي تصل تراكيزها مستويات سامة ، او تستعمل في الحصول على المعادن . فالتطبيقات المستقبلية والتطور يحتاج الى :

- ♦ إيجاد مصادر جديدة للمعادن بمساعدة تقنيات جديدة .

- ♦ تطوير عمليات التعدين الموجودة حاليا وهذا سيساعد في استخلاص المعادن من الخامات التي تعد غير ملائمة اقتصاديا .

وتعدين الخامات بطرق تعتمد على استعمال الاحياء المجهرية توفر الإمكانات للحصول على المعادن غير الملائمة لعمليات التعدين بالطرق التقليدية ، إضافة الى إمكانية استخلاص المعادن من الفضلات الصناعية والتي تعد مواد خام ثانوية . وبذا يتضح ان استعمال التقنيات الحيوية التي تتم بالاحياء المجهرية تكون مفيدة في أكثر من ناحية فهي لاستخلاص المعادن ومعالجة الفضلات . وفي هذا المجال هناك اكثر من عملية ومصطلح سيتم التعامل بها .

التعدين الحيوي Biomining او Biorecovery او Bioextraction قد تكون هذه المصطلحات قريبة من بعضها والمعنى المقصود منها وهو تحريك وإذابة العناصر من الخامات او المواد الصلبة بواسطة الاحياء مثل البكتيريا او الفطريات على نطاق واسع لغرض استخلاص المعادن بشكل اقتصادي . ويتم باستعمال الأكسدة الحيوية او الغسل الحيوي .

اما حقل التعدين الحيوي المائي Biohydrometallurgy فهو يشمل التعدين الحيوي والغسل الحيوي Bioleaching ويكون معتمدا على عدد من العلوم التي تربط بين علوم الاحياء وعلوم الجيولوجي ، إضافة الى العمليات الهندسية التي تدار بها المعاملات ، وقد استعمل المصطلح عام 1987 ، وأساسه Hydrometallurgy الذي يعنى معاملة المواد الحاوية على المعادن معاملة رطبة او استخلاص المعادن من الخامات باستعمال الطور المائي بشكل أساسي . وعمليات التعدين بدأت منذ القدم ولكن مشاركة الاحياء فيها لم تعرف الا في النصف الثاني من القرن المنصرم .

وقد استعمل التعدين الحيوي المائي في العمليات الخاصة بتعدين المعادن وكذلك في استخلاص النفط وإزالة الكبريت ومعالجة التآكل الحيوي Biocorrosion ، وتشمل العمليات بشكل اساسي :

- ♦ الامتزاز الحيوي Biosorption والذي يعتمد على الامتزاز الانتقائي لايونات المعادن من قبل الاحياء المجهرية .

- ♦ تفاعلات الأكسدة والاختزال مثل استعمال الخلايا لبعض ايونات المعادن مثل أكسدة الكبريتيدات الى كبريتات وغيرها والحصول على الطاقة من هذه التفاعلات .

ونظرا لان الكبريتيدات (وهي الصورة التي توجد عليها اغلب المعادن) تكون غير ذائبة في الماء في حين ان الكبريتات تذوب في الماء ، لذلك تعد طريقة التعدين الحيوي المائي ملائمة لتحرير المعادن من خامات الكبريتيدات ، ويمكن ان تنتج حامض الكبريتيك الذي يساعد في إذابة مواد أخرى او أكسدة معادن أخرى وجعلها جاهزة لخطوات لاحقة .

الغسل الحيوي Bioleaching يعني إذابة المعادن من أملاحها بواسطة الاحياء المجهرية الطبيعية وتحويل العناصر الى هيئة يمكن استخلاصها من المواد الناتجة بواسطة الماء ، مثل تحويل كبريتيد النحاس واكسدته الى الكبريتات الذائبة في الطور المائي ويتم التخلص من باقي المواد الموجودة في الخامات .

اما الأكسدة الحيوية Biooxidation فتعني الأكسدة التي تقوم بها الاحياء المجهرية للأملاح الحاوية على العنصر دون وجود طور مائي لذا يبقى العنصر المعني صلبا وبتراكيز عالية كما في تعدين الذهب .

الآليات المستعملة من قبل الاحياء المجهرية

تأثير الاحياء المجهرية على الخامات يمكن ان يكون ضمن التحليل الحامضي Acidolysis او تحليل المعقدات Complexolysis او إجراء تفاعلات الأكسدة والاختزال Redoxylisis والتي تؤدي الى تفكيك الخامات ، وعليه فان الأحياء يمكن ان تحرك المعادن بواسطة :

◆ تكوين حوامض عضوية ولاعضوية .

◆ تفاعلات أكسدة واختزال .

◆ إفراز مواد لتكوين معقدات مع العناصر .

ومن المعروف ان أكثر المعادن توجد في الطبيعة على شكل مركبات للكبريت لذلك فان اكثر الاحياء التي تتعامل مع الخامات تمتلك خاصية التعامل مع الكبريت ومركباته . واهم الحوامض المتكونة في مناطق التعدين هو حامض الكبريتيك الذي يتكون بواسطة الأحياء المؤكسدة للكبريت مثل عصيات الكبريت Thiobacilli . وهناك عددا اخر من الحوامض العضوية التي تشارك في التحلل الحامضي والتي تنتج من قبل البكتريا والفطريات وتكون المعقدات مثل الاوكزالات ، المالونات ، السترات وغيرها التي ترتبط بالمعادن .

اساليب استخلاص المعادن والتعدين الحيوي

يمكن للأحياء المجهرية استخلاص المعادن من خاماتها بطريقتين :

◆ الطريقة المباشرة وفيها تقوم الأحياء بأكسدة كبريتيدات المعادن للحصول على

الالكترونات ولذا تحتاج الخلايا ان تكون بتماس مباشر مع سطوح المواد . وعند اضافة الاحياء الى

الخامات فإنها تلتصق إليها في دقائق وقد تمتد المدة الى ساعات حتى يحصل الالتصاق وتكون عملية الالتصاق انتقائية ، وتبدأ عملية الالتصاق بالانجذاب الكيماوي والتي لوحظت عند استعمال خامات النحاس والحديد والنيكل عند استعمال البكتريا *Acidithiobacillus thiooxidans* (قديما *Thiobacillus*)، *Leptospirillum ferrooxidans* وشخصت الجينات الخاصة بالانجذاب الكيماوي في الأحياء المستعملة للتعدين .

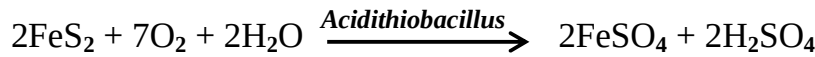
وتكون الخلايا مكوثرات خارجية للالتصاق . فوجود السكريات المكوثرة الخارجية يلعب دورا مهما في التصاق الخلايا الى الخامات مثل خام الحديد Pyrite وخامات النحاس Covellite ، وإزالة هذه الطبقات من الخلايا يؤدي الى تقليل كفاءة الاستخلاص ، فالتلامس المباشر بين الخلايا والسطوح يكون ضروريا لتحريك المعادن ويحصل التداخل بين الخلايا وسطوح المعادن على مستويين :

◊ امتزاز فيزيائي Physical sorption وينتج من قوى كهربائية مستقرة وذلك لان الرقم الهيدروجيني المنخفض الذي يسود بيئات الاستخلاص يؤدي الى جعل الغلاف الخارجي للميكروبات مشحون بشحنات موجبة تؤدي الى حصول تداخلات كهربائية مستقرة مع الأملاح .

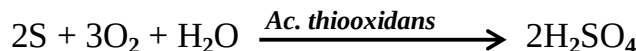
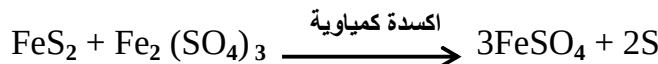
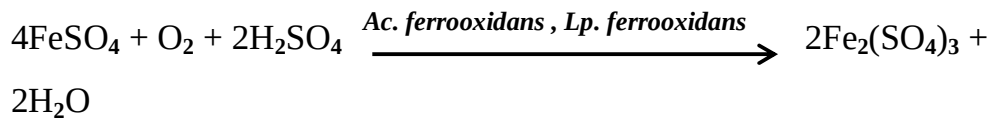
◊ امتزاز كيماوي Chemical sorption وفيه تتكون الأواصر الكيماوية بين الخلايا والأملاح مثل الجسور الكبريتيدية الثنائية .

اضافة الى تكوين مواد الايض من قبل الخلايا أثناء عملية الالتصاق ومنها مواد ايفية قليلة الوزن الجزيئي مثل المواد المنتجة من قبل مؤكسدات الكبريت مثل الحوامض العضوية ومنها حوامض دورة الحوامض ثلاثية الكربوكسيل (TCA cycle) والحوامض العضوية الأخرى و Ethanolamine اضافة الى إنتاج مواد عالية الوزن الجزيئي مثل الدهون والدهون الفوسفاتية ، وبذلك تكون الخلايا طبقة من Bacterial glycocalyx على المواد الصلبة .

وفي الطريقة المباشرة يمكن ان تحصل التفاعلات العامة



♦ الطريقة غير المباشرة ويكون ذلك عن طريق ايون الحديدك الذي ينتج من أكسدة الميكروبات لايونات الحديدوز الموجودة في الأملاح ولا تحتاج الخلايا ان تكون ملائمة للخامات . كما في المعادلة الاتية :



وكل من الطريقتين يمكن ان تعمل في حالات خاصة ، فالطريق المباشر يعمل عند استعمال الاحياء مع الخامات الذي يحتاج التلامس ، والطريق غير المباشر يحصل في المفاعلات الحيوية المكونة من غرف معزولة بأغشية ناضحة Dialysis membrane لتجنب التلامس .

الصفات العامة للبكتريا المستعملة في التعدين

تعد البكتريا والاراكيا أكثر الأحياء المستعملة لاستخلاص المعادن وتتصف مجموعة بكتريا المعادن بعدد من المواصفات التي تؤهلها لأداء المهمة وهي مجموعة كيمياوية – صخرية التغذية من البكتريا والاراكيا . المجموعة تكون منتجة لايون الحديدك وحامض الكبريتيك ، وهي التفاعلات اللازمة لعمليات استخلاص المعادن ومن المواصفات الاخرى :

التغذية

ان تكون ذاتية التغذية أي تثبت ثنائي اوكسيد الكربون الجوي لبناء كتلتها الحيوية ، ومن أهم الأجناس *Acidithiobacillus* و *Leptospirillum* والاحياء تثبت ثنائي اوكسيد الكربون عن طريق دورة كالفن (Calvin reductive pentose phosphate cycle) باستعمال انزيم RUBISCO وتحتاج الى طاقة كبيرة ومكافئات مختزلة $NAD(P)H$ بكميات كبيرة لغرض اختزال الكربون لإنتاج المواد الخلوية مثل النيوكليوتيدات والسكريات والحوامض الامينية وغيرها لبناء كتلتها الحيوية ، ولذلك فهي تحتاج الى تدرج كبير للبروتونات عبر الأغشية الخلوية لتوليد القوة الدافعة للبروتون pmf للحصول على الطاقة لتخليق $NAD(P)H$ وهذا ما يعرف بنقل الالكترونات العكسي (Uphill electron transfer pathway) .

وغاز ثنائي اوكسيد الكربون الموجود في الجو يكون كافيا بالنسبة للبكتريا *At. ferrooxidans* عندما تنمو على ايونات الحديدوز ، وتستطيع البكتريا تحسس قلة ثنائي اوكسيد الكربون لذا تزيد من تركيز إنزيم Rubisco وابرونه يحوي على نسختين من الجين المسئول عن تخليقه والنسختين مفصولة عن بعضها بقطعة من DNA تصل الى 5 كيلو قاعدة .

ويمكن لبكتريا *At. ferrooxidans* المجبرة على التغذية الذاتية ان تستعمل حامض الفورميك مصدرا للكربون في مزارع مستمرة على ان تزود بالحامض بتركيز قليلة .

اما الجنس *Leptospirillum* فتحتوي على الجينات الخاصة بالمعقد Format hydrogenlyase complex لذا تستطيع الخلايا النمو على الفورمات ، وحامض الفورميك يحوي على ذرة واحدة من الكربون لذلك عندما يتحلل يدخل في دورة كالفن مثل ثنائي اوكسيد الكربون للتثبيت .

اما الاحياء متباينة التغذية فهي لا تحتاج الى كميات كبيرة من $NAD(P)H$ وذلك لان الكربون الذي تستعمله يكون مختزلا . والاحياء الاخرى مثل البكتريا المحبة للحرارة

Sulfobacillus thermosulfidooxidans فتحتاج الى تراكيز عالية من ثنائي اوكسيد الكربون تصل الى 1 % نظرا لصعوبة ذوبان الغاز في الوسط عند درجة حرارة نموها البالغة 50° م ، إضافة الى ان البكتريا ليست كفوءة في قبط ثنائي اوكسيد الكربون . والأنواع الأخرى العائدة للجنس *Sulfobacillus* تكون غير متشابهة من ناحية التغذية فالبعض يمكن ان يعيش بطريقة تغذية متباينة ومجموعة الأركيا ذات العلاقة بالمعادن بعض افرادها متباينة التغذية ولكن توجد بعض الأنواع التابعة للجنس *Sulfolobus* تكون ذاتية التغذية .

وفي مجال التغذية يأتي النتروجين بالدرجة الثانية من الأهمية من حيث نسبته في الكتلة الحيوية التي تبنيها الخلايا ، وتركيز الامونيوم 0.2 ملي مول يكون كافيا لتخليق الكتلة الحيوية بالنسبة للبكتريا *At. ferrooxidans* . وعند زيادة تركيز النتروجين العضوي او اللاعضوي فانه يكون مثبطا لعملية أكسدة الحديد ، ونظرا لكون الامونيا كثيرة الذوبان في المحاليل الحامضية لذلك يمكن للخلايا ان تنمو باستعمال الامونيا الموجودة في الجو ولذا يكون من الصعوبة تحديد احتياجاتها من النتروجين ، وفي العمليات التجارية يضاف السماد الرخيص مثل كبريتات الامونيوم الى مفاعلات الأكسدة الحيوية او أكوام الغسل الحيوي Heap bioleaching لضمان توفر كمية كافية .

وتوجد سلالات مختلفة من *At. ferrooxidans* لها القابلية على تثبيت النتروجين وهي صفة عامة لسلالات هذا النوع وتحتوي على الجينات اللازمة لتثبيت النتروجين (*nif HDK*) وكذلك الحال بالنسبة لسلالات *Lp. ferrooxidans* وتوجد قابلية تثبيت النتروجين في أنواع أخرى من الجنس *Leptospirillum* وقد تم تحديد توالي القواعد النتروجينية في *nif operon* .

ومن المعروف ان فعالية نظام تثبيت النتروجين تثبط بالأوكسجين لذلك فان *At. ferrooxidans* لا تثبت النتروجين عندما تنمو على الحديد تحت ظروف هوائية ، ولكن يبدأ تثبيت النتروجين عندما ينخفض تركيز الأوكسجين وعليه فان عمليات تثبيت النتروجين تحصل عند استعمال طريقة الأكوام (كما سيأتي ذكرها) والتي تكون تهويتها غير متجانسة ويحصل التثبيت في المناطق التي ينخفض فيها تركيز الأوكسجين .

اما الحلزونيات *Leptospirillum* وهي هوائية مجبرة وتستخدم الحديد كمعط لالكترونات ، ونظام تثبيت النتروجين كما ذكر حساس للأوكسجين لذلك تتم حمايته بواسطة التنفس ، اذ يتم استهلاك الأوكسجين بسرعة بواسطة Cytochrome oxidase والساييتوكروم ccb3 مما يجعل تراكيز الأوكسجين واطئة وملائمة لتثبيت النتروجين ، ويمكن للبكتريا *At. ferrooxidans* استعمال الحماية التنفسية بواسطة الساييتوكروم Cyt. bd .

مصادر الطاقة

في فعاليات الأحياء المذكورة فإن كل من الحديد والكبريت تعمل كمعطيات للالكترونات (وبالتالي مصادرا للطاقة) أثناء عمليات التنفس .

• أكسدة الحديد

يؤكسد ايون الحديدوز الى حديدك أي يعمل معطيا للالكترونات لان جهد الأكسدة والاختزال للـ Fe^{2+} / Fe^{3+} له قيمة عالية 770 + ملي فولت عند رقم هيدروجيني 2 ، وعليه فان الأوكسجين فقط يمكن ان يعمل مستلما للالكترونات (جهد الأكسدة والاختزال للـ O_2 / H_2O يساوي 820 + ملي فولت) عند رقم هيدروجيني 7 . لذا فالحديد كمعط للالكترونات يمكن ان يستعمل تحت الظروف الهوائية فقط ، وبشكل طبيعي فان ايون الحديدوز يتأكسد الى ايون ألدديدك في الهواء ما لم يكن الرقم الهيدروجيني واطنا ، والبكتريا المحبة لحموضة متطرفة يمكن ان تستعمل ايونات الحديدوز كمعط للالكترونات بطريقة تكون غير ممكنة للبكتريا الأخرى التي تنمو عند رقم الهيدروجيني متعادل .

ونظرا لان فرق جهد الأكسدة والاختزال بين Fe^{2+} / Fe^{3+} و O_2 / H_2O بسيط وان هناك مول واحد من الالكترونات يتحرر من أكسدة مول واحد من الحديدوز ، لذلك فان أكسدة كميات كبيرة من الحديد تعطي كميات قليلة من الكتلة الحيوية . والحديد لا يدخل الى داخل الخلية وانما يبقى الى الخارج والإلكترون الناتج من الحديدوز ينقل الى ناقل بروتيني يوجد على الغلاف الخارجي للخلايا .

وفي النموذج الدراسي لهذه الأغراض وهي *At. ferrooxidans* يوجد اوبرون *rus* المسئول عن أكسدة الحديد والسلسلة التنفسية الخاصة به ومن مكوناته بروتين النحاس الأزرق Rusticyanin وهو C_4 type cytochrome وتصل نسبته الى 4 % من بروتينات الخلية عند نموها على الحديد ، والبروتين يعمل كمستودع للالكترونات ، اذ يقوم بأخذ الالكترونات آتية من خارج الغشاء الخارجي ويدخلها الى السلسلة التنفسية ، ولهذا يعمل دارئا للأكسدة والاختزال Redox buffer مما يجعل مستلمات الالكترونات على سطح الخلية بشكل مؤكسد دائما لتكون مهيئة لاستلام الالكترونات من الحديدوز خارج الخلايا حتى عند وجود نقص في الأوكسجين . ويساعد الجزء الرئيس من البروتين Aporusticyanin في الالتصاق الى خامات الحديد . ويساعده في ذلك جين *iro* الذي ينتج الانزيم (Hip Ip) High redox potential iron oxidase وان كان للأخير دور اكبر في أكسدة الكبريت . وعلى العموم فان أنظمة أكسدة الحديد يمكن ان تختلف عن النموذج المذكور في السلالات المختلفة سواء في البكتريا او الاركيا .

• أكسدة الكبريت

يعد حامض الكبريتيك المسئول عن خفض الأرقام الهيدروجينية في البيئات التي توجد فيها الأحياء المحبة للحموضة ، وينتج من أكسدة مركبات الكبريت اللاعضوية المختزلة Reduced

(RISCs) inorganic sulfur compounds ، وعند عمليات الأكسدة الحيوية فان هذه المركبات تعمل معطيات للالكترونات ويعمل الأوكسجين كأفضل مستلم للالكترونات ، وعند أكسدة ذرة الكبريت في خام الكبريتيد الى كبريتات تكون الطاقة الناتجة اكبر من أكسدة الحديد . والأملاح التي تحوي على الكبريتيدات توجد في المواد عند المناطق السطحية وكميات كبيرة منها تنتج نتيجة التفاعلات الكيماوية بين أملاح الكبريتيدات والماء وايون ألحديدك والأوكسجين .

وفي الأحياء العاملة في هذه البيئات يتم تحريك عنصر الكبريت الموجود خارج الخلية بواسطة مجاميع البروتينات الثايولية الخاصة الموجودة على سطوح الخلايا وخاصة الغشاء الخارجي وينقل الى داخل الخلية على شكل Persulfide sulfane sulfur والمركب يؤكسد أكثر الى الكبريتات بواسطة Sulfite : acceptor oxidoreductase وتنقل الالكترونات الى الساييتوكرومات ، ويساعد في ذلك الكلوتاثايون من خلال تنشيط الكبريتيد ولكنه لا يستهلك اثناء الأكسدة الإنزيمية ، لان أكسدة الكبريتيد تحتاج الى الجسور الكبريتيدية الثنائية للكلوتاثايون التي تتفاعل بشكل لا انزيمي مع الكبريتيد لتعطي Glutathione persulfide قبل الأكسدة الإنزيمية .

والكبريتيد الحر يؤكسد الى الكبريت في الفسحة المحيط بواسطة Sulfide : quinone oxidoreductase والتفاعل مع مجاميع الثايول لبروتينات الغشاء الخارجي تحافظ على الكبريت بتكافؤ صفر وتمنع ترسبه في الفسحة المحيطة . وعند نمو الخلايا بوجود الكبريت يتم حث العديد من البروتينات اللازمة لإجراء عمليات الأكسدة وإنتاج السكريات المكوثة . وعلى العموم وبالرغم من وجود اختلافات بين السلالات والأجناس او بين البكتريا والاراكيا الا ان صافي أكسدة مركبات الكبريت هو تكوين الكبريتات التي تؤدي الى خفض الأرقام الهيدروجينية .

وفي العمليات الصناعية عند استعمال الأحياء لابد ان تكون الأخيرة قادرة على النمو بأرقام هيدروجينية واطنة وتحمل تراكيز عالية من الحوامض ، وكما لوحظ أعلاه فان الرقم الهيدروجيني الواطئ يكون ضروريا لدورة الحديد ، اذ ان الحديدوز يعمل كمعط للالكترونات تحت الظروف الهوائية ، والحديدك يكون مستلما للالكترونات بديلا عند انخفاض تراكيز الأوكسجين ، وايون ألحديدك يكون غير ذائب عند الأرقام الهيدروجينية المتعادلة ويزداد الذوبان في الأرقام الحامضية ، لذا فان جاهزية ايون ألحديدك كمستلم للالكترونات يكون متوفرا للأحياء المحبة للحموضة ، ويكون اقل جاهزية بالنسبة للأحياء الهوائية تحت ظروف التعادل . وفي البيئات التي تستعمل فيها الأحياء المجهرية للتعدين الحيوي يكون الرقم الهيدروجيني 1-2 في حين ان الرقم الهيدروجيني داخل الخلايا يكون قريبا من التعادل وهذا يعني وجود فرق كبير في تدرج الرقم الهيدروجيني عبر الأغشية الخلوية ، وهذا التدرج يكون مهما لأغراض التغذية خاصة عند استعمال مختزلات ضعيفة مثل ايونات الحديدوز كمعطيات للالكترونات .

مصادر الطاقة الأخرى : تحوي البيئات التي توجد فيها المعادن والتي تكون حامضية وجهود الأكسدة والاختزال فيها أكثر سالبية من المزدوج O_2 / H_2O على العديد من المركبات يمكن ان تعمل معطيات للالكترونات للأحياء المحبة للحموضة من عمليات عدة ومنها :

- أكسدة النحاسوز الى نحاسيك .
- أكسدة اليورانيوم U^{4+} الى U^{6+} .
- أكسدة الموليبدنم Mo^{5+} الى Mo^{6+} .

وتكون هذه الحالات تحت الظروف الهوائية والتي يرافقها في معظم الأحيان عمليات تثبيت لثنائي اوكسيد الكربون ، وهناك إمكانية استعمال الايونات الاوكسجينية مثل AsO_2^- (As^{3+}) الذي يؤكسد الى AsO_4^{3-} (As^{5+}) لتعمل كمعطيات للالكترونات للأحياء المحبة للحموضة . وتوجد بعض السلالات التي تستطيع أكسدة الهيدروجين عند رقم هيدروجيني يتراوح بين 3 – 5.8 ولا تنمو هذه السلالات عند انخفاض الرقم الهيدروجيني الى 2 ولا عند الارتفاع الى 6.5 ، كما ان أكسدة الهيدروجين تثبط بوجود عنصر الكبريت وايون الحديدوز . وهذه السلالات تستعمل الهيدروجين كمعط للالكترونات لتثبيت ثنائي اوكسيد الكربون وتنمو الخلايا بوجود الأوكسجين مستملا للالكترونات .

العلاقة بين الأوكسجين ومستلمات الالكترونات البديلة

ان نمط عيش الأحياء كيماوية – صخرية التغذية المحبة للحموضة يحتاج الى كميات كبير من الطاقة لغرض إسناد نمط حياتها ذاتي التغذية ، ومن المعروف ان الأوكسجين هو الأكثر ملائمة وشيوعا لاستلام الالكترونات في الانظمة الحيوية لأنه المفضل من ناحية إنتاج الطاقة .

وكما ذكر آنفا ان جهد الأكسدة والاختزال للمزدوج Fe^{2+}/Fe^{3+} يكون موجبا وقريبا من O_2 / H_2O ، لذلك فان ايونات الحديدك يمكن ان تستعمل مستلمات للالكترونات . والأحياء المحبة للحموضة ذاتية التغذية حتى تستعمل ايونات أليديك مستملا للالكترونات لابد ان تستعمل مواد عديدة أخرى كمعطيات للالكترونات مثل مركبات الكبريت اللاعضوية المختزلة RISCs او أي ذرة عدا الحديدوز ، ولذلك تستعمل الأحياء الكبريت و Tetrathionate تحت الظروف اللاهوائية لاختزال ايونات أليديك ، كما يمكن لبعض السلالات اختزال ايونات أخرى مثل Mo^{6+} , Cu^{2+} , Co^{2+} عند استعمال الكبريت معطيا للالكترونات لذلك تستعمل في تعدينه . وتستطيع *At. thiooxidans* و *At. ferrooxidans* اختزال ايون الفناديوم V^{5+} الى V^{4+} أي يستعمل كمستلم للالكترونات .

وتستطيع بعض الأحياء متباينة التغذية Extremely acidophilic heterotrophs استعمال تنفس أليديك وذلك لان اختزال الايون الأخير يمكن ان يرافق أكسدة المواد العضوية وبعض الأنواع

التابعة للجنس *Acidiphilium* تختزل الحديد تحت الظروف الهوائية ولكن نموها يزداد عند نقص الأوكسجين .

الميكروبات العاملة في استخلاص المعادن

تتميز ببيئات تعدين المعادن بشكل أساسي بحموضتها وانخفاض أرقامها الهيدروجينية بشكل كبير جدا ، وتزداد فيها تراكيز المعادن ليصل بعضها الى 200 غم / لتر . وهذه البيئات يمكن ان تحوي أنواع عديدة من الأحياء مثل البكتيريا والاركية والفطريات والخمائر والطحالب . ومن الأحياء المسجلة في المياه الحامضية في مناجم النحاس مجموعة من البكتيريا أهمها *Acidithiobacillus* ومن الخمائر *Rhodotorula* و *Trichosporon* إضافة الى بعض السوطيات مثل *Eutrepia spp* والاميبا وابتدائيات أخرى .

وتعيش الأحياء في مجتمعات معقدة وتداخلات غذائية تساعد في انسياب المواد الغذائية من خلال علاقات التآزر Synergism او تبادل المنفعة Mutualism والتنافس Competition والافتراس Predation وتعرض المجتمعات الى تغيرات فصلية وكذلك تغيرات موقعية . فمثلا تحت ظروف معينة تسود *Acidithiobacillus* ، ولكن تحت ظروف أخرى تسود *Leptospirillum* وتتفوق على *Acidithiobacillus* مما يؤكد ان للبيئة دورا كبيرا في تحديد مكونات المجتمعات الميكروبية ، وهذه الحقائق تمثل فقط الأحياء القابلة للزرع والتي لا تمثل أكثر من 2 – 4 % وتحتاج الى أسابيع لنموها ولكن باستعمال الوسائل الحديثة مثل تهجين DNA / DNA وتحديد توالي القواعد النتروجينية في 16S rRNA وكذلك قياس الحوامض الدهنية PLFAs وجد ان هناك أعداد كبيرة غير المسجلة بطرق الزراعة التقليدية ، ويمكن ملاحظة بعضها في الجدول (20) .

جدول 20 : مجاميع الاحياء العاملة في الغسل الحيوي للمعادن الثقيلة

الكائن الحي	نوعية التغذية	المادة الغاسلة	الرقم الهيدروجيني	درجة الحرارة
الاركية				
<i>Acidianus ambivalens</i>	متباينة التغذية اختيارية	حامض الكبريتيك		
<i>Acidianus brierleyi</i>	متباينة التغذية اختيارية	حامض الكبريتيك	3 – 1.5	75 - 45
<i>Acidianus infernus</i>	متباينة التغذية اختيارية	حامض الكبريتيك		
<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	كيمياوية - صخرية ذاتية	ايون الحديدك	1.7	45 – 15
<i>Metallosphaera prunae</i>	كيمياوية - صخرية ذاتية	ايون الحديدك حامض الكبريتيك	محبة للحموضة	محبة لحرارة متطرفة
<i>Metallosphaera sedula</i>	كيمياوية - صخرية ذاتية	ايون الحديدك حامض الكبريتيك		

			كيمياوية - صخرية ذاتية	<i>Picrophilus oshimae</i>
			كيمياوية - صخرية ذاتية	<i>Picrophilus torridus</i>
85 - 55	3 - 2	ايون الحديدك حامض الكبريتيك	كيمياوية - صخرية ذاتية	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
محبة لحرارة متطرفة		ايون الحديدك حامض الكبريتيك	كيمياوية - صخرية ذاتية	<i>Sulfolobus ambivalens</i>
محبة لحرارة متطرفة		ايون الحديدك حامض الكبريتيك	كيمياوية - صخرية ذاتية	<i>Sulfolobus brierleyi</i>
			كيمياوية - صخرية ذاتية	<i>Sulfolobus hakonensis</i>
			كيمياوية - صخرية ذاتية	<i>Sulfolobus metallicus</i>
محبة لحرارة متطرفة		ايون الحديدك حامض الكبريتيك	كيمياوية - صخرية ذاتية	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
محبة لحرارة متطرفة		ايون الحديدك حامض الكبريتيك	كيمياوية - صخرية ذاتية	<i>Sulfolobus thermosulfidooxidans</i>
محبة لحرارة متطرفة		ايون الحديدك حامض الكبريتيك	كيمياوية - صخرية ذاتية	<i>Sulfolobus yellowstonii</i>
محبة لحرارة متطرفة		ايون الحديدك حامض الكبريتيك	مختلطة التغذية	<i>Sulfurococcus mirabilis</i>
		ايون الحديدك حامض الكبريتيك	مختلطة التغذية	<i>Sulfurococcus yellowstonii</i>
				<i>Thermoplasma acidophilum</i>
				<i>Thermoplasma volcanicum</i>
البكتريا				
	محبة للحموضة	كلوكونات	متباينة التغذية	<i>Acetobacter methanolicus</i>
			متباينة التغذية	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>
			متباينة التغذية	<i>Acidiphilium angustum</i>
35 - 28	2.4	ايون الحديدك حامض الكبريتيك	كيمياوية صخرية ذاتية	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
37 - 10	3.5 - 2	حامض الكبريتيك	كيمياوية صخرية ذاتية	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>
حرارة متوسطة	6 - 2	حوامض عضوية	متباينة التغذية	<i>Acidiphilium cryptum</i>
حرارة متوسطة	3	حوامض عضوية	متباينة التغذية	<i>Acidiphilium</i>

				<i>symbioticum</i>
حرارة متوسطة	6 - 3		كيمياوية عضوية	<i>Acidobacterium capsulatum</i>
				<i>Acidocella</i> sp.
			متباينة التغذية	<i>Acidomonas methanolica</i>
			متباينة التغذية	<i>Arthrobacter</i> sp.
			متباينة التغذية	<i>Aureobacterium liquifaciens</i>
			متباينة التغذية	<i>Bacillus</i> sp.
22	6 - 5.4		متباينة التغذية	<i>Bacillus coagulans</i>
37			متباينة التغذية	<i>Bacillus licheniformis</i>
		سترات	متباينة التغذية	<i>Bacillus megaterium</i>
			متباينة التغذية	<i>Bacillus polymyxa</i>
		سيانيد	متباينة التغذية	<i>Chromobacterium violaceum</i>
			متباينة التغذية	<i>Comamonas testosteroni</i>
24 - 18	6.2 - 5.5	ايون الحديدك	ذاتية اختيارية	<i>Crenothrix</i> sp.
22	6 - 5.4		متباينة التغذية	<i>Enterobacter agglomerans</i>
22			متباينة التغذية	<i>Enterobacter cloacae</i>
25 - 6	6.8 - 6.4	ايون الحديدك	ذاتية التغذية	<i>Gallionella</i> sp.
				<i>Kingella kingae</i>
37			متباينة التغذية	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
30	3 - 2.5	ايون الحديدك	كيمياوية صخرية ذاتية	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>
50 - 45	1.9 - 1.7	ايون الحديدك	كيمياوية صخرية ذاتية	<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>
40 - 5	7.8 - 5.8	ايون الحديدك حامض الكبريتك	ذاتية اختيارية	<i>Leptothrix discophora</i>
	6.8 - 3.5	ايون الحديدك	متباينة التغذية	<i>Metallogenium</i> sp.
			متباينة التغذية	<i>Ochrobacterium anthropi</i>
			متباينة التغذية	<i>Propionibacterium acnes</i>
22	6 - 5.4		متباينة التغذية	<i>Pseudomonas cepacia</i>

		سترات كلوكونات	متباينة التغذية	<i>Pseudomonas putida</i>
			متباينة التغذية	<i>Psychrobacter glacincola</i>
			متباينة التغذية	<i>Serratia ficaria</i>
		ايون الحديدك	متباينة التغذية	<i>Siderocapsa sp.</i>
37		ايون الحديدك حامض الكبريتيك	متباينة التغذية	<i>Staphylococcus lactis</i>
		حامض الكبريتيك	متباينة التغذية	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>
50		حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>
75 – 60		حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Thermothrix thiopara</i>
30 – 25	3	حامض الكبريتيك	مختلطة التغذية	<i>Thiobacillus acidophilus</i>
30 – 28	4 - 3.5	حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus albertis</i>
45		حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus caldus</i>
		حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus capsulatus</i>
		حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus concretivorus</i>
30 – 25	7 - 5	حامض الكبريتيك	مختلطة التغذية	<i>Thiobacillus delicatus</i>
30	7 - 5	حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
30	7 - 1.9	حامض الكبريتيك	متباينة اختيارية	<i>Thiobacillus intermedius</i>
28	3	حامض الكبريتيك	مختلطة التغذية	<i>Thiobacillus kabobis</i>
28	7- 6.2	حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus neapolitanus</i>
30	9 – 7.8	حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus novellus</i>
30 – 27	3 - 2.5	حامض الكبريتيك	مختلطة التغذية	<i>Thiobacillus organoparus</i>
30	6.9	حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus perometabolis</i>
40 – 23		حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus prosperus</i>
27	6.5 – 4	حامض الكبريتيك	كيماوية صخرية	<i>Thiobacillus</i>

			ذاتية	<i>pumbophilus</i>
30 – 25	7 - 5	حامض الكبريتيك	كيمياوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus rubellus</i>
		حامض الكبريتيك	كيمياوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus tepidarius</i>
25 – 11	7.2 – 6.6	حامض الكبريتيك	كيمياوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus thioparus</i>
	9 – 8	حامض الكبريتيك	كيمياوية صخرية ذاتية	<i>Thiobacillus versutus</i>
36 – 30	4 - 3	حامض الكبريتيك	متباينة اختيارية	<i>Thiomonas cuprinus</i>
حقيقية النواة				
27		سكسينات او كزالات	متباينة التغذية	<i>Actinomucor</i> sp.
الفطريات				
32			متباينة التغذية	<i>Alternaria</i> sp.
28			متباينة التغذية	<i>Aspergillus awamori</i>
			متباينة التغذية	<i>Aspergillus fumigatus</i>
30		او كزالات سترات كلوكونات مالات تارترات سكسينات	متباينة التغذية	<i>Aspergillus niger</i>
28		سترات	متباينة التغذية	<i>Aspergillus ochraceus</i>
30		سترات او كزالات	متباينة التغذية	<i>Aspergillus</i> sp.
28			متباينة التغذية	<i>Cladosporium resinae</i>
			متباينة التغذية	<i>Cladosporium</i> sp.
		او كزالات	متباينة التغذية	<i>Coriolus versicolor</i>
		او كزالات مالات بايروفات	متباينة التغذية	<i>Fusarium</i> sp.
27		سترات سيكسينات	متباينة التغذية	<i>Mucor racemosus</i>
		سترات او كزالات	متباينة التغذية	<i>Paecilomyces variotii</i>
25			متباينة التغذية	<i>Penicillium</i> sp.
28			متباينة التغذية	<i>Penicillium chrysogenum</i>
		سترات	متباينة	<i>Penicillium</i>

			التغذية	<i>funiculosum</i>
26			متباينة التغذية	<i>Penicillium notatum</i>
30 – 22		سترات اوكرالات كلوكونات	متباينة التغذية	<i>Penicillium simplicissimum</i>
			متباينة التغذية	<i>Rhizopus japonicus</i>
26 – 24			متباينة التغذية	<i>Trichoderma lignorum</i>
32			متباينة التغذية	<i>Trichoderma viride</i>
الخمائر				
30			متباينة التغذية	<i>Candida lipolytica</i>
			متباينة التغذية	<i>Rhodotorula sp.</i>
28			متباينة التغذية	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
			متباينة التغذية	<i>Torulopsis sp.</i>
			متباينة التغذية	<i>Trichosporon</i>
إضافة الى وجود أنواع من الطحالب والابتدائيات والاميبا غير المصنفة				

ويمكن دراسة معدلات نمو هذه الأحياء في التربة او غيرها من البيئات باستعمال طريقة اندماج الثايميدن المعلم $[H^3]$ thymidine والطريقة تكون مفيدة جدا عند دراسة تأثير الملوثات على معدلات النمو لمعرفة مدى تحملها وهي من الطرق السريعة والتي قد تستغرق ساعتين .

قابلية أحياء التعدين على المنافسة : في التعدين الحيوي وخاصة العمليات الكبيرة منها تتم في بيئات مفتوحة أي غير معقمة . وبذا تكون عرضة للتلوث بالأحياء الموجودة في الخامات او المركبات والمواد اللاعضوية المضافة وكذلك الماء والهواء . وعند حصول هذه الحالة قد تكون المنتجات ذات نوعية واطئة الجودة ، ولكن هذا لا يمثل واقع الحال ، فأحياء التعدين تكون قادرة على تفكيك الأملاح بكفاءة وتنمو بشكل سريع ، أي يكون لها وقت جيل او تضاعف قصير ، ولكن في المفاعلات الحيوية المستمرة تتعرض الخلايا لعمليات الانجراف ، لذلك تهيأ الظروف للأحياء للتكاثر بسرعة حتى لا تؤثر عليها عمليات الانجراف وتكون هي المتغلبة في المفاعلات الحيوية . اما بالنسبة للعمليات الأخرى فمسألة الانجراف غير واردة ، ولكن في جميع الأحوال يجب استعمال أحياء منتخبة ومتطبعة لظروف التعدين على مدى سنوات لغرض الوصول الى عمليات تعدين ناجحة ، وعليه فالسمة العامة للأحياء انها يجب ان تكون محبة ومتطبعة للحموضة وكذلك التراكيز العالية من المعادن والايونات ، إضافة الى المواصفات الأخرى من ناحية التغذية وغيرها التي مر ذكرها .

ومن اهم الاحياء المستعملة في التعدين الحيوي :

Acidithiobacillus ferrooxidans

وتسميتها القديمة *Thiobacillus ferrooxidans* وتحتوي على مجموعتين متباعدة نوعا ما . تعد البكتيريا من أفضل الأحياء المستعملة لعمليات التعدين الحيوي . والبكتيريا سالبة لصبغة كرام من المجموعة الفسلجية ذات التغذية الكيماوية - الصخرية عصوية الشكل وعادة مفردة ولكن بعض الأحيان توجد على شكل مزدوجات . لا تكون الأبواغ ، متحركة بواسطة سوط قطبي . تستخدم ثنائي اوكسيد الكربون مصدرا للكربون ، وتستخدم الامونيا مصدرا للنيتروجين . البكتيريا هوائية مجبرة ، ويمكن ان تنمو لا هوائيا على عنصر الكبريت او كبريتيدات المعادن باستخدام ايونات الحديد كـمستلم للالكترونات . ويحتوي الجنس على أنواع تعيش في أرقام هيدروجينية تمتد من 3 – 8 وذلك لان بعض الأنواع المؤكسدة للكبريت يمكن ان ترفع الرقم الهيدروجيني .

تقوم الخلايا بخفض الرقم الهيدروجيني في بيئات التعدين ، ففي البداية تبدأ الأحياء المحبة لحموضة قليلة مثل *At. thioparus* وبمرور الوقت ينخفض الرقم الهيدروجيني الى قيم واطنة تشجع المحبة للحموضة بالنمو والنشاط مثل *At. ferrooxidans* .

وبكتيريا *At. ferrooxidans* يمكن ان تتحمل تراكيز عالية من الايونات مثل ايونات الكوبالت لحد 30غم / لتر وايونات ألنحاسيك 55 غم / لتر وايونات النيكل 72 غم / لتر والزنك بحدود 120 غم / لتر ومركبات اليورانيوم 12 غم / لتر ، وايونات الحديدوز 160 غم / لتر . واغلب مقاومتها كروموسومية وتحتوي على بعض الجينات المتحركة التي اكتسبتها من بعض السلالات الخاصة ، ومنها يوجد على البلازميدات وأخرى تكون بمثابة جينات قافزة اكتسبت بالنقل الأفقي وهذه القافزات يمكن ان تقحم نفسها في كروموسوم الخلية او البلازميدات . وتحتوي جينات مسئولة عن طرد النحاس والزرنيخ والكاديوم وعدد آخر من المعادن .

وتحتوي *At. ferrooxidans* على آليات أخرى للمقاومة وليس الطرد فقط ومنها استعمالها للفوسفات المتعددة لمقاومة النحاس ، اذ تتحلل الفوسفات المتعددة وتكون معقدات مع المعدن وتصدر الى خارج الخلايا .

وتقاوم الزئبق بجينات *mer* التي انتقلت إليها ، والسلالات الحاوية على هذه الجينات تبدي مقاومة تصل الى 3 – 5 مرات مقارنة بالخلايا الخالية من الجين . وتقاوم البكتيريا الزئبق باليات أخرى وذلك بجعل الزئبق متطايرا Hg^0 بالاعتماد على ايون الحديدوز كمعط للالكترونات ويقوم بنقل الالكترونات الى الزئبق الساييتوكروم *Cyt.C oxidase* . كما يمكن لبروتين النحاس الازرق Rusticyanin المساعدة بمقاومة الزئبق وذلك بقيامه بنقل الالكترونات من الحديدوز . إضافة الى وجود أنواع مختلفة من *Cyt.C oxidases* لمقاومة معادن أخرى . وقد وجد عند تحليل جينوم البكتيريا انه يشفر لتسعة أنواع من الساييتوكرومات C واحد يستعمل عند النمو على الكبريت ، و 3

تستعمل عند النمو على الحديد ، والباقي يمكن ان تنتج في الحالتين . وزيادة أعداد الساييتوكرومات يشير الى سعة المواد التي يمكن للبكتريا استعمالها كمعطيات او مستلمات للالكترونات ، ومعظم الساييتوكرومات وبروتينات الحديد والكبريت وبروتين النحاس الأزرق توجد في الفسحة المحيطة .

اما الزرنيخ الذي يعد أكثر المواد سمية للأنظمة الحيوية فتقاوم البكتريا 1 غم / لتر ولكن أمكن تطوير المقاومة الى 13 غم / لتر على مدى سنين من التطبع في مزارع مستمرة ، ووجد ان جينات مقاومة الزرنيخ هي جينات كروموسومية ، وتحوي البكتريا على جين قافر *ars* من عائلة Tn21 والذي يعتقد انه انتقل أفقيا وان مصدره البكتريا *Alcaligenes faecalis* وذلك لوجود تشابه يصل الى 70 – 95 % بينهما ، وذلك ممكنا لان عملية التعدين الحيوي كما ذكر هي عملية مفتوحة ويمكن لأي كائن حي من الميكروبات ان يوجد فيها وهذا الانفتاح يساعد في دخول جينات جديدة أكثر ملائمة .

النوع الثاني التابع للجنس *At. thiooxidans* هي حساسة أكثر اذ تتحسس لوجود 5 % من الايونات التي تم اختبارها .

البكتريا الحلزونية *Lp. ferrooxidans* فهي تشابه *At. ferrooxidans* في مقاومتها لايونات النحاسيك والزنك والنيكل والمنغنيز والمنيوم ، ولكنها حساسة لايونات الكوبالت .

وإضافة الى ذلك فان مناطق التعدين تحوي على مجاميع طبيعية أخرى ، وتحتاج بعض عمليات التعدين الى حالات خاصة مثل بعض عمليات تعدين النحاس تحتاج الى درجات حرارية واطنة (4° م) وهذه يمكن ان تلاؤمها الأحياء التي تعيش في مناطق متجمدة والأخيرة تستطيع تحريك الحديد من خاماته بدرجات حرارية تصل الى الصفر المئوي ولكن العمليات تكون بمعدلات واطنة تصل الى 25 - 30 % من الفعاليات التي تتم عند درجة حرارية 21° م .

وفي أحيان أخرى تحتاج عمليات التعدين الى درجات حرارية مرتفعة ولذا تستعمل الاركيا *Sulfolobus* التي تستطيع تحريك المعادن بدرجات حرارة 65 - 85° م ، ولكن بصورة عامة تكون الأحياء المحبة للحرارة حساسة للنحاس لذلك تقل أهميتها العملية ، وعليه فاعلم عمليات التعدين تجري بدرجات حرارية معتدلة .

والأحياء الأخرى المشتركة في عمليات التعدين يمكن ان تكون من أحياء متباينة التغذية وفي هذه الحالة تعتمد الخلايا على إفرازات الأحياء ذاتية التغذية او الخلايا المتحللة وتستعملها مصادرا للكربون وبذلك تزيل الكربون المختزل مما يؤدي الى التخلص من فعله التثبيطي على الأحياء ذاتية التغذية مثل *Acidithiobacilli* ويزداد نمو الأخيرة وتساعد في تحريك اكبر للمعادن . إضافة الى ذلك فالأحياء متباينة التغذية لها أدوارا مهمة في تحريك المعادن نظرا لإفرازها الحوامض العضوية مثل السترات والكلوكونات والاوكلات وغيرها .

طرق التعدين الحيوي : تستعمل الأحياء المجهرية لاستخلاص المعادن على نطاق تجاري من خاماتها او مركزاتها ، وعمليات التعدين الحيوي من فعاليات الإنسان القديمة ، ولكن كانت تجرى دون معرفة الأحياء المشتركة في العملية الى ان تم عزل بكتريا *Thiobacillus* عام 1950 . وعلى الطرف الثاني كانت ولا زالت عمليات التعدين التقليدية مستعملة ضمن خطوات :

- تحضير الخامات عادة باستخراجها من باطن الأرض .

- سحق المواد لزيادة المساحة السطحية .

- استخلاص المعادن باستعمال الحرارة والمواد الكيماوية .

وعمليات التعدين التقليدية مدمرة للبيئة ، ولذا تم تطوير التعدين الحيوي وبطرق مختلفة مثل الغسل الحيوي وغيرها لغرض تجنب استعمال المواد الكيماوية المؤذية . واستعملت الأحياء لاستخلاص المعادن الثمينة وإزالة الكبريت من الفحم والنفط وكذلك في المعاملات النهائية من تكرير النفط لامتناع المعادن منها ، وبطبيعة الحال يكون من الأفضل عزل الأحياء من بيئتها ثم استعمالها في مفاعلات الغسل الحيوي *Bioreactors* ، وهذه الطريقة تستخدم في الوقت الحاضر لاستخلاص الذهب والنحاس والكاديوم واليورانيوم .

وتعد أكسدة ايونات الحديدوز هي الأهم في استخلاص وتصفية المعادن من خاماتها التي تكون على شكل كبريتيدات في معظم الحالات . وتستخدم الأحياء لأداء وظائف معينة أثناء عملية التعدين :

- تحويل الكبريتيدات او الاوكسيدات للمعادن غير الذائبة الى كبريتات ذائبة في الماء ،

كما في تحويل خام النحاس *Covellite* (CuS) و *Chalcocite* (Cu₂S) الى كبريتات النحاس *CuSO₄* الذائبة .

- تستعمل الأحياء كمعاملة أولية لفتح تراكيب الأملاح في الخامات للسماح للمواد الكيماوية باختراق تراكيب الخام وإذابة المعدن المطلوب ، كما في إزالة الحديد والزرنيخ والكبريت من خامات الذهب *Gold - arsenopyrite* ويبقى الذهب في الأملاح المتبقية مما يسهل استخلاصه بالطرق التقليدية وهي استعمال السيانيد .

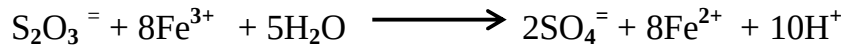
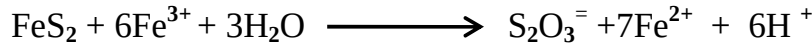
والمعروف انه ليست كل الأملاح او الخامات قابلة للاستخلاص بالأنظمة الحيوية ، ولغرض استعمال الأنظمة الحيوية لابد للخامات ان تحوي على أملاح الحديد او الكبريت المختزل ، ولذلك فان الخامات التي ينقصها الحديد والكبريت يمكن ان تستخلص حيويًا اذا كانت موجودة مع خامات أخرى او يضاف إليها الحديد والكبريت وعندها ستهاجم بواسطة ايون الحديدك او حامض الكبريتيك . إضافة الى ذلك فان الأملاح او الخامات اللاكبريتيدية يمكن ان تستخلص باستعمال أحياء تنتج الحوامض العضوية مثل الاوكزاليك والستريك وغيرها التي تنتج من قبل أنواع معينة من الفطريات (جدول 20) .

آليات الغسل الحيوي

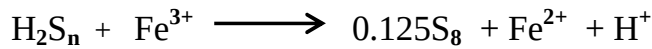
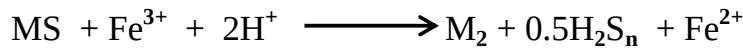
عملية غسل المعدن Metal leaching عملية كيميائية تعمل فيها أيونات الحديد والبروتونات كأساسيات لعمل تفاعلات الغسل والتصفية . ودور الأحياء المجهرية تزويد كيمائيات الغسل وإيجاد البيئة الملائمة لإجراء عمليات الاستخلاص .

تقوم الأحياء المجهرية بتكوين سكريات خارجية مكثرة عند تلامس سطوح الأملاح وتكون الأغشية الحيوية والتراكيب الأخيرة لا تتكون عند نمو الأحياء بشكل عالق . وداخل الأغشية الحيوية تحدث عمليات الأكسدة الحيوية وتكون كفاءة جدا في هذا الحيز ولا تحدث في المحاليل المحيطة . ومعظم عمليات الأكسدة وإذابة الأملاح لا تكون متشابهة لجمع كبريتيدات المعادن ولكن تتم عبر تكوين مركبات وسطية مختلفة ومنها :

• مسار Thiosulfate وتتم أكسدة الكبريتيدات غير الذائبة مثل Pyrite (FeS₂) و Molybdenite (MoS₂) و Tungstenite وكذلك تستعمل للكبريتيدات المتعددة مثل Sphalerite (ZnS) و Chalcopyrite (CuFeS₂) و Galena (PbS) . وفي هذا المسار تتم إذابة الخامات من خلال مهاجمتها بأيون الحديد لأكبريتيدات المعادن غير الذائبة في الحامض ، وتكوين الثايوسلفات كمركب وسطي والكبريتات كمركب نهائي كما في المعادلات التالية باستعمال خام الحديد كمثال :



• طريقة تكوين عنصر الكبريت وتستعمل عادة مع الكبريتيدات المتعددة ، بإذابة جزء من الخام في الحامض تتم بمهاجمة كل من أيون الحديد والبروتونات ، ويتكون عنصر الكبريت كمركب وسطي ويكون العنصر ثابتا نوعا ما ولكنه يؤكسد الى الكبريتات بواسطة الأحياء المؤكسدة مثل *At. thiooxidans* و *At. caldus* كما في التفاعلات الآتية :



MS كبريتيد المعدن المتعدد

$$n = 1-2$$

ويمكن ان تتجمع حبيبات الكبريتيد (الكبريت الغروي) او Polythionate في الفسحة المحيطة عند الحدود الخارجية للخلايا وتكون بمثابة خزين للطاقة .

اما ايونات الحديدوز الناتجة يمكن ان تعاد أكسدها بواسطة الأحياء المجهرية المؤكسدة للحديد مثل *At. ferrooxidans* او انواع تابعة للأجناس *Sulfobacillus* , *Leptospirillum* ومن هذا يتضح ان دور الأحياء المجهرية هو لإنتاج حامض الكبريتيك والبروتونات للمهاجمة والابقاء على الحديد بشكله المؤكسد Fe^{3+} وتعمل الآلية عند استعمال ZnS , MnS_2 , As_2S_3 , As_3S_4 . $CuFeS_2$, PbS .

العوامل المؤثرة

تتأثر عملية التعدين بعدد من الظروف وللوصول الى أفضل استخلاص لابد من العناية بانتخاب الأحياء القائمة بالاستخلاص وذلك لان الإخلال بالعوامل يمكن ان يؤدي الى طغيان مجموعة على الأخرى ومن العوامل المؤثرة

• **الحرارة :** تجري عمليات التعدين او الاستخلاص الحيوي بشكل عام بدرجات حرارة معتدلة تصل الى 40° م وتكون الاحياء متشابهة بغض النظر عن الخامات الموجودة ، ولكن بعض الأحيان تتم العملية بدرجات حرارية تصل الى 80° م . وبذلك فان الأحياء المشاركة تعتمد على درجة الحرارة . ومن جهة ثانية فان عمليات التعدين منتجة للحرارة Exothermic لذلك وجب إجراء عمليات التبريد لغرض استمرار العملية اذا كانت تجرى بأحياء محبة لحرارة متوسطة . وعند الدرجات الحرارية العالية مثل 75 – 80° م فان عمليات الإذابة والاستخلاص تكون سريعة وتستعمل في استخلاص النحاس من الخام Chalcopyrite على النطاق التجاري .

وتحتاج البكتريا *At. ferrooxidans* حرارة متوسطة للاستخلاص ، في حين تستعمل *Lp. thermoferrooxidans* بدرجات حرارية 45° م .

• **نوعية الخام المستعمل** ويعد من العوامل المهمة والمؤثرة على الآلية التي تستخدمها الأحياء وبالتالي تؤثر على الكفاءة . وبعض الإحياء يمكن ان تثبط عند وجود خامات معينة فمثلا بعض سلالات *At. ferrooxidans* تثبط بالخام الحاوي على الزرنيخ Arsenopyrite وتثبط الأركيا *Sulfolobus acidocaldarius* بخام الحديد Pyrite . كما ان وجود بعض المعادن يمكن ان يثبط عمليات استخلاص معادن أخرى مثل وجود معادن النحاس والنيكل واليورانيوم والثوريوم بتركيز عالية يؤدي الى تقليل استخلاص المنغنيز ولكن بتركيز قليلة 5 ملغم / لتر لا تكون مؤثرة .

• **نوعية الأحياء المستعملة** فذاتية التغذية تحتاج الى تزويدها بكميات كافية من الأوكسجين وثنائي اوكسيد الكربون خاصة عند استعمال طريقة الأكوام ، وقد تثبط هذه الأحياء بوجود المواد العضوية مثل خلاصة الخميرة . والتركيز الأمثل لثنائي اوكسيد الكربون بحدود 10 ملغم / لتر بالنسبة للبكتريا *At. ferrooxidans* عند استعمال خامات الحديد الحاوية على الزرنيخ ، والتركيز

الأمثل في الحالات العامة 3 – 7 ملغم / لتر ، ويمكن ان يدخل الغاز من خلال دخول الهواء في المزارع المستمرة بنسبة 4 % للحصول على أفضل أكسدة لعناصر الحديد والنحاس والزرنيخ .

• **الحالة الفيزيائية للخام المستعمل** تؤثر على عملية الاستخلاص ويمكن طحن الخامات لزيادة المساحة السطحية ، كما ان الخامات في الأطوار السائلة يكون استخلاصها أفضل من استعمال تخمرات المواد الصلبة .

المشتتات الحيوية

تعد عملية التشتيت الحيوي Biodispersion من العوامل المؤثرة المهمة في عمليات الاستخلاص وإزالة التلوث بالمعادن الثقيلة وتهدف إضافة المشتتات سواء لمعالجة المواد العضوية الملوثة أو المعادن الثقيلة إلى زيادة ذوبانها في الماء لغرض تحليلها حيويًا أو إزالتها بالغسل ، خاصة بالنسبة للمعادن الثقيلة غير القابلة للتحلل الحيوي . وإضافة المشتتات يمكن أن يؤدي إلى عكس حالة الامتزاز (Desorption) للمعادن الثقيلة ، ولذلك فلا بد من اختيار المادة المشتتة بعناية فعند استعمال مشتتات سالبة الشحنة يمكن أن تسحب أيونات المعادن والتي يمكن أن تزال فيما بعد بعملية الغسل ، أو تكوين معقدات مع المعادن موجبة الشحنة والتي يمكن أن تزال فيما بعد بعملية الغسل أو تكوين معقدات مع المعادن تترسب على سطوح التربة . وعند استعمال مشتتات موجبة الشحنة وخطها مع التربة فإنها تؤدي إلى تقليل امتزاز الأيونات الموجبة مثل أيونات النحاس والرصاص والكاديوم والزنك وغيرها على سطوح حبيبات التربة ربما بسبب التنافس على الشحنات السالبة لسطوح الطين أي تحصل عملية تبادل أيوني وهذا يعتمد على تركيبة الطين أو التربة .

والمواد المكوثة المنتجة من قبل البكتريا والطحالب يمكن أن ترتبط بالعديد من المعادن ومنها :

• **Emulsan** مشتت ينتج من البكتريا *RAG1 Acinetobacter* يمكن أن يربط 240 مايكرو غرام من UO_2^{2+} لكل ملغم من المشتت .

• **السكريات المكوثة المنتجة من بعض سلالات البكتريا** *Pseudomonas* يمكن أن تربط 96 مايكرو غرام من اليورانيوم لكل ملغم من المشتت ، وبعض السلالات البحرية ترتبط بعدد من الأيونات بالترتيب $Pb = Cu, Fe, Zn, Ni$ ولكن توجد فروق بين السلالات .

• **السكريات المكوثة من البكتريا** *Arthrobacter* يربط 3.3 من أيونات الكاديوم لكل ملغم وكميات أكبر من اليورانيوم

• **السكريات المكوثة من** *Klebsiella* تربط 11 مايكرو غرام من الكاديوم و 22 من النحاس لكل ملغم من السكريات .

وتختلف السكريات المكثرة عن المشتتات في ان السكريات المكثرة كبيرة الحجم ويصل وزنها الجزيئي الى 10⁵ ولذلك تفضل المشتتات لأنها صغيرة الحجم . وتكون المشتتات حويصلات مختلفة الأحجام لسحب المعادن ولا تكون ترسبات لذلك يمكن ان تزال بسهولة . وما يعيق استعمال المشتتات في معالجة التربة هو كثرة وتعقيد الأنظمة في التربة فهي تحوي العديد من الايونات الموجبة التي تنافس المعدن لتكوين المعقدات معها . لذلك وجب اختيار المشتتات الحيوية المراد استعمالها والنظام الذي ستعمل فيه سواء التربة او المياه . ويؤثر تركيب المشتت الحيوي وحجم جزيئاته على نوعية المعقدات التي تتكون وبدوره يؤثر على حركة المعادن في التربة . إضافة الى ان مساحة التربة وشحنتها يؤثر على وصول المشتت الى مناطق التلوث او مخازن المعادن ويؤثر كذلك على التداخل بين المشتتات الحيوية والمواد الممتزة .

الطرق المستعملة

طريقة الأكوام Heap method

وتسمى أيضا Dump method وتستعمل الطريقة لاستخلاص عددا من المعادن مثل النحاس والكوبالت والذهب اليورانيوم وغيرها . وتتم الطريقة بجمع التربة الحاوية على خام المعدن بعد سحقه الى حجم حبيبات متوسطة لتشجيع نمو الاحياء التي تقوم بعملية التعدين . وتستعمل الطريقة لاستخلاص المعادن من الخامات العسوية مثل استخلاص الذهب من مركبات الذهب في الخامات الحاوية على الحديد والزرنيخ Gold arsenopyrite ، واستخدمت في سبعينيات وأواسط ثمانينات القرن المنصرم لاستخلاص المعادن من الخامات الرخيصة مثل Covellite, Chalcosite وهي خامات نحاس بشكل رئيس ولكن تحوي على معادن اخرى . وهي من الطرق الراكدة فبعد جمع الخامات وجعلها بشكل كومة على أرضية غير ناضجة يتم إروائها - والذي يفضل ان يكون بطريقة التقطير - بمحلول حامض الكبريتيك المخفف ويمكن ان تكون التهوية من خلال السائل المناسب على الكومة او بواسطة ضخ الهواء داخل الكومة بأنابيب توضع قرب قاعدة الكومة . والسائل الذي يرشح عن الكومة يؤخذ الى وحدات استخلاص المعادن كما في معاملة خامات الذهب .

وتكون مفاعلات الكومات بسيطة ورخيصة ولكن تحتاج الى وقت طويل يصل الى عدة أسابيع او أشهر وتستعمل مثلاً لتعدين النحاس بمستوى 180000 طن لكل موسم .

انواع الاحياء

تكون الاحياء في هذه الطريقة من الاحياء الطبيعية التي تنمو بشكل مجموعة او جوقة أي مجموعة متناغمة يحصل بينها تبادل للمواد الغذائية والتغذية المتداخلة ، ويكون بعضها متحملاً لحموضة قليلة واخرى متحملة لحموضة زائدة ، كما ان بعضها ذاتي التغذية وأخرى متباين

التغذية ، وهذا يعني انها أنظمة مفتوحة وغير معقمة ، ووجود هذا التنوع يساعد في عملية الاستخلاص ويمكن زيادة كفاءة الاستخلاص بإضافة اللقاحات .

وتختلف الاحياء الطبيعية الموجودة بالاعتماد على نوعية الخام المستعمل وكذلك الظروف الأخرى المستعملة أثناء عملية التعدين ، فعند استعمال الحرارة الطبيعية 25° م والى حد 40° م تكون الأحياء مؤلفة من البكتريا السالبة لصبغة كرام وهي الاحياء المؤكسدة للحديد والكبريت ، مثل *At. ferrooxidans* والمؤكسدة للحديد و *At. caldus* و *At. thiooxidans* المؤكسدة للكبريت ، والحلزونيّات *Lp. ferriphilum* (المؤكسدة للحديد المجبرة) و *Lp. ferrooxidans* .

وعند إضافة محلول إرواء يحوي على ايونات الحديدوز الى الكومة وتدويره خلالها تكون المؤكسدة للحديد هي المتغلبة مثل *At. ferrooxidans* . إضافة الى ذلك توجد أحياء مؤكسدة للحديد والكبريت من مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* . وأحياء أخرى محبة للحموضة متباينة التغذية مثل البكتريا العائدة للجنس *Acidiphilum* وأحياء أخرى تعود الى مجموعة الاركيا . ويكون وجود احياء متباينة التغذية ضروريا لإزالة المواد العضوية التي تكون مثبطة للأحياء ذاتية التغذية السائدة .

اما عند استعمال حرارة 45 – 50° م وهي المستعملة في القليل من العمليات التجارية فالفلورا القائمة بالتعدين منها *At. caldus* وانواع من جنس الحلزونيّات *Leptospirillum* تكون هي السائدة . وعند معاملة خامات Chalcapyrite ومركّزات خامات الحديد الحاوية على الزرنيخ بدرجة حرارة 45° م تكون *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* هي السائدة ، إضافة الى وجود احياء محبة للحرارة غير قادرة للنمو على الأوساط الزراعية المختبرية . ومن الاحياء الاخرى الموجبة لصبغة كرام جنس *Acidimicrobium* اضافة الى الاركيا من مجموعة *Ferroplasma – like organism* .

وعند استعمال درجات حرارية 70° م او أعلى تكون الاحياء السائدة هي من الاركيا وليس البكتريا ومنها التابعة للجنس *Metallosphaera* و *Sulfolobus* وتكون هي المتغلبة ، اذ ان النوع *Sulfolobus metallicus* يوجد عند درجة 70° م كأقصى حد ولا يوجد بدرجات حرارية أعلى .

اما بدرجة حرارة 80° م فتكون مجاميع الاركيا *Metallosphaera – like* , *Sulfolobus – like* هي السائدة . وعند درجة حرارة 90° م فتتغلب الاركيا *Acidianus ambivalens* , التي تعيش على الكبريت المختزل بأرقام هيدروجينية واطئة جدا .

مزايا طريقة الأكوام

من أهم المزايا الجيدة لهذه الطريقة انها رخيصة ومفاعلاتها تكون بمثابة أرضيات غير ناضحة وتستعمل لتعدين كميات كبيرة من الخامات الرديئة .

مساوئ طريقة الأكوام

للطريقة مساوئ يمكن تحديدها بالنقاط الآتية :

0 عدم وجود تجانس في الكومة ويصعب إدارتها اذ لا يمكن السيطرة على العديد من المؤشرات بشكل متجانس .

0 عدم امكانية تهوية الكومة وتزويدها بالأوكسجين وثنائي اوكسيد الكربون وإدخال السوائل المستعملة في الإرواء والاستخلاص بشكل متجانس .

بالرغم من إمكانية الاعتماد على الفلورا الطبيعية لإجراء التعدين الا انه من الأفضل إضافة اللقاحات ومرة اخرى تكون هذه غير متجانسة ، كما يصعب إيصال المتطلبات الغذائية والغازات وسوائل الإرواء بشكل متجانس .

استعمال المفاعلات الحيوية

نظرا للمعوقات التي تواجه طريقة الأكوام لذلك استبدلت بعض العمليات باستعمال الصهاريج المخلوطة Stirred tanks والتي يفضل ان تكون مكونة من سلسلة من المفاعلات ، في الأولى منها تضاف الأملاح او خام المعدن مع المغذيات اللاعضوية سوية مثل الامونيا او مخصبات تحوي على النتروجين والفوسفات ، ثم تمرر الى باقي المفاعلات تحت ظروف مسيطر عليها من ناحية الحرارة والأرقام الهيدروجينية ، ويمكن ان تستعمل هذه المفاعلات بمثابة معاملات أولية لمعاملة مركبات خامات الذهب الحاوية على الزرنيخ وكذلك للمعاملات الأولية لخامات الكوبالت .

الاحياء المستعملة

تعتمد عمليات التعدين على الفلورا الطبيعية للخامات كما هو الحال في استعمال الأكوام واعتمادا على درجات الحرارة تسود بعض الكائنات على الاخرى ، كما ان سيادة مجموعة معينة لا يكون ثابتا ، فقد يسود نوعا ما في بداية العملية ولكنه يمكن ان يتقهقر في الصهاريج اللاحقة . والاحياء التي تسود عند درجات حرارية 45 – 50 °م هي *At.caldus* وأنواع من جنس *Leptospirillum* لعدد من الخامات .

اما بدرجات حرارية معتدلة وفي الصهاريج المستمرة والتي يكون فيها تركيز الحديد ثابتا وعاليا تكون المشاركة بين الأحياء هي الأفضل فتقل أهمية *At. ferrooxidans* وتحل محلها في الفاعلية مجموعة مكونة من *Leptospirillum* ، *At.caldus* ، *At. thiooxidans* وذلك لان استمرار العملية يوفر فرصة لعمليات الانتخاب .

تصميم المفاعلات

تعتمد عمليات تصميم المفاعلات الحيوية على المواصفات الفيزيائية والكيميائية والحيوية للمواد المستعملة للاستخلاص وذلك لان المكونات الموجودة في المفاعل تتكون من أطوار مختلفة فهي تحوي على أطوار سائلة وأطوار غازية متولدة من ضخ الهواء وأطوار صلبة منها خامات المعادن والخلايا التي تقوم بالتعدين والتي يكون بعضها بشكل عالق والآخر ملتصق . كما ان حجم العملية اذا كانت كبيرة فهو يحتم ان تكون العملية مستمرة ومفتوحة . واعتمادا على الصفات الحركية لنمو الميكروبات يكون الاختيار الأفضل هي المفاعلات مستمرة الخلط Continuous stirred tank reactor (CSTR) .

ومن المؤشرات الأخرى هو طبيعة نمو الاحياء ذاتية التغذية والتي تكون ذات أهمية في عملية التعدين وذلك لأنه في حالات التخمر العادية تكون هناك ألفة عالية بين المواد المستعملة والاحياء المستعملة . اما في حالة التعدين فان الخامات والمواد عادة تكون عصية بالنسبة لتأثير الميكروبات وهذا يعني ان الألفة واطنة جدا فمثلا تكون قيم K_s بالنسبة لمعظم السكريات مثلا تصل الى ملغرامات قليلة / لتر ، في حين في حالة المعادن فتصل الى 3 – 6 غم / لتر ، أي ان الفرق يصل الى الآلاف المرات . وهذا يؤثر على اختيار وتصميم المفاعل ، فعند الحاجة الى درجات عالية من التحويل فان هذا يعني الحاجة الى حجم كبير ولذلك يستعمل CSTR كاختيار أول وكذلك استعمال المفاعلات الأنبوبية (TPFR) Tubular plug flow reactor وهذا يوفر إمكانية الوصول الى نسبة تحويل ملائمة بحجم قليل جدا ، ولكن وجود المواد الصلبة تجعله غير عملي ويمكن ان يستبدل بتصاميم أخرى مثل استعمال أعمدة الرفع الهوائي Air lift column او Percolation column

مشاكل المفاعلات

هناك عددا من المشاكل المتوارثة عند استعمال المفاعلات الحيوية ، فكما ذكر أعلاه ان نظام التفاعل يكون متعدد الأطوار ، فهناك مشكلة وصول المواد الغذائية الى الخلايا العالقة او الملتصقة . إضافة الى ان مواد الايض المفرزة الى الخارج يجب ان تزال ولكنها في هذه الحالة تستعمل في إذابة المعادن ، والمعادن الذائبة يجب ان تزال من حبيبات او تكتلات الخامات العالقة في السائل . كما ان هناك مشكلة في نقل الأوكسجين وثنائي اوكسيد الكربون التي يجب ان تذوب في الوسط الغذائي أولا ثم تنقل الى الخلايا ويكون ذلك بضخ الفقاعات الغازية وهذه لا تخلو من المشاكل اذ انها تؤثر على تجانس عالق الخامات داخل المفاعل فالفقاعات تؤدي الى اضطراب نمط الانسياب الذي يولده الخلط ، كما ان استعمال الخلاطات خاصة عند سرعة عالية يؤدي الى توليد قوى القص على الخلايا مؤدية الى زيادة الإجهاد عليها وربما منعها من النمو ، وقد يفضل بعض الاحيان الرج فيما

إذا كانت الكميات صغيرة . فهناك بعض الأمور الايجابية في استعمال المفاعلات الا ان هناك بعض الأمور السلبية .

مزايا استعمال المفاعلات الحيوية

من مزاياها الجيدة انها :

- يمكن ان تعمل تحت ظروف مسيطر عليها خاصة عندما تكون الكميات صغيرة او متوسطة وتستعمل في المعاملات الأولية لاستخلاص المعادن الثمينة مثل الذهب .
- إمكانية توفير ظروف ثابتة وحالة تجانس مسيطر عليها مما يؤدي الى زيادة الإنتاجية من وحدة الحجم ، وكذلك زيادة درجة الاستخلاص .

مساوئ المفاعلات الحيوية

هناك بعض المعوقات التي تواجه استعمال المفاعلات الحيوية منها :

- تواجه المشاكل العامة لعمليات تخمر المواد السائلة .
- نظرا لكون الخامات هي مواد صلبة لذلك يجب ان لا تزيد عن 20 % من المواد المعدة للتخمير لا تصبح الأوساط لزجة او تركد المواد الصلبة العالقة وبالتالي يصعب خلطها وتهويتها وتكون ايضا مكلفة من ناحية الطاقة اللازمة .
- عند استعمال الطرق المستمرة فان ذاك يؤدي الى خروج مواد بكميات كبيرة تحتاج الى معاملات إضافية أي ان الاستخلاص لا يكون متكاملًا .
- المعاملات التكميلية : بعد الانتهاء من عمليات إذابة المعادن وتحويلها الى مواد ذائبة يمكن ان تبدأ عمليات الاستخلاص النهائية باستعمال عمليات كيميائية بحتة ، ويمكن ان تبدأ هذه العمليات في أثناء عمليات التعدين وفعالية الأحياء عليها .

تعدين الذهب

استعملت طرق الاستخلاص الحيوي لاستخلاص الذهب نظرا لوجوده ضمن خامات عصية الاستخلاص . وقد يستعمل الاستخلاص الحيوي في المراحل الأولى ثم تكمل العمليات التقليدية . والخامات المستعملة Gold - arsenopyritepyrite تسحق وتؤكسد حيويًا وأثناء عملية الأكسدة تقوم البكتريا بأكسدة الطبقة الخارجية المكونة من الكبريتيدات التي تغلف جزيئات الذهب الصغيرة ، وتستعمل *Acidithiobacillus* و *Leptospirillum* لعمليات الأكسدة ولكن يفضل استعمال الأركيا المحبة للحرارة . واستخلاص الذهب بالطرق الحيوية يمكن ان يزداد من 15 – 30 % بالطرق التقليدية الى 95 % . ويستعمل في استخلاص الذهب المفاعلات CSTR لمعاملة مركبات الذهب التي يمكن الحصول منها على 95 % في 4 أيام ، اما طريقة الأكوام فتستعمل لمعادن الذهب

الرديئة . وبشكل عام وبعد معاملة خامات الذهب بطرق حيوية تستخدم النواتج للحصول على المعدن بشكل نقي باستعمال السيانييد .

تعددين النحاس

يستعمل التعدين الحيوي لاستخلاص النحاس من الخامات الرديئة بطريقة الأكوام لأنها قليلة الكلفة . ويتم تزويد الأكوام بسائل الإرواء ألحامضي المخفف الحاوي على البكتريا ، ثم تسحب السوائل من الأكوام وتضخ الى وحدات الاستخلاص النهائية والتي يمكن ان تتم باستعمال المذيبات او بالطرق الكهربائية .

توجهات التعدين الحيوي المستقبلية

بعد دراسة عمليات الاستخلاص الحيوي يمكن ان يستخلص الآتي .

- العمليات بسيطة وقد لا تحتاج الى مهارات كبيرة .
 - تستعمل في ظروف معتدلة .
 - تحتاج الى طاقة قليلة مقابل حاصل كبير حتى في حالة استعمال المفاعلات الحيوية .
 - قليلة الكلفة .
 - صديقة للبيئة ولا تسبب التلوث .
- من المزايا أعلاه إضافة الى جوانب أخرى يمكن للتقنيات الحيوية ان تقدم الكثير في هذا المجال . ففي الوقت الحاضر الذي استنفدت فيها اغلب موارد المعادن الجيدة ، وبقيت بعض الترسبات في مناطق عديدة لم تستغل لاحتوائها على العناصر السامة مثل الانتيمون و Bismuth والزرنيخ والزنابق ، كما ان بعض المصادر تكون كلف استخلاص المواد منها عالية وتكون نواتجها واطئة الجودة .

ومن جهة ثانية فان عمليات الاستخلاص تؤدي الى تصاعد غازات البيوت الزجاجية مثل ثنائي اوكسيد الكربون وقد أمكن في هذا المجال استبدال الصخور الكلسية Lime stone بمواد قلووية أخرى للتقليل من تصاعد ثنائي اوكسيد الكربون ولكن لا تزال المواد القاعدية تؤدي الى تصاعد الدخان والغبار وملوثات أخرى من مصاهر ومحارق المعادن التي تكون خطرة لاحتوائها على المعادن ولأسباب أخرى عديدة ، كل هذا أدى الى جعل الدول الصناعية تواجه نقص الموارد المعدنية ، ولذلك أنشأت مشاريع عملاقة متعددة الجنسيات للاستفادة من الموارد المتوفرة :

- بدأت بعض المشاريع بالبحث عن وسائل لاستخلاص المعادن من الفضلات او أي من المصادر الثانوية كما يحصل في أوروبا .

● دراسة إمكانية استعمال الموارد غير التقليدية وباعتماد التعدين الحيوي لتضخيم النواتج من مواد أولية غير صالحة للاستعمال بالطرق التقليدية للتقليل من استعمال الطاقة من جهة وتقليل التلوث البيئي بالفضلات .

● ازدادت في الآونة الأخيرة الدراسات المعمقة والمستفيضة لآليات الاستخلاص الحيوي والغسل الحيوي ووضعت برامج لدراسة الأحياء التي تقوم بالتعدين والتي توجد عادة في البيئات المتطرفة التي تمتاز بـ:

○ ارتفاع الحرارة .

○ ارتفاع التراكيز الملحية .

○ وجود تراكيز عالية من ايونات المعادن .

○ ارتفاع الحموضة .

ولذلك بدأ بدراساتها من الناحية الجزيئية لتسجيل الوسائل التي بواسطتها تستطيع الأحياء العيش والتداخل مع الظروف القاسية التي توجد بها واستخدام المعلومات المتخصصة للسيطرة وإدارة العمليات . وبطبيعة الحال تكون الدراسات الأولية مختبرية ثم تنقل الى المجال الحقل بعد إجراء الخطوات اللازمة لعمليات التوسيع .

● استنباط واستخدام آليات تساعد في ذلك مثل استخدام التلبد الحيوي Bioflocculation والتطويف الحيوي Bioflotation باستخدام مواد مشتقة من الأحياء المجهرية .

● بدأ العاملون بالتفكير في استغلال الكواكب الأخرى واستخدمت في ذلك مواد جلبت من كواكب أخرى وغير موجودة على كوكب الأرض ، وأمكن استغلالها من قبل بعض الأحياء مثل *At. ferrooxidans* و *Lp. ferrooxidans* إذ ان هذه الأحياء تعيش في ظروف متطرفة قد تكون مشابهة للظروف على كواكب أخرى ، ومثل هذه الأحياء مفيدة في استغلال الكواكب الأخرى وتكون وسيلة لنقل الحياة إليها . ولذا يعتقد ان هذه الأحياء تكون وسيلة جيدة للتطبيقات في كواكب غير الأرض .

المعالجات الحيوية البيئية

مما تقدم ركزت المناقشة على إمكانية استخدام الأحياء المجهرية في التعدين الحيوي كوسيلة للتخلص من التلوث البيئي . ولكن من جهة أخرى فان التقنيات الحيوية تقدم الإمكانيات لمعالجة التلوث الموجود لأجل المعالجة وليس للاستخلاص المعدني وان كانت الأخيرة يمكن ان تكون بمثابة فائدة ثانوية . وتقع محاولات معالجة البيئة ضمن ما يسمى بالمعالجة الحيوية Bioremediation وتضم

آليات ووسائل عدة ولعل أهمها استغلال النباتات ضمن حقل *Phytoremediation* . وتشمل المعالجات بالإضافة الى الفضلات الصناعية مياه الصرف الصحي وفضلات المدن . وتستهدف المعالجة الحيوية الى تدوير فضلات المصانع ومعالجة مصادر التلوث الأخرى سواء كانت معدنية او مواد عضوية مثل فضلات النفط (التي سيتم تناولها لاحقا) ، ولكن ازدهار هذه الفعاليات يكون متعلقا بشكل أساسي بالنواحي الاقتصادية ثم بعوامل أخرى . فالمعالجة الحيوية يجب ان لا تكون مكلفة جدا وان كان في بعض الاحيان يمكن غض الطرف عن الكلفة فيما اذا كانت مواد التلوث خطرة مثل الإشعاع . ومن التجارب السابقة لوحظ ان المعالجات الحيوية لم تكن بالمستوى الذي يطمح إليه وذلك لارتفاع كلفتها ، كما ان الاحياء التي استعملت وخاصة البكتيريا كانت من الأنواع التي تجمع كميات قليلة من الملوثات والمعادن . بالإضافة الى عدم ضمان ان الخلايا يمكن ان تطلق الملوثات ثانية والعودة الى نقطة الصفر ، خاصة وان اغلب آليات المقاومة التي درست تعتمد على عمليات الدفع الخارجي للجزيئات او الايونات لذلك فان استعمال الاحياء او البكتيريا المقاومة من النوع الذي يستعمل الدفع الخارجي يكون غير مجديا .

وتستعمل في المعالجات الحيوية الاحياء التي تقوم بعمليات التراكم الحيوي *Bioaccumulation* التي تقوم بها المراكمت الحيوية *Bioaccumulator* وهي التي تستطيع ان تجمع الايونات او المواد داخل الخلايا مثل النباتات او الاحياء المجهرية مثل البكتيريا والفطريات والخمائر والطحالب عند نموها في بيئات تكثر فيها المواد الملوثة سواء كانت معادن او غيرها والتي تستعملها كوسيلة دفاعية ضد سمية المواد ، ولكن بعض الاحيان تكون التراكيز قليلة وتستطيع الخلايا تجميعها بعملية النقل الفعال كما هو الحال مع بعض سلالات الجنس *Clostridium* التي تراكم ايون التتكنستن بمستوى يصل الى الآلاف المرات تركيزه في البيئة المحيطة .

لذلك فان المراكمت الحيوية تكون ثنائية الغرض ، الأول للتخلص من الايونات السامة في البيئة والثاني يمكن ان تستخدم المراكمت الحيوية لاستخلاص المعادن منها خاصة عندما تكون الأخيرة بتركيز واطنة كما يحصل في استعمال الطحالب في البيئات المائية . وتستغل الاحياء لصنع المجسات الحيوية لاستعمالها في الكشف عن التلوث المدمر .

والدراسات في هذا المجال تركز على البكتيريا وبالأخص انواع الجنس *Pseudomonas* وقد سبق تبين ان المعادن الثقيلة يكون البعض منها ضروريا للحياة ولكن بتركيز قليلة جدا وعند وجودها بتركيز عالية فان الاحياء تقبضها من المحيط وداخل الخلايا تكون الاحياء قد طورت وسائل للحد من ضررها منها :

- تقييد المعادن داخل أجزاء خاصة من الخلية مثل استعمال الفجوات في الخمائر .

• تحويل الايونات الى مركبات غير ذائبة مثل تحويلها الى كبريتيد او كاربيد او غيرها من المركبات .

لذلك تكون عملية قنص الايونات او المواد مع الربائط فعالة في ازالة سميتها وتكون هذه الوسيلة مهمة لفعاليات الاحياء المجهرية وكذلك لتنظيم Biogeochemistry للمعادن الثقيلة في الخلايا اضافة الى امكانية استغلالها في المعالجات الحيوية . ويكون تجميع الايونات في البكتريا معتمدا على الايون المعدني وكذلك نوع البكتريا ، فمثلا ايون النيكل Ni^{2+} يحصر في أجزاء معينة عند أطراف الخلايا العصوية او يتجمع عند الحدود الخارجية للبكتريا مثل *Ps. aeruginosa* وكذلك الحال مع ايون الكادميوم الذي يترك عند الحدود الخارجية بشكل حبيبات متماثلة بشكل طبقة مع ترك جزء منه في السائل الخلوي . اما اليورانيوم فيبقى في هذه البكتريا منتشرا في الساييتوبلازم . ويمكن للمعادن الأخرى تكوين ترسبات ذات أشكال هندسية معينة . وبصورة عامة فان البكتريا السالبة لصبغة كرام تجمع الايونات عند الحدود الخارجية وذلك يعود الى صفات الغشاء الخارجي والجدار الخلوي ذات الطبيعة الأيونية السالبة التي تساهم بها مجاميع الكربوكسيل والفوسفوريل وغيرها من مكونات الغشاء الخارجي والجدار الخلوي ، وعند تعريض البكتريا مثل *Ps. syringae* او *Ps. aeruginosa* او *E. coli* لتركيز عالية من ايونات النيكل او النحاس او الكادميوم فان اكبر تجمع يكون في الفسحة المحيطة اذ تصل المستويات تصل الى 60 % تليها الجدران الخلوية والأغشية الخارجية التي تجمع حوالي 30 % من الايونات ثم يأتي بعد ذلك الساييتوبلازم بالدرجة الاخيرة اذ يحوي على ما يقرب من 10 % . كما ان المعادن تتجمع على أشكال مختلفة فمثلا النيكل يتجمع على شكل فوسفيدات NiP_2 , Ni_5P_4 , $Ni_{12}P_5$ وكذلك على شكل كاربيد Ni_3C وهذا يشير الى تفاعله مع مجاميع Phosphoryl والكربوكسيل من مكونات الخلية لتكوين بلورات غير ذائبة . وفي احياء اخرى مثل *Alcaligenes eutrophus* فيتجمع النيكل على هيئة بلورات مع الهيدروكسيدات والكاربونات .

ويتجمع الرصاص في *Ps. aeruginosa* على شكل فوسفات الرصاص غير الذائبة . ويتجمع اليورانيوم على شكل فوسفات هيدروجينية بلورية الشكل كما في *Citrobacter* . وعندما يرتبط ايون المعدن مع احد المجاميع المذكورة فانه يعمل كنواة تسهل للمعدن تكوين معقدات اكثر ترسب حول النواة المتكونة ولذلك تنمو الترسبات بسرعة على حساب الايونات المعاكسة له مثل OH^- , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} وغيرها ، والمعادن تفضل ان ترتبط بربيطة معينة فمثلا النيكل يفضل ان يربط بالفوسفيد اكثر من الارتباط الى الكربوكسيل .

وإضافة الى ذلك فان بعض الاحياء تنتج البروتينات التي تخصص بربط بعض الايونات وتوجد في الفسحة المحيطة والغشاء الخارجي كما في ربط ايونات النحاس في *Ps. syringae* . ولذلك تعد

الخلايا الميكروبية بمثابة مازات حيوية Biosorbents يمكن ان تستعمل في امتزاز المعادن كما في حالة اليورانيوم عند استعمال خلايا *Ps. aeruginosa* وخميرة *S. cerevisiae*.

طرق المعالجة الحيوية

الطرق التقليدية لمعالجة التلوث في التربة تشمل نقل التربة Landfilling ولكن هذه الطريقة تكون مكلفة ولا تتلائم مع تشريعات منظمة حماية البيئة EPA التي تحتم معاملة الفضلات قبل وصولها المواقع النهائية لها . لذلك اتجهت المعاملات الى استعمال الاحياء لمعالجة تلوث التربة في مواقعها *In situ bioremediation*.

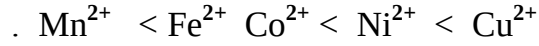
وقد استخدمت المعالجات الحيوية الميكروبية لمعالجة فضلات مياه الصناعة ومياه الصرف الصحي ومياه التعدين باستغلال التداخلات الحاصلة بين الاحياء المجهرية والمعادن لغرض تركيز الاخيرة وفصلها من تيارات المياه ، وأثناء المعاملات تقوم الاحياء بالتخليص من الملوثات بإحدى الآليات الآتية :

- ربط المعادن على سطوح الخلايا .
- نقل المعادن الى داخل الخلية واحتجازها .
- تطاير المعادن نتيجة لعمليات التحول الحيوي التي تجري عليها .
- تكوين ترسبات خارج الخلايا نتيجة التفاعلات بين المعادن ومكوثرات تفرز الى خارج الخلايا
- تكوين ترسبات بواسطة المركبات السالبة التي تفرزها الخلايا مثل الكبريتيد والفوسفات وغيرها .

معالجة الترب الملوثة

يشكل تلوث التربة مشكلة معقدة وذلك لوضعها الخاص لان التربة والمواد العضوية تحدد كمية المعادن الممتزة وذلك بـ

- حصول تبادل الايونات الموجبة .
 - تكوين معقدات مع الربائط الموجودة في التربة .
 - تكوين معقدات مع المواد العضوية في التربة .
- وارتباط المعادن بهذه الآليات يحد من جاهزيتها للإزالة بعمليات الغسل بالماء . والمشكلة الاخرى ان للتربة انتقائية للمعادن التي ترتبط بها وتكون هذه معتمدة على :
- نصف قطر الايون وبذلك فان الامتزاز لبعض العناصر يكون بالترتيب $Zn^{2+} < Cd^{2+} < Hg^{2+}$.
 - الاعتماد على توزيع الالكترونات وبذلك يكون ترتيب بعض الايونات



إزالة معدن معين يختلف وفق المواصفات المذكورة . ويلاحظ ان عملية غسل التربة بالماء لإزالة المعادن يتأثر بعوامل منها :

- o نسجة التربة .
- o تركيب التربة .
- o محتوى التربة من المواد العضوية

كل هذه العوامل أدت الى تطوير شبكات معقدة من مسامية التربة ، فمسامية التربة تختلف في الحجم من اقل من 2 مايكرو متر الذي يمثل حجم البكتريا تقريبا الى 0.2 ملم في القطر . فالثقوب الصغيرة تعمل كمرشحات لجزيئات المعادن المرتبطة للاحياء المجهرية وكذلك فقدان المواد الغروية الحاوية على المعادن وبذا تمنع انتقال المعادن خلال التربة . كما ان حركة المعادن تعاق عند دخول المعادن في المناطق الثابتة Immobilized zone التي تتكون في الترب ذات المسامية الصغيرة ووجود المعادن في هذه المناطق غير المتحركة يؤدي الى إبطاء وإطالة عملية الغسل اللازمة لإزالة المعادن .

استعمال المشتتات الحيوية Biosurfactants في معالجة التربة

من الطرق الحيوية لإزالة المعادن من التربة هو استعمال المشتتات الميكروبية ، اذ لها تأثير كبير لإزالة المعادن الثقيلة من التربة وذلك بالتأثير على الصعوبة التي تواجه إزالة المعادن وهي عملية الامتزاز وانتقال الكتلة المحدد وبالتالي مقاومة عملية النقل الى الطور المائي . والمشتتات الحيوية تنتج من قبل النباتات والحيوانات وأنواع مختلفة من الاحياء المجهرية . ويفضل استعمال المشتتات الحيوية لمعالجة تلوث التربة لأنها :

- o قليلة الكلفة .
- o قابلة للتحلل الحيوي .
- o يمكن إنتاجها في مواقع التلوث .

والطبيعة الكيماوية للمشتتات هي جزيئات هجينة او امفوتيرية تتكون من جزء لا قطبي وجزء ايوني قطبي . وتؤدي في المحاليل المائية الى تقليل الشد السطحي بتجمعها عند تلاقي السطوح مؤدية الى تكوين المستحلبات بين السوائل ذات القطبية المختلفة . وعندما تكون بتركيز واطئة تكون بشكل جزيئات مستقلة ، وعند زيادة تراكيزها الى الحد الحرج Critical micelle concentration (CMC) لا تقوم بعملها ، فعند تركيز CMC فانها تكون بشكل فتيئات (Micelle) أي بشكل كريات صغيرة ، او بشكل حويصلات ثنائية الطبقة اعتمادا على تركيب المشتت والرقم الهيدروجيني للمحلول الذي يوجد فيه ، والفتيئات تكون اصغر من الحويصلات وأقطارها اقل من 5 نانومتر وتتكون

من طبقة واحدة والجزء القطبي الى الخارج باتجاه المحلول المائي ، والجزء الكاره للماء الى الداخل أي مركز الفتية . اما الحويصلات فتكون اكبر ويصل قطرها الى 10 – 500 نانومتر وتكون ثنائية الطبقة تشبه الأغشية الخلوية وتكون الطبقة القطبية الى الخارج في مواجهه الطور المائي والجزء اللاقطبي الى الداخل مدفون بين الطبقتين وبذا يكون داخل وخارج الحويصلة محب للماء .

والطبقات الثنائية يمكن ان توجد بشكل صفائح وهي التركيب الأساسي لمعظم المشتتات ، وصفحات الطبقات الثنائية غير محددة الحجم . فاذا كان المحلول على جانبي الصفيحة متماثل من حيث الصفات فان الطبقة الثنائية للمشتتات ستكون متشابهة . اما اذا كانت الطبقات عند تلاقي السطوح Interfaces مثل تلاقي الهواء مع الماء او تلاقي سائل مع سائل اخر فان الطبقات الثنائية تظهر صفات غير متماثلة . ويصل التركيز الحرج CMC للمشتتات الحيوية عامة الى 1 – 200 ملغم / لتر . ولها تراكيب كيميائية مختلفة اعتمادا على الكائن المنتج ، وتصل أوزانها الجزيئية الى 300 – 1500 . ما عدا بعض الاستثناءات مثل المنتجة من *Pseudomonas* النامية على Hexadecane فتنجح مشتتات يصل وزنها الجزيئي الى 14300 وتحتوي على البروتينات .

وتستطيع المشتتات المستعملة ان تزيل المواد الكيميائية ومنها المعادن ، ولكنها تكون أكفاء في إزالة التلوث بالمواد العضوية . وإضافة الى ذلك تشجع المشتتات عملية فك الامتزاز للمعادن الثقيلة من الطور الصلب أي من حبيبات التربة وتحريكها الى الطور السائل وذلك بعمل معقدات مع الايونات الحرة في الطور السائل مما يؤدي الى انفكك المرتبطة لتنتقل الى السائل . ويمكن ان يؤدي تجمع المشتتات عند التقاء الأطوار المختلفة الى جعلها في ملاسة مباشرة مع المعادن الممتازة على حبيبات التربة وسحبها وتعتمد هذه الفعالية على الشحنات المحمولة على المشتتات ومدى مزاحمة الموجب منها على الشحنات السالبة على سطح الطين مع ايونات المعادن موجبة الشحنة .

النفط

النفط او البترول او غيره من التسميات تعرف على انها خليط من الهيدروكربونات ومركبات عضوية معدنية -Organometallo- والأخيرة أكثرها مركبات الفناديوم والنيكل . وعلاقة الاحياء المجهرية مع النفط تتخذ عدة أوجه ، منها ما يصب في صالح الصناعة النفطية من ناحية الاستخلاص والتكرير الكفؤ ، والخط الثاني استعمال الاحياء المجهرية لمعالجة التلوث بهذا المنتج المهم كمصدر للطاقة . وتعد مركبات النفط من المركبات العصبية للتحلل الميكروبي في الأنظمة البيئية لطبيعتها الكارهة للماء وقلة تطايرها ولذا تعد ذات تهديد كبير للبيئة حتى عند العناية بصناعة النفط بكافة خطواتها وذلك لان حرقه واستعماله يؤدي الى تلوث البيئة .

ومن جهة ثانية فان النفط من نوع الطاقة الحفرية المعرضة للنفاذ في وقت ليس بالبعيد لذلك يهتم المعنيون بإيجاد بدائل للطاقة . ولكن على ارض الواقع فان النفط بحالته الحاضرة يشكل إحدى مشاكل

البيئة التي أدت الى كوارث بيئية من حوادث ناقلات النفط العملاقة وتلويثها لمياه البحار والمحيطات ، إضافة الى فضلات التصنيع والتكرير وثلاثة الأثافي نواتج حرقه واستعماله خاصة الوقود الحاوي على الكبريت التي تقدم التلوث طواعية للبيئة المنكوبة .

يستخرج النفط من مخازن على طول وعرض العالم ومكوناته مختلفة التركيب ومختلفة الصفات الفيزيائية ، ويحوي على مركبات مستقيمة السلسلة وأخرى متفرعة ويحوي على مركبات حلقية وغيرها من المركبات المعقدة . ويستطيع عدد من الاحياء المجهرية استخدام مركبات النفط للنمو أي استخدامه مصدرا للكربون والطاقة . ومركبات النفط عند استخدامها تدعم نمو جيد للاحياء وذلك لانها مركبات مختزلة جدا ، وعند نمو الاحياء عليه تؤدي الى تغيير صفاته الفيزيائية والكيميائية ، وبصورة عامة فان الاحياء المستهلكة لمركبات النفط لها ميزات عامة التي تؤخذ بنظر الاعتبار عند الاختيار ومنها :

• ان تكون مقاومة للمذيبات العضوية .

• ان تكون محبة للحرارة وأنزيماتها ثابتة بالحرارة .

• ان تتحمل تراكيز واطئة من الأوكسجين .

ومثل هذه الاحياء استعملت في معالجة التلوث النفطي ضمن برامج التحول الحيوي Biotransformation لتحويل مركباته المؤذية والتي اغلبها مواد مسرطنة ، او يستهدف استعمالها ضمن عمليات التفكك الحيوي للوصول الى عناصره الاولى من الكربون والهيدروجين ، او ضمن برامج المعالجة الحيوية التي تنتشع فروعها ثم تجتمع في النهاية لتصب في مجال التخلص من التلوث ، ويمكن ان تضم كل هذه الحقول والفعاليات في عنوان كبير هو علم احياء النفط المجهرية ، Petroleum Microbiology .

وتركز الدراسات القديمة والحديثة على البحث عن الاحياء المفككة لمركبات النفط ومحاولة تحسين صفاتها بعمليات الهندسة الوراثية ، وتطوير وسائل للكشف عن النفط وكذلك الكشف عن ملوثاته ، وتحديد المواد الغذائية الملائمة لزيادة معدل تفكيك النفط ، ودراسة العوامل الاخرى المؤثرة مثل الحرارة والأوكسجين والملوحة والضغط والحالة الفيزيائية للمواد المراد تفكيكها .

وتنتشر الاحياء المفككة او التي تتعامل مع النفط في البيئات التي يوجد فيها النفط وتكون بشكل خليط أمكن الكشف عنها بطرق الزراعة ، وهي تشمل احياء هوائية ولاهوائية وغيرها من المواصفات والتي تعيش بتناغم مع بعضها ويكمل احدها عمل الاخرى . ومن الاحياء او البكتيريا التي عزلت هي محبات للحرارة والمحبة لحرارة متوسطة وبكتيريا مختزلة للكبريت واخرى مختزلة للحديد وبكتيريا مولدة للميثان وغيرها من المجاميع .

وبعد توفير الاحياء المطلوبة ومعرفة أبعاد تأثيراتها ستكون الفرصة سانحة لاستعمالها في المعالجات الحيوية باستعمال طرق مختلفة مثل المعاملة الموقعية كما في استعمال معالجة الاراضي الرطبة ، او استعمال طرق الترشيح الحيوي ، او استعمال الطرق التي تؤدي الى تطاير مركبات النفط . إضافة الى ان توفر المعلومات سيساعد في تحسين استخلاص النفط مثل استعمال المواد التي تقلل الشد السطحي ، وكذلك تحسين نوعية الوقود الناتجة من تكرير النفط وذلك بإزالة مركبات الكبريت والنتروجين وتحسين إنتاج المواد الكيماوية من النفط وتحسين معاملة فضلات صناعة النفط سواء في البيئات المائية او التربة .

واستخلاص النفط وخاصة الثقيل وتسهيل عمليات الاستخلاص باستعمال الاحياء المجهرية استعمل لأول مرة في عشرينات القرن الماضي ولكن ازدهر استعماله وزاد الاهتمام به في الثمانينات ، والنفوط الثقيلة تمتاز باحتوائها على تراكيز عالية من النيكل والفناديوم . وتمتاز الاحياء المجهرية المستعملة باحتوائها على إنزيمات Cytochrome C reductase , Chloroperoxidase التي تلعب دورا مهما في ازالة المعادن من النفط .

وتستطيع الاحياء المجهرية استهلاك مركبات النفط بأنماط مختلفة من الايض ولكل من أنواع المركبات ومنها :

الايض الهوائي للـ Alkanes

العديد من الاحياء المجهرية لها القابلية على استهلاك المركبات المختلفة للنفط بصفتها مصادر للكربون والطاقة ، وبعض السلالات تمتلك عددا من الجينات التي تشفر لعدد من الإنزيمات العاملة في عمليات التفكيك . وأكثر مسارات تفكيك النفط تكون جيناتها محمولة على البلازميدات مثل OCT plasmid الموجود في البكتريا *Gpo 1 Ps. putida* (والتي كانت تسمى سابقا *Ps. oleovorans* *Gpo 1*) . وتقوم الاحياء بتحويل مركبات النفط الى كحولات التي تحول الى الديهايدات ثم الى حوامض عضوية وصولا الى مرحلة الاكسدة - بتا (β - oxidation) والدخول الى دورة الحوامض ثلاثية الكربوكسيل TCA cycle . وتتم العمليات بواسطة مكونات مرتبطة بالاغشية وأخرى ذائبة في الساييتوبلازم ومنها Monooxygenases المرتبطة للغشاء الخلوي والمكونات الذائبة مثل Ruberdoxin وانزيم اختزال مركب النفط Alkanes الى كحول . والبلازميد يحوي على الاوبرون *alkBFGHJKL* الذي يشفر للإنزيمات اللازمة لتحويل Alkanes الى Acetyl - CoA . ويحوي الاوبرون على جين *alkN* الذي يعمل متحسسا من نوع MCPs في الانجذاب الكيماوي للمركبات . ويحوي الاوبرون أيضا على جينات منظمة *alkT* , *alkS* .

وتوجد بلازميدات اخرى في احياء اخرى مسئولة عن تفكيك مركبات النفط مثل pDEC الموجود في سلالات *Pseudomonas C12B* و Tol plasmid , pWWO الموجودة في

سلالات اخرى من الجنس نفسه . وقد لا تكون الجينات المسؤولة عن التفكيك في اوبرون واحد كما في البكتريا *Burkholderia cepacia* . كما انها تختلف في عمليات التنظيم ، فجينات التنظيم تعتمد على نوعية المادة النفطية فهناك جينات تحت بالمواد الصلبة التي يكون عدد ذرات الكربون يزيد عن 22 ذرة من الكربون . كما ان بعض الجينات تكون كروموسومية .

وهناك ظاهرة شائعة في الاحياء المفككة لمركبات النفط وهو وجود أكثر من إنزيم لأداء عمل واحد مثل انزيمات الاكسدة $\text{Fe} - \text{dioxxygenases}$, Cu-monooxygenases وهي تحفز بمركبات مختلفة من النفط . والانزيمات المؤكسدة Dioxxygenases تحتاج الى الأوكسجين الجزيئي لأكسدة مركبات مختلفة في النفط مثل $\text{C}_{12} - \text{C}_{20}$ (Alkenes) و $((\text{C}_{10} - \text{C}_{30})\text{n Alkanes})$ دون إنتاج جذور الأوكسجين .

الايض الهوائي للمركبات متعددة الحلقات : المركبات متعددة الحلقات Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) تعد من اخطر المواد وتبقى في البيئة لمدة طويلة ، البعض منها بسيط ويتكون من حلقات قليلة واخرى معقدة وتحوي على اكثر من 4 حلقات مثل Naphthalene وغيره . واكثر البكتريا والفطريات والطحالب والبكتريا المزرقة تستطيع استهلاك المركبات ذات ثلاث حلقات او اقل . اما المركبات التي تحوي على حلقات اكثر من 4 مثل النفثالين و Pyrene , Chrysene, Acenaphthene , Fluoranthene , Anthracene فتستطيع مجموعة قليلة من الاحياء استهلاكها ولكن هناك بعض المركبات المعقدة مثل Benzo[a] pyrene قد لا توجد احياء تفككها .

وعملية تفكيك المركبات متعددة الحلقات تكون صعبة لانها قليلة الذوبان في الماء ولها سعة امتزازية عالية ، كما ان تفكيكها يؤدي الى إنتاج مواد سامة ، وكذلك تظهر فيها ظاهرة الكبح بمواد الايض ، لذلك طورت الخلايا عملية الايض المرافق او المشترك Cometabolism لمعالجة الظواهر المذكورة . والجينات المسؤولة عن تفكيك المركبات الحلقية توجد على بلازميدات خاصة مثل بلازميد NAH7 الخاص بتفكيك النفثالين في البكتريا *Ps. putida* G7 ويحوي على الاوبرون *nahAaAbAcAdBFCEd* فيه الجينات اللازمة لتحويل النفثالين الى الساليسيلات Salicylate . والاوبرون الثاني *nahGTHINLOMKJ* يساهم في تحويل الناتج الأخير الى الديهايد وبايروفات . وتنظيم الاثنين يتم باوبرون ثالث يحوي على الجين *nahR* الذي يحث بالساليسيلات .

والانزيم Naphthalene dioxygenase واسع الانتشار يمكن ان يساعد في تفكيك عددا اخر من المركبات الحلقية مثل Phenathrene و Anthracene . وتوجد بلازميدات اخرى مثل *pah* , *ndo* , *dox* منتشرة في البكتريا التي تتعايش مع النفط ومركباته ، اضافة الى وجود جينات كروموسومية تساعد في فعاليات التفكيك ومنها المذكورة في الجدول (21)

جدول 21 : الجينات الكروموسومية والبلازميدية المسؤولة عن تفكيك الهيدروكربونات

البروتينات ووظيفتها	الجينات	موقع الجينات	البكتريا
Reductase	<i>nahAa</i>	بلازميد	<i>Pseudomonas putida</i> strains
Ferredoxin	<i>nahAb</i>		
Iron sulfur protein large subunit	<i>nahAc</i>		
Iron sulfur protein small subunit	<i>nahAd</i>		
<i>cis</i> -Naphthalene dihydrodiol dehydrogenase	<i>nahB</i>		
Salicylaldehyde dehydrogenase	<i>nahF</i>		
1,2-Dihydroxynaphthalene oxygenase	<i>nahC</i>		
2-Hydroxybenzalpyruvate aldolase	<i>nahE</i>		
2-Hydroxychromene-2-carboxylate isomerase	<i>nahD</i>		
Salicylate hydroxylase	<i>nahG</i>		
Chloroplast-type ferredoxin	<i>nahT</i>		
Catechol oxygenase	<i>nahH</i>		
2-Hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase	<i>nahI</i>		
2-Hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase	<i>nahN</i>		
2-Oxo-4-pentenoate hydratase	<i>nahL</i>		
4-Hydroxy-2-oxovalerate aldolase	<i>nahO</i>		
Acetaldehyde dehydrogenase	<i>nahM</i>		
4-Oxalocrotonate decarboxylase	<i>nahK</i>		
2-Hydroxymuconate tautomerase	<i>nahJ</i>		
Induced by salicylate	<i>nahR</i>		
Naphthalene-dioxygenase genes (these 3 genes correspond to NahAb,-c, and-d listed above)	<i>ndoA</i>	بلازميد	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB9816

	<i>ndoB</i>	بلازميد	<i>Pseudomonas</i> sp. strain C18
	<i>ndoC</i>		
Naphthalene dioxygenase	<i>doxA</i>		
DoxA, -B, -D correspond to NahAb, -c, and -d listed above	<i>doxB</i>		
	<i>doxD</i>		
cis-Naphthalene dihydrodiol dioxygenase	<i>doxE</i>		
Salicylaldehyde dehydrogenase	<i>doxF</i>		
1,2-Dihydroxynaphthalene dioxygenase	<i>doxG</i>		
Isomerase (interchangeable with <i>doxJ</i> ?)	<i>doxH</i>		
Hydratase-aldolase	<i>doxI</i>	بلازميد	<i>Pseudomonas</i> sp. strain U2
Isomerase	<i>doxJ</i>		
Ferredoxin reductase	<i>nagAa</i>		
Subunit of salicylate 5-hydroxylase with Rieske-type iron-sulfur centre	<i>nagG</i>		
Subunit of salicylate 5-hydroxylase	<i>nagH</i>		
Ferredoxin	<i>nagAb</i>		
Large dioxygenase subunit	<i>nagAc</i>		
Small dioxygenase subunit	<i>nagAd</i>		
Naphthalene cis-dihydrodiol dehydrogenase	<i>nagB</i>		
Salicylaldehyde dehydrogenase	<i>nagF</i>	بلازميد	<i>Burkholderia</i> sp. strain RP007 <i>Pseudomonas putida</i> OUS82
Regulatory	<i>phnR</i>		
Regulatory	<i>phnS</i>		
Aldehyde dehydrogenase	<i>phnF</i>		
Hydratase-aldolase	<i>phnE</i>		
Extradiol dioxygenase	<i>phnC</i>		
Isomerase	<i>phnD</i>		
Large dioxygenase subunit (Rieske-type [2Fe-2S])	<i>phnAc</i>		
Small dioxygenase subunit	<i>phnAd</i>		
Dihydrodiol dehydrogenase	<i>phnB</i>		

Ferredoxin reductase	<i>pahAa</i>	كروموسوم	
Ferridoxin	<i>pahAb</i>		
Large subunit of iron-sulfur protein	<i>pahAc</i>		
Small subunit of iron-sulfur protein	<i>pahAd</i>		
<i>cis</i> -Dihydrodiol dehydrogenase	<i>pahB</i>		
Dioxygenase	<i>pahC</i>		
Isomerase	<i>pahD</i>		
Hydratase-aldolase	<i>pahE</i>		
Dehydrogenase	<i>pahF</i>		
Salicylate 1-hydroxylase	<i>nahG</i>	كروموسوم	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AN10
Salicylate 1-hydroxylase	<i>nahW</i>		
Alpha subunit of dioxygenase	<i>phdA</i>	كروموسوم	<i>Nocardiodes</i> sp. strain KP7
Beta subunit of dioxygenase	<i>phdB</i>		
Ferredoxin	<i>phdC</i>		
Ferredoxin reductase	<i>phdD</i>		
2-Carboxybenzaldehyde dehydrogenase	<i>phdK</i>		
Naphthalene-inducible dioxygenase system	<i>nidA</i>	كروموسوم	<i>Rhodococcus</i> sp. strain 124
Dioxygenase small subunit	<i>nidB</i>		
<i>cis</i> -Dihydrodiol dehydrogenase	<i>nidC</i>		
Putative aldolase	<i>nidD</i>		
Aldehyde dehydrogenase	<i>nidD</i>	كروموسوم	<i>Mycobacterium</i> sp. strain PYR-1
Small subunit of dioxygenase	<i>nidB</i>		
Large subunit of dioxygenase	<i>nidA</i>		
	<i>pbhB</i>		
	<i>pbhC</i>		
	<i>pbhD</i>		

ويوضح الجدول الاختلافات في الجينات العديدة المسؤولة عن تفكيك المركبات الحلقية ، كما يتضح وجود انتقال أفقي للجينات والتي تشفر لإنزيمات متشابهة ، كما انها يمكن ان توجد على الكروموسومات او البلازميدات .

ان وجود عددا من المركبات الحلقية في تركيبة النفط والتي تكون مختلفة من حيث الوزن الجزيئي وعدد الحلقات يؤدي اما الى تأزر او تضاد في عمليات ايضها . والتثبيط ربما يعود الى التنافس على الانزيمات العاملة في الاكسدة او النقل الى داخل الخلايا او نتيجة تراكم نواتج الايض العرضية مما يؤدي الى حالة التسمم الخلوي وغلق عمليات حث الانزيمات .

الايض اللاهوائي للهيدروكربونات

تعد عمليات الايض اللاهوائي من العمليات المهمة في تفكيك الهيدروكربونات التي تكون فاعلة في المعالجات الحيوية للبيئة . وتتم عمليات الايض اللاهوائي على حساب عمليات اخرى مثل اختزال مركبات الحديد او اختزال الكبريتات وكذلك إزالة النتروجين من بعض المركبات . واغلبها تتم بواسطة البكتريا التي تقوم بعملية التخليق الضوئي غير المنتج للأوكسجين وكذلك الاحياء المولدة للميثان . ويمكن ان تعمل اكاسيد المنغيز كمستلمات نهائية للالكترونات ، وتستعمل البكتريا ايضا حوامض التربة الدبالية Soil humic acids والفيوميرات وغيرها من المركبات لتفكيك مركبات النفط كما موضح في الجدول (22)

جدول 22 : الاحياء اللاهوائية المحللة لهيدروكربونات النفط

المادة المتفككة	البكتريا
التولوين	البكتريا التي تقوم بالتخليق الضوئي <i>Blastochloris sulfovirdis</i>
بكتريا ازالة النترات	
Ethylbenzene	<i>Azoarcus</i> sp. strain EB1
التولوين <i>m</i> -xylene ,	<i>Azoarcus</i> sp. strain T
التولوين <i>m</i> -xylene ,	<i>Azoarcus tolulyticus</i> Td15
التولوين	<i>Azoarcus tolulyticus</i> To14
Benzene, التولوين	<i>Dechloromonas</i> sp. strain JJ
Benzene, التولوين	<i>Dechloromonas</i> sp. strain RCB
Naphthalene	<i>Pseudomonas</i> sp. NAP-3
Ethylbenzene, التولوين	السلالة EbN1
C14-C20 alkanes	السلالة HdN1
C6-C8 alkanes	السلالة HxN1
التولوين <i>m</i> -xylene ,	السلالة M3
التولوين <i>m</i> -xylene ,	السلالة mXyN1

C8–C12 alkanes	السلالة OcN1
Ethylbenzene, propylbenzene	السلالة PbN1
<i>p</i> -ethyltoluene, <i>p</i> -Cymene,	السلالة pCyN1
<i>p</i> -Cymene	السلالة pCyN2
التولوين	السلالة T3
التولوين	السلالة ToN1
التولوين	<i>Thauera aromatica</i> K172
التولوين	<i>Thauera aromatica</i> T1
Naphthalene	<i>Vibrio</i> sp. strain NAP-4
البكتريا المختزلة للحديد	
التولوين	<i>Geobacter grbiciae</i> TACP-2T
التولوين	<i>Geobacter grbiciae</i> TACP-5
التولوين	<i>Geobacter metallireducens</i> GS15
البكتريا المختزلة للكبريتات	
التولوين	<i>Desulfobacula toluolica</i> To12
التولوين	<i>Desulfobacterium cetonicum</i>
C13–C18 alkanes	السلالة AK-01
C12–C20 alkanes, 1-hexadecene	السلالة Hxd3
التولوين, <i>m</i> -xylene, <i>m</i> -ethyltoluene,	السلالة mXyS1
<i>m</i> -cymene	السلالة NaphS2
Naphthalene	السلالة oXyS1
التولوين, <i>o</i> -xylene, <i>o</i> -ethyltoluene	السلالة Pnd3
C14–C17 alkanes, 1-hexadecene	السلالة PRTOL1
التولوين	السلالة TD3
C6–C16 alkanes	

ويلاحظ من الجدول انه لا توجد فطريات مدروسة في هذا المجال لان النمط العام لا يرض الفطريات هو ايض هوائي ، كما ان اكثر الدراسات تركز على التولوين ، وتوجد اختلافات كبيرة في العمليات الايضية التي تقوم بها البكتريا تحت الظروف اللاهوائية ، ولكن اهم المركبات الوسيطة التي تنتج هي Benzyl – CoA عند تفكيك المركبات الحلقية .

إجهاد الهيدروكربونات على الخلايا

تعاني الخلايا التي تتعرض للهيدروكربونات الى اجهادات كبيرة اضطررتها الى تطوير آليات تجنبها للتأثيرات السامة للمركبات الموجودة في البيئة المباشرة التي توجد فيها ، وكذلك تمكنها من الوصول الى المركبات غير الذائبة وإدخالها الى الخلايا كي تستفيد منها كمصادر للعناصر التي تعيش عليها . ومن هذه الآليات :

التغيرات في الأغشية الخلوية

تبين مما مر سابقا ان الطبقة الكارهة للماء في الأغشية الخلوية تقع الى الداخل من الغشاء الخلوي ثنائي الطبقة ، اضافة الى ان البكتريا السالبة لصبغة كرام تحوي على طبقة كارهة للماء اخرى في الغشاء الخارجي ، ولذلك فان الهيدروكربونات المحبة للدهون والكارهة للماء يمكن ان تحتجز بسهولة داخل الاغشية الخلوية مسببة التسمم كما هو الحال مع المواد المشابهة مثل بعض المضادات الميكروبية وغيرها من المواد المحبة للدهون . وتميل الهيدروكربونات الى الاستقرار في المنطقة الكارهة للماء بين Acyl chains للدهون الفوسفاتية ، وعملية الانحشار تؤدي الى تغيير ميوعة الاغشية وكذلك تؤثر على التوزيع الفراغي للبروتينات الموجودة في الاغشية وبالتالي اضطراب الغشاء الخلوي والذي يتبعه اضطراب وظائف مكونات الغشاء من الانزيمات المرتبطة به وأنظمة إنتاج الطاقة على وجه الخصوص .

ولذلك ونتيجة لهذا الإجهاد تكون الأحياء الأغشية الحيوية Biofilms ، او تقوم الخلايا بتغيير كراهية سطوحها للماء لتعمل على تنظيم احتجاز الهيدروكربونات . وفي البكتريا السالبة لصبغة كرام تستفاد الخلايا من مكونات الغشاء الخارجي وهي LPS المحبة للماء في مقاومة انتقال الجزيئات المحبة للدهون اليها . وتنشط الخلايا عمليات واليات الإصلاح المعتمدة على الطاقة لتعويض ما يفقد نتيجة احتجاز الهيدروكربونات في الاغشية الخلوية وبالتالي المحافظة قدر الإمكان على سلامة أغشيتها .

ومن آليات توفير الحماية تقوم الخلايا بزيادة نسبة النظير Trans الى النظير Cis في الحوامض الدهنية للدهون الفوسفاتية بعملية المزامرة للحوامض الدهنية الحاوية على اصرة مزدوجة واحدة ، وكذلك تقلل من نسبة الحوامض الدهنية غير المشبعة . وتقوم الخلايا ايضا بتغيير المجاميع الرأسية في الدهون الفوسفاتية . كل هذه التغيرات تكون في النهاية مصاحبة لزيادة الدهون الفوسفاتية في الاغشية كما في حالة البكتريا التي تعاني من اجهادات المذيبات ، والتغيرات الحاصلة في النهاية تؤدي الى وجود حواجز فيزيائية امام انحشار الهيدروكربونات في الاغشية الخلوية ، وبذلك تعيق دخولها وممارسة تأثيرها السام الذي يحتاج ان تكون المركبات داخل الخلية .

آلية التحمل : يمكن ان تظهر الخلايا تحملا للهيدروكربونات بأكثر من وسيلة ، البعض منها سريعة تحصل في دقيقة وأخرى بطيئة تحصل بعد مرور 15 – 20 دقيقة ، ويمكن ان تعمل الاثنين عند تعرض الخلايا للهيدروكربونات فبعض سلالات *Ps. putida* يمكن ان تتحمل وجود التولوين بتركيز 90 % (حجم / حجم) والاستجابات التي تحصل :

• التغيرات السريعة تنتج عن طريق مزامرة النظائر فتزداد نسبة النظير Trans الى النظير Cis والجين *cti* مسئول عن مزامرة بعض الحوامض الدهنية المؤسفرة ، والانزيم الذي ينتجه المسئول عن المزامرة من الانزيمات الغشائية .

• ومن الاستجابات البطيئة هي التي تحدث تغيير في الدهون الفوسفاتية اذ تقلل الخلايا من Phosphatidylethanolamine في المجاميع الرأسية القطبية للدهون الفوسفاتية وتزيد من مستويات Cardiolipids وذلك لزيادة صلابة الأغشية .

• عمليات الدفع الخارجي للمركبات وتكون الخلايا المدربة الافضل في الاستعمال وتتم العمليات بواسطة مضخات خاصة فعالة في ضخ الهيدروكربونات وكذلك المذيبات ومثل هذه توجد في *Ps. putida* ، اما البكتريا *Ps. aeruginosa* فتوجد فيها ثلاث انواع من مضخات RND المستعملة لضخ المضادات الحيوية الى الخارج وتستعمل بعضها في ضخ الهيدروكربونات والمذيبات ، وفي هذه البكتريا المهمة (*Pseudomonas*) يمكن تقسيم مضخاتها بصورة عامة الى :

0 مضخات المذيبات العضوية .

0 مضخات المضادات الحيوية .

0 مضخات تضخ الاثنين .

الاحياء المستهلكة للهيدروكربونات

هناك العديد من الاحياء المجهرية التي يمكن ان تستهلك النفط الخام او المركبات المشتقة منه مثل المركبات متعددة الحلقات والمركبات الفينولية والمركبات الفينولية الحاوية على الكلور وغيرها . وهذه عادة توجد في البيئات التي تكثر فيها المواد المعنوية أي انها من الفلورا الطبيعية ومعرفة الاحياء وتشخيصها يكون ضروريا لتطوير أنظمة المعالجة الحيوية ، والأحياء المحللة يجب ان تكون بلامسة المواد ، وهذا يمكن ان يتم بأكثر من طريقة ومنها :

0 يمكن ان تذاب الهيدروكربونات بمواد تقلل من الشد السطحي التي تنتجها الاحياء مثل المشتقات الحيوية .

0 اقتناص الهيدروكربونات في أجسام دهنية .

وبعض الهيدروكربونات تنتقل الى الخلايا بواسطة الانتشار البسيط نظرا لانها تذوب وذلك لكونها محبة للدهون ، ولكن هناك بعض الهيدروكربونات تدخل الخلايا بالنقل الفعال في بعض السلالات البكتيرية ، وعمليات قبط الهيدروكربونات تكون مسؤولية بعض الجينات الخاصة .

المعالجات الحيوية للنفط

للمعالجة توجيه الأول إزالة الهيدروكربونات ، والثاني تحسين نوعية الوقود المنتج . ومن هذه الفعاليات :

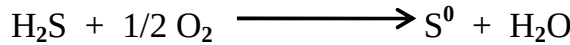
إزالة الكبريت : يعد الكبريت من العناصر المهمة الموجودة في النفط وقد تصل نسبته الى 0.5 - 5 % ، ويمكن ان يرتفع الى 14 % في بعض أنواع النفط الثقيلة . واغلبه يكون بشكل مركبات عضوية مثل Thiophenes المركزة . وفي عمليات التكرير العادية تستعمل الطرق الكيماوية لإزالته بعملية Hydrodesulfurization وتكون العمليات مكلفة ، وبقاء الكبريت في الوقود المكرر يؤدي الى تلوث البيئة وخاصة الجوية نتيجة لتكوين اكاسيد الكبريت وتكون السبب في الأمطار الحامضية خاصة في الدول الصناعية . لذلك اقترحت إزالة الكبريت حيويًا Biodesulfurization وذلك بالاعتماد على قابلية الاحياء على مهاجمة الأواصر C-S بدون التأثير على الأواصر C-C وتفكيك مكونات الوقود .

وتوجد احياء لها القابلية على ازالة الكبريت من مركبات Dibenzoithiophene (DBT) دون التأثير على التركيب الحلقي للكاربون ، وهذه الأجناس تستعمل المركبات كمصدر وحيد للكبريت والصفة تساعد في عزلها ومنها *Rhodococcus erythropolis* ، وهناك احياء هوائية يمكن ان تزيل الكبريت منها سلالات تعود للأجناس *Xanthomonas* ، *Gordona* ، *Klebsiella* ، *Agrobacterium* ، *Nocardia* ، *Mycobacterium* والبكتريا المحبة للحرارة *Paenibacillus* . وتستطيع هذه السلالات وبسلسلة من التفاعلات إطلاق الكبريت اللاعضوي ، وتشمل التفاعلات او المسارات اشتراك إنزيمات *Desulfinas* ، *Monooxygenases* ، والمركب النهائي العام من المركبات الحاوية على الكبريت هو 2-hydroxyl biphenyl (HBP) والذي يبقى في الطور الزيتي الذي لا يفقد قابليته كوقود . ونظرا لتعرض عمليات إزالة الكبريت الهوائية للانفجار لذلك يتم اللجوء الى العمليات اللاهوائية

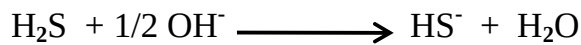
وتصل قابلية *Rhodococcus* الى إنتاج HBP بمعدل 1 - 5 ملغم / غم وزن الخلايا الجاف / ساعة ، وهذا يعني تحويل 55 - 75 % من المركب DBT الى HBP في مدة ساعة . وقد تم هندسة بعض سلالات البكتريا لزيادة مدى مواد الأساس التي تعمل عليها ، كما يمكن زيادة قابلية الاحياء بتغير نسب الزيت الى الماء وذلك بإضافة المشتتات الحيوية .

وتعد عملية تصميم المفاعلات الحيوية من الخطوات الرئيسة لإنجاح العملية وفصل النواتج لذلك تستعمل مخمرات او مفاعلات متعددة المراحل مخلوطة بالهواء Multistage air lift bioreactors لتقليل الكلفة وزيادة نسبة الإزالة .

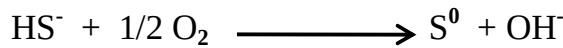
ومن جهة ثانية يلاحظ ان الفضلات الناتجة من تكرير النفط تحوي على كميات كبيرة من كبريتيد الهيدروجين H_2S واكاسيد الكبريت SO_x سواء في الفضلات السائلة او الغازية . ولذلك يتم معاملة هذه الفضلات بالأحياء المجهرية لإصابة غرضين ، الأول التخلص من الملوثات والثاني الحصول على عنصر الكبريت . وتعتمد عملية الحصول على الكبريت من الفضلات الحاوية على كبريتيد الهيدروجين على التفاعل الآتي :



وعملية إزالة الكبريت حيويًا تشمل بداية غسل التيار الحاوي على الغاز بمحلول مائي وحدوث التفاعل



وتقوم بعدها البكتريا المؤكسدة للكبريت مثل *Thiovibrio* و *Thioalcalobacteria* بتحويل الكبريتيدات الى عنصر الكبريت



بوجود مستقبل لالكترونات وعند رقم هيدروجيني متعادل ترسب البكتريا الكبريت خارج الخلايا الذي يفصل باستعمال أجهزة خاصة ، ويستفاد من الماء في إعادة العملية . وفي المفاعلات الحيوية المسيطر فيها على الأرقام الهيدروجينية والحرارة يتم تحويل 96 % من كبريتيد الهيدروجين الى عنصر الكبريت .

وتستغل البكتريا أعلاه لاستخلاص الكبريت وكذلك المساعدة في استخلاص النفط ، اذ تضخ مياه البحر الحاوية على الكبريتات الى خزانات النفط مما يساعد على نمو البكتريا المختزلة للكبريتات وزيادة انتاج H_2S حيويًا ضمن عملية تحميض الخزانات *Reservoir souring* ، ثم تستعمل البكتريا اعلاه كبريتيد الهيدروجين لانتاج عنصر الكبريت . وهذه العملية مهمة في الصناعات النفطية لان كبريتيد الهيدروجين من المواد الأكلية ، كما ان زيادة الكبريت ومركباته في البئر يمكن ان يؤدي الى غلقه .

ويمكن معالجة الكبريت ومركباته في آبار النفط بطرق أخرى وهي إضافة النترات الى الماء الذي يضخ في البئر مما يحفز البكتريا المنافسة وهي المختزلة للنترات وتؤدي الى انتاج النتريت NO_2^- الذي يثبط البكتريا المختزلة للكبريتات (والتي تكون الكبريتيدات المسببة للمشاكل) ، ولكن البكتريا المختزلة للكبريتات يمكن ان تتجاوز هذه المشكلة في حالة احتوائها على إنزيم اختزال النتريت NO_2^- reductase وتحويله الى أمونيا ، ولذا يعد الإنزيم عامل المقاومة الذي يحد من عمليات تثبيط اختزال الكبريتات بواسطة النتريت . لذلك لابد من إيجاد عمليات موازنة بين الأحياء لغرض التوصل الى توازن في آبار النفط وإنتاج مواد وقود خالية من الكبريت قدر الإمكان .

إزالة مركبات النتروجين من النفط

يحتوي النفط الخام على مركبات النتروجين تصل الى 0.5 – 2 % وهي بشكل رئيس Pyrroles ومركبات Carbazole والاندولات . وأهمها مركبات الكربازول اذ يعد من المواد المطفرة والمسرطنة وكذلك من المثبطات القوية لعمليات إزالة الكبريت الحيوية ، كما انها تساهم في تكوين ملوثات الهواء من اكاسيد النتريك . وتزال المركبات من النفط بالطرق الكيماوية الرطبة تحت درجة حرارة وضغط عاليين .

وتوجد العديد من السلالات يمكنها استهلاك الاندول و Carbazole . Quinoline , Pyridine ومشتقات Alkyl ومنها Serratia , Alcaligenes , Bacillus , Beijerinckia , Burkholderia , Comamonas , Mycobacterium , Xanthomonas , Pseudomonas وتظهر الأحياء تشابها في المسارات التي تسلكها لغرض تحويل المركبات الحلقية ، وتلعب إنزيمات Oxygenases الدور الأساسي في المراحل الأولى من مهاجمة وتحويل المركبات النتروجينية .

تحسين إنتاج النفط

هناك أكثر من وسيلة من الوسائل الحيوية للمساعدة في تحسين إنتاج النفط منها :

● **استعمال الاحياء المجهرية** وأهمها البكتريا اذ تعد هي وأنزيماتها المرشح الأول لتحسين عمليات الإنتاج وتحسين نوعية النفط المنتج ، وذلك لان الفطريات والطحالب والابتدائيات لا تسعف في هذه العمليات لأنها كبيرة الحجم وقليلة القابلية على النمو تحت ظروف متطرفة ، فبعض الآبار يرتفع فيها تركيز كلوريد الصوديوم الى 8 % . كما تتطرف الظروف الأخرى في الآبار لتصل درجة الحرارة الى 70 – 90 °م لذلك يمكن استعمال الأنواع المحبة للحرارة وخصوصا الاركيا المحبة لحرارة متطرفة التي تكون مثالية لهذه العمليات لان البعض منها ينمو بحرارة مثالية 80 – 110 °م ، والبعض منها يعيش تحت ضغط 2000 – 2500 باوند / انج² وعليه تكون البكتريا والاركيا وهي احياء صغيرة الحجم ملائمة لتحمل الضغوط العالية ، والعديد من البكتريا والاركيا تكون لا هوائية لذلك تلاؤم الظروف الموجودة في قعر البئر . إضافة الى ان للبكتريا إمكانيات النمو بشكل ملائم للظروف في آبار النفط مثل البكتريا *B. licheniformis* يمكن ان تنتج كتلة حيوية بشكل خاص تسمى الكتلة التجارية التي تؤدي الى غلق المسامات في البئر مما يساعد في زيادة الاستخلاص .

ومن الأحياء بدائية النواة المشمولة الاحياء التي تعيش بنمط تغذية ذاتية على الكبريت او الهيدروجين وثنائي اوكسيد الكربون بطريقة توليد الميثان . وتوجد أنواع متباينة التغذية التي تنمو على المواد العضوية وتحصل على الطاقة من تنفس الكبريتات او التخمر اللاهوائي . كما ان العديد

من البكتيريا تنتج المشتتات الحيوية والمكوثرات الخارجية التي تساهم في استخلاص النفط الخام ، إضافة الى إمكانيات أخرى يمكن ملاحظتها من الجدول (23)

جدول 23 : المنتجات الميكروبية المختلفة المستعملة في استخلاص واسترجاع النفط

المادة المنتجة	الكائن المنتج	استعمال المادة
كتلة حيوية	<i>Bacillus licheniformis</i>	- عمليات غلق خاصة في البئر - تقليل اللزوجة - تفكيك النفط
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	<i>Xanthomonas campestris</i>	
مشتتات حيوية	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	- استحلاب - تقليل الشد السطحي عند تلاقي الاطوار - تقليل اللزوجة
	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	
	<i>Corynebacterium fasciens</i>	
	<i>Pseudomonas rubescens</i>	
مكوثرات حيوية	<i>Bacillus polymyxa</i>	السيطرة على حركة الاطوار السائلة
	<i>Brevibacterium viscogenes</i>	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	<i>Xanthomonas campestris</i>	
مذيبات	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	- اذابة النفط - تقليل اللزوجة
	<i>Clostridium pasteurianum</i>	
	<i>Zymomonas mobilis</i>	
حوامض عضوية	<i>Clostridium spp.</i>	الاستحلاب ووظائف أخرى
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	
غازات CO ₂ ,CH ₄ ,H ₂	<i>Clostridium</i>	زيادة الضغط

• تقليل الشد السطحي • عند تلاقي الاطوار • تقليل اللزوجة	<i>acetobutylicum</i>	
	<i>Clostridium</i>	
	<i>acetobutylicum</i>	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	
	<i>Methanobacterium</i> sp.	

• استعمال الإنزيمات

يمكن استعمال عدد من الإنزيمات في الصناعات النفطية وذلك لان الإنزيمات تتميز بتخصص عالي Stereospecificity , Regiospecificity لإنتاج مركبات نقية ، كذلك يمكن للبعض منها العمل في أطوار لا مائية والذي يزيد من مدى مواد الأساس التي تعمل عليها وخاصة مركبات النفط الكارهة للماء . كل هذه الأسباب شجعت استعمالها في صناعات النفط .

ومن الإنزيمات المستعملة Cyt.P₄₅₀ - dependent monooxygenases , Dioxygenases , Lipooxygenases وإنزيمات تحليل البيروكسيد . ومن الأمثلة NDO) Naphthalene dioxygenase (يمكن ان يشارك في العديد من عمليات الأكسدة ونظرا لوسع مدى مواد الأساس التي يعمل عليها فهو يستعمل في إنتاج Chiral petrochemicals وهي طلائع لإنتاج مواد ذات فعالية حيوية .

وتساعد هندسة البروتينات وتوفر إمكانيات تحويل الإنزيمات لجعلها ملائمة للعمل تحت ظروف مختلفة خاصة بالنسبة للإنزيمات التي تفرز الى خارج الخلايا مما شجع على إدخالها الى الصناعات النفطية ، اذ ان اجراء التغييرات الهندسية عليها ترمي الى إضفاء الثباتية الحرارية وتحويل مدى تخصصها للمواد التي تعمل عليها وذلك اما باستبدال وحدة إنزيمية فرعية او إزالتها او التلاعب بالحوامض الامينية في المواقع الفعالة للإنزيمات لزيادة سرعة التفاعلات خاصة وان التفاعلات الإنزيمية في الأوساط اللامائية تكون بطيئة مقارنة بالأوساط المائية وهو ما حد من استعمالها في الصناعات المعتمدة على المواد الكارهة للماء (الهيدروكربونات) .

• المشتتات والمكوثرت الحيوية

قد تم مناقشة بعض أوجه الموضوع سابقا ولكن هناك بعض الموصفات لهذه المواد التي يجب ان تتصف بها لتلائم الصناعات النفطية ومنها :

- ان تكون ذات ثباتية عالية لقوى القص .

- هـ ان تكون محاليلها ذات لزوجة عالية ، وان تكون اللزوجة ثابتة على مدى واسع من الأرقام الهيدروجينية والحرارة والضغط .
 - هـ ان تكون مقاومة لعمليات التحلل الحيوي التي تحصل في بيئة البئر .
- واهم المستحلبات او المشتتات الحيوية التي تنتجها الإحياء المستعملة في مجالات الصناعات النفطية موضح بعضها في الجدول (24)

جدول 24 : اهم المشتتات الحيوية المستعملة في الصناعات النفطية

المشتت الحيوي	الاحياء المنتجة
واطئة الوزن الجزيئي	
دهون الرامينوز	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
دهون التريهايوز	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
	<i>Mycobacterium spp.</i>
	<i>Candida lipolytica</i>
دهون السيفيروز	<i>Torulopsis bombicola</i>
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>
Polymixins	<i>Bacillus polymyxa</i>
Gramicidin S	<i>Bacillus brevis</i>
دهون فوسفاتية	<i>Acinetobacter spp.</i>
	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
بيبتيدات دهنية	<i>Bacillus pumilis</i>
	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	<i>Rhodotorula glutinis</i>
(Polyol lipids) دهون كحولية	<i>Rhodotorula graminis</i>
	<i>Serratia marcescens</i>
Serrawettin	<i>Corynebacterium lepus</i>
حوامض دهنية	<i>Arthrobacter paraffineus</i>
	<i>Penicillium spiculisporum</i>
	<i>Talaromyces trachyspermus</i>
	<i>Capnocytophaga spp.</i>
	<i>Lactobacillus fermentii</i>
عالية الوزن الجزيئي	
Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
Mannan-lipoprotein	<i>Candida tropicalis</i>
مستحلبات اغذية	<i>Candida utilis</i>
مستحلبات المبيدة	<i>Pseudomonas tralucida</i>
سكريات مكوثرة حاوية على الكبريت	<i>Halomonas eurihalina</i>
سكريات مكوثرة متباينة	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>

ان تقليل لزوجة النفط الخام يسهل من ضخه الى مسافات طويلة . وتقل لزوجة النفط الخام بواسطة الحوامض العضوية الناتجة من التخمرات ولكن هذه تؤثر على نضوحية جدران البئر . اما المشتتات الحيوية فهي تساعد في استحلاب النفط وفك ارتباط أغشيته من الصخور وبالتالي المساعدة في زيادة كفاءة الاستخلاص فمثلا Emulsan يمكن ان يقلل من لزوجة النفط الثقيل من 200000 سنتي بويز (cp) الى 100 مما يسهل ضخه الى مسافات بعيدة . وعند اختيار المشتتات سواء الكيماوية او الحيوية لابد ان تكون ضمن مواصفات محددة :

● نوعية الشحنة اذ توجد مشتتات لا أيونية وأخرى سالبة او موجبة ولذا تنتخب وفق النظام الذي ستستعمل فيه .

● تحديد مقياس محبة الدهون والذي يتم من قياس التوازن المحب للماء والكاره للماء (HLB) Hydrophile - Lipophile Balance ، فالمشتتات ذات التوازن بين 3 – 6 تكون مستحلبات ينتشر فيها الماء في الزيت ، اما القيم بين 8 – 15 فهي تكون مستحلبات للزيت في الماء .

● تحديد CMC وهو التركيز الحرج الذي يصل فيه الشد السطحي الى أوطأ نقطة وتكون الفينيات Micelle .

ويجب مراعاة ان إضافة المشتتات لا يؤدي دائما الى نتائج ايجابية وذلك لان :

- قد تكون المشتتات المضافة خاصة عند التراكيز العالية سامة للخلايا .
 - قد تقوم الاحياء باستهلاك المشتتات تاركة المواد الهيدروكربونية .
 - يمكن ان تتداخل المشتتات مع وظائف الأغشية الخلوية مؤدية الى عرقلة قبط المواد .
 - قد تقلل من الجاهزية الحيوية لفتيات الهيدروكربونات المتكونة .
- لذلك هناك حدود مثالية للمشتتات المستعملة لإزالة ملوثات التربة 1 – 2 % ، التي تختلف عن الأنظمة المائية التي تكون التراكيز الملائمة لها 0.1 – 0.2 % ، لان المضافة الى التربة تتعرض الى عمليات امتزاز على سطوح حبيبات التربة . وأفضل المشتتات التي وجدت تطبيقات عملية جيدة في الحقل هي التي يكون لها توازن صفة كراهية ومحبة الماء بحدود 13 . ومن فهم دور المشتتات الحيوية يمكن استعمال الهندسة الوراثية لإنتاج مشتتات ملائمة لكل حالة في معالجة التلوث النفطي .

إزالة الاستحلاب الحيوي

مثما تبين ان استعمال المشتتات الحيوية وغيرها لتكوين مستحلبات الماء في الزيت تسهل من عمليات استخلاص النفط من الآبار في المراحل الأولى من الاكتشاف والإنتاج . ولكن بقاءها بعد هذه المراحل يشكل عقبة كبيرة في صناعة النفط . وذلك لان المستحلبات التي تكونت تكون

عالية الثباتية وبعض القطيريات تكون صغيرة جدا (قطرها حوالي 100 انكستروم) وتكون صعبة التكسير ، وتوجد بعض المستحلبات الأخرى التي قطراتها تكون اكبر ويصل قطرها الى 5 مايكرومتر تكون سهلة التكسير . وفي الحالتين سيكون النفط الحاوي على الماء الذي يذيب معه مواد أخرى وهي حالة غير مرغوب فيها تؤدي الى تآكل الأنابيب والمفاعلات وتقشرها ، لذلك تحدد نسبة الماء وما يحويه بـ 0.5 – 2 % للمحافظة على هيكليّة الأنظمة والأجهزة المستعملة ، وبذا وجب إزالة مواد الاستحلاب التي يمكن ان تتم بطرق فيزيائية وكيميائية مكلفة ، ولكن توجد بعض الأحياء التي يمكن ان تزيل انواع مختلفة من الاستحلاب ومنها المذكورة في الجدول (25) .

جدول 25 : الاحياء المزيلّة لاستحلاب النفط

نوع المستحلب	الاحياء المستعملة
الماء في الزيت ، الزيت في الماء	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
الماء في الزيت	<i>Acinetobacter radioresistans</i>
الزيت في الماء	<i>Aeromonas sp.</i>
الزيت في الماء	<i>Alteromonas sp.</i>
الماء في الزيت	<i>Alcaligenes latus</i>
الماء في الزيت	<i>Corynebacterium petrophilum</i>
الزيت في الماء	<i>Bacillus subtilis</i>
الماء في الزيت ، الزيت في الماء	<i>Micrococcus sp.</i>
الماء في الزيت ، الزيت في الماء	<i>Nocardia amarae</i>
الماء في الزيت ، الزيت في الماء	<i>Pseudomonas carboxydohydrogena</i>
الماء في الزيت ، الزيت في الماء	<i>Rhodococcus aurantiacus</i>
الماء في الزيت ، الزيت في الماء	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
الماء في الزيت ، الزيت في الماء	<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>
الماء في الزيت	<i>Torulopsis bombicola</i>
الماء في الزيت ، الزيت في الماء	مزارع بكتريا مختلطة

وتزيل الاحياء المذكورة اعلاه الاستحلاب اعتمادا على صفات سطوح الخلايا الموجودة وتكون العلاقة طردية بين كفاءة إزالة الاستحلاب وعدد او تراكيز الخلايا للمزارع النقية . وإضافة الى ما ذكر فان بعض الأحياء تقلل من ثباتية المستحلب نتيجة لإنتاجها بعض المواد مثل سكريات مكوثرة او دهون سكرية او دهون فوسفاتية او بروتينات سكرية . كما يمكن لبعض الخلايا النامية على هيدروكربونات لا نفطية إزالة استحلاب النفط .

وتتأثر عملية إزالة الاستحلاب بعدد من العوامل مثل تركيب المستحلب ، والحرارة التي تقلل اللزوجة الظاهرية وتساعد في إزالة المستحلب ، فإزالة المستحلب باستعمال خليط من البكتريا يكون عاليا عند ارتفاع درجة الحرارة الى 50° م ، ولغرض ان تزيل البكتريا استحلاب الماء في

الزيت يجب ان تكون سطوحها ذات صفات محبة للماء وهذا يحصل للخلايا النامية بشكل تزايد ويصل ذروته عند بداية طور الاستقرار . في حين ان إزالة استحلاب الزيت في الماء يحتاج ان تكون سطوح الخلايا ذات صفات كارهة للماء والتي تحصل في حالات لا تكون فيها الخلايا نامية أي تكون هاجعة .

وفيما يخص تبادل الاطوار في عملية الاستحلاب فان البكتريا التي تفرز المشتتات يكون الغرض من استحلاب النفط في الماء هو الاستهلاك اما عملية إزالة الاستحلاب تحصل عندما يكون الماء مستحلبا ومنتشرا في الزيت او النفط ، اذن يكون الوضعين في حالتين فيزيائية مختلفة وذلك لان المشتتات التي تثبت الطور المائي في الزيت تختلف عن تلك التي تثبت الزيت في الماء نظرا لاختلاف التوازن بين الصفات المحبة للماء والمحبة للدهون .

معاملة فضلات الصناعات النفطية

مما لا شك فيه انه بقدر ما يقوم به النفط من خدمات فانه يجنح الى النواحي السلبية أكثر ، وتحتاج فضلات صناعته وحوادث انتشاره الى المعالجات وتستعمل لذلك مجسات حيوية خاصة به .

المجسات الحيوية

سبق التحدث عن الموضوع أثناء مناقشة تلوث البيئة بالمعادن الثقيلة ، ولكن المجسات المستعملة في اكتشاف التلوث النفطي وان كانت تبنى على الأسس نفسها الا ان لها بعض الخصوصية . وتستعمل في هذا المجال لأغراض :

- تسجيل التلوث البيئي بالنفط .
- السيطرة على عمليات معالجة البيئة الحيوية .
- تحديد تراكيز المواد الملوثة السامة .

وتستعمل المجسات الحيوية لتسجيل التلوث بالمواد الأكثر خطورة مثل المركبات الحلقية وكذلك المواد المتطايرة مثل مجموعة (o-xylene , Xylene , Ethylbenzene , Toluene , Benzene) (BTEX) , m- xylene , p- xylene في التربة والمياه الجوفية . وذلك لان العمليات التقليدية التي تجرى بطرق تحليلية للكشف عنها تحتاج الى معاملات أولية وأجهزة وتكون مكلفة وغيرها من الأسباب الذي دفع الى إيجاد المجسات الحيوية Biosensors او المجسات البكتيرية بشكل اخص التي تكون لها بعض المزايا الجيدة . ومنها ان الطرق التقليدية لا تستطيع التمييز بين المواد الجاهزة حيويًا وغير الجاهزة ، فالطرق التقليدية يمكن ان تحدد تراكيز المواد في الأطوار الملوثة ولكن لا تستطيع ان تحدد فيما اذا كانت المواد يمكن استغلالها من قبل الاحياء والتي تكون مهمة في المعالجات الحيوية

، في حين ان المجسات الحيوية او البكتيرية تسجل التراكيز بصورة مقارنة للطرق الكيماوية إضافة الى إمكانية تحديد سميتها ، كما انها تكون ذات تكاليف واطئة بعد إعدادها وتحضيرها ويمكن استعمالها في مواضع التلوث في الحقول .

وقد استغلت الهندسة الوراثية بشكل كبير في هذا المجال فأمكن إنتاج مجسات تقيس الملوثات بإعطاء الضوء الخاص بالبكتيريا البحرية *Photobacterium phosphoreum* ويكون إنتاج الضوء مرتبطا بتنفس الخلايا ووجود أي مادة تؤدي الى اضطراب هذه الفعالية الحيوية يؤدي الى تقليل انبعاث الضوء .

وتم أيضا تحضير مجسات بكتيرية لتحديد التلوث بالنفثالين وذلك بإقحام جين *lux* (الذي يشفر لانزيم Luciferase في ذبابة النار) أمام الجين *nahG* المسئول عن هدم النفثالين في البكتريا *Ps. fluorescens* وكانت السلالات الناتجة تظهر الاستجابة عند تعرضها للنفثالين ببعث الضوء .

وحضرت مجسات أخرى باستعمال *Ps. fluorescens* HK44 لتحسس النفثالين والساليولات (المركب الناتج من هدم النفثالين) ويمكن ان تبعث الوميض الحيوي وتتحسس وجود النفثالين بتراكيز تصل الى 45 جزء بالمليون ويمكن استعمال المجس في النماذج المائية او التربة .

واستعملت السلالة أعلاه HK44 في تحضير مجسات للكشف عن المركبات الحلقية الأخرى في نماذج تحت سطح التربة .

إضافة الى تحضير مجسات أخرى لتحديد المركبات الحلقية والمواد الكارهة للماء باستعمال البكتريا المضيئة السلالة GC2 الحاوية على *lac::luxCDABE* والتي تنتج الضوء باستمرار وعند وجود المواد الملوثة او السامة يقل انبعاث الضوء ، وصمم المجس ليستعمل في المواقع البيئية الخارجية .

كما حضرت مجسات خاصة للكشف عن benzene والبنزوات ومشتقاتها باستعمال ممهدات *Pu* , *Pm* ومنشطات او منظمات الانتساخ *Xyl_R* , *Xyl_S* التي ربطت الى جينات إعلان مثل Luciferase او β - galactosidase . ويمكن استعمال العناصر الوراثية لتركيب المجسات لقياس عدد من الملوثات . وهناك عددا اخر من المجسات التي تقيس ملوثات مختلفة كما موضح بعضها في الجدول (26)

وقد استغلت بروتينات الصدمة الحرارية كونها من مظاهر الاستجابات السريعة في الخلايا عند تعرضها للاجهادات ونظرا لان وجود النفط ومشتقاته يعد احد الاجهادات الكيماوية لذلك حضرت مجسات تحوي على جينات إعلان دمجت مع ممهدات هذه البروتينات لتشكل نوعا اخر من المجسات .

جدول 26 : بعض المجسات الحيوية المستعملة في الكشف عن التلوث

البكتريا المستعملة	المادة الملوثة	الجينات المدمجة
<i>Pseudomonas fluorescens</i> HK44	نفثالين	<i>nahG-luxCDABE</i>
<i>Pseudomonas putida</i> RB1401	تولوين ، زايلين	<i>xylR-luxCDABE</i>
<i>Pseudomonas putida</i> B2	BTEX	<i>tod-luxCDABE</i>
<i>Pseudomonas putida</i> TVA8	BTEX	<i>tod-luxCDABE</i>
<i>Escherichia coli</i> DH5	Alkanes	<i>alkB-luxAB</i>
<i>Escherichia coli</i> DH5	BTEX	<i>xylR-luc</i>
<i>Escherichia coli</i>	مشتقات البنزين	<i>xylS-luc</i>

وبالرغم من التطورات الحاصلة في مجال Nano technology فانه لا تزال هناك معوقات أمام استعمال المجسات البكتيرية ذات الوميض الحيوي ، وذلك لان الخلايا البكتيرية هي أنظمة معقدة وإنتاج الوميض لا يعتمد فقط على التعبير عن الجينات الخاصة بالوميض وانما يعتمد على الحالة الفسلجية للخلايا وجوانبها المتشعبة مثل :

- معدل انتساخ الجينات .
- معدل تخليق البروتينات .
- نضوحية الأغشية .
- الحالة الفسلجية والايضية للخلايا .

كما ان الخلايا المقيدة في المجسات تكون ذات عمر محدود لذلك فان هذه المجسات تحتاج الى تطوير أكثر لغرض استعمالها في المعالجات الحيوية ، ولكن تبقى ميزة المجسات المعتمدة على الخلايا مهمة وهي تشير الى الكشف عن الملوث وإعطاء الضوء يعني ان الخلايا تستطيع استهلاكه وانه جاهز حيويًا .

معاملة الفضلات حيويًا

منذ مدة بدأت عمليات معاملة الفضلات سواء الصناعية او أي نوع من التلوث بالطرق الكيماوية وبعدها بدأت المعاملات الحيوية . وكانت بداية الأمر تعتمد على استعمال الفلورا الداخلية للمواد الملصقة الى قطيرات النفط واستعمال عمليات التدوير بدون إضافة اللقاحات . وبتوسع عمليات تصنيع النفط وازدياد حوادث التلوث والتي في معظم الاحيان تؤدي الى تكوين حمأة النفط Oily

sludge ، اذ تلتصق الهيدروكربونات بشدة الى حبيبات التربة وهذه من المشاكل المعقدة . اما الهيدروكربونات الخفيفة والتي تكون عادة سامة فتميل للتطاير الى الهواء مؤدية الى تلويثه وتهديد الكائنات الحية ، إضافة الى ملوثات الكبريت التي ترافق عمليات تكرير النفط .

واغلب عمليات المعاملة تجري على التربة وتمتاز المعاملات الحيوية عن المعاملات الفيزيوكيماوية عند المعالجة ، ان أغلبية جزيئات نظام النفط الخام ومنتجات تكريره تكون قابلة للتحلل الحيوي والأحياء التي تقوم بهذه المهمة منتشرة بكثرة . ويمكن ان تتم المعالجات الحيوية بعدة أشكال مثل استعمال المفاعلات الحيوية او طريقة الأكوام Biopiling والتي تسمى بعض الأحيان الكمر او استعمال Bioventing .

العوامل المؤثرة على المعاملات الحيوية

تتحكم بعمليات تفكيك النفط الخام وفضلاته بالأحياء المجهرية عدة عوامل منها :

● الظروف الفيزيائية المطبقة مثل درجة الحرارة والضوء فيما اذا كانت الأحياء المستعملة تقوم بعملية التخليق الضوئي .

● طبيعة الملوثات هل هي سائلة ام صلبة .

● الجاهزية الحيوية للمواد .

● صفات الأنظمة الحيوية المستعملة للمعالجة .

وتترتب المركبات النفطية وفق جاهزيتها الحيوية بداية n-alkanes وهي التي تستخدم بسهولة ، تأتي بعدها مشتقاتها المتفرعة ، ثم alkenes المتفرعة السلاسل ، ثم مركبات n-alkyl aromatics ذات الوزن الجزيئي الواطئ ثم المركبات الحلقية ذات الحلقة الواحدة وتندرج الى ان تصل الى المركبات الصلبة ذات السلاسل الكربونية الطويلة .

وفي جميع الأحوال تحتاج المواد الى الانتشار في الطور المائي الذي يؤثر على الجاهزية الحيوية ويمكن الاعتماد على الأحياء الطبيعية الموجودة في المواد الملوثة ولكنها تحتاج الى مصادر نتروجين وفوسفات لذلك عند المعالجة تضاف المخصبات الحاوية على العنصرين ، او تضاف مخصبات عضوية مثل مسحوق عظام السمك لغرض تحفيزها حيويًا ، وكذلك تضاف المشتتات الحيوية .

والمعالجات الطبيعية تحتاج الى وقت طويل وجهد بشري قليل ، اما في المعالجات المسيطر عليها والتي تجري في مفاعلات حيوية فهي تحتاج الى استغلال التقنيات المستعملة مع الأحياء المجهرية في صناعات التخمر ، إضافة الى تدخلات هندسية لتصميم المفاعلات الحيوية وملحقاته وذلك لجعل عملية التفكيك بأمثل حال من حيث معدل التفكيك ومداه ، ويجب الأخذ بنظر الاعتبار إزالة المواد الناتجة لان بعضها قد تكون سامة ، ويمكن إجراء معاملة ثانوية عليها الى ان تتحلل الى مركبات غير سامة .

المعالجات الحيوية المفتعلة

وهي التي تعتمد على الفلورا الطبيعية في المواقع المراد معالجتها في التربة وفيها تشارك الاحياء المجهرية الموجودة في محيط الجذور النباتية الموجودة وكذلك النباتات . فالأخيرة تفرز جذورها العديد من المواد التي تزود الميكروبات بالمواد الغذائية تساعد على النمو وزيادة أعدادها في المناطق المحيطة بالجذر مقارنة بالمناطق البعيدة عنه . ويمكن لهذه المعالجات ان تتم بواسطة النباتات بشكل أفضل .

Landfarming

وهذه الطريقة غير مقبولة من الناحية البيئية ولكنها لا تزال مستعملة في معالجة الحماة النفطية . فالمصانع التي سعة إنتاجها تتراوح بين 200000 – 500000 برميل / يوم تنتج حماة بحدود 10000 م³ / موسم ، وتتطاير من عمليات التصنيع غازات حاوية على مركبات عضوية تؤدي الى التأثير على طبقة الأوزون .

وباستعمال الطريقة يمكن التخلص من 0.5 – 1 % من الهيدروكربونات الملوثة / شهر ، ولكن المعاملة يمكن ان تتحسن بإضافة لقاحات ميكروبية دون الاعتماد على الفلورا الطبيعية وتحفيزها بإضافة المواد الغذائية والمشتتات الحيوية وتقليب التربة باستمرار ومحاولة المحافظة على درجة الحرارة بحدود 25° م وهذه الظروف تساعد في التخلص من 90 % من التلوث في غضون شهر .

المعاملات الحيوية المعتمدة على البكتريا المزرقة

تكون البكتريا المزرقة حساسة جدا لمركبات النفط لأنها تمنع التخليق الضوئي والنمو وتقلل من الفعاليات الإنزيمية وبالتالي من الكتلة الحيوية ، وتكون المجموعة أكثر تأثرا بالمركبات الحلقية منها بالمركبات المستقيمة مثل Alkanes مؤدية الى تغيرات كيميائية في تركيب البكتريا ولذلك تستعمل كدالات حيوية للكشف عن التلوث ، ولكن تعرض بعض البيئات لتلوث مزمن بمركبات النفط أدى الى نشو مجتمعات ميكروبية متطبعة لاستهلاك الهيدروكربونات ، وتكون البكتريا المزرقة هي السائدة في المناطق التي تتعرض للضوء إضافة الى وجود انواع بكتيرية أخرى ولكن التنوع الحيوي يكون محدودا نظرا لوجود الضغط الانتخابي في هذه البيئات وهي المركبات النفطية التي تكون سامة لعموم الأحياء .

وقد استغللت المناطق المتعرضة للضوء لمعالجة التلوث او على الأقل استعمالها كلقاحات لمناطق ملوثة أخرى . وهذه المجتمعات يمكن مساعدتها لزيادة التخلص من الملوثات بـ :

- إضافة المواد التي تزيد من ذوبان الملوثات كي تستطيع الأحياء استهلاكها .
- امتزاز الأحياء على سطوح صلبة مثل الطين والراتنجات وذلك لان الأحياء تميل الى تكوين الأغشية الحيوية على السطوح الصلبة لتساعد في الحماية .

والمجتمعات المتباينة تحوي على احياء تعمل على تفكيك الملوثات بشكل مباشر وغير مباشر ، اضافة الى وجود حالات التآزر فيما بينها . فبعض البكتريا المزرقة التي تفكك المركبات بشكل مباشر نظرا لاحتوائها على الانظمة الانزيمية Monooxygenases ومن الأنواع المشاركة *Anabaena cylindrica*, *Phormidium flaveolarum* , *Agmenellum quadruplicatum* , *Oscillatoria spp* .

واضافة الى قابلية البكتريا المزرقة على تفكيك المواد فهي تنتج مواد مخاطية Mucilage التي تساعد في تثبيت البكتريا المرافقة لها ومنعها من الانجراف .

وتوجد مجاميع طبيعية أخرى في البيئات البحرية المعرضة للتلوث بالنفط ومناطق الفضلات وهي مجموعة *Cytophaga – Flavobacter* التي تلعب دورا مهما في إزالة التلوث النفطي في البيئات التي تشغلها . وقد استخدمت الاحياء في معالجة بعض كوارث التلوث بالنفط مثل تلك التي حصلت في حرب الخليج وغيرها من الحوادث . والاحياء تكثر في المواقع الملوثة وتقوم بعمليات التخليق الضوئي في البيئات الملوثة الطبيعية وليست المقصودة والتي تضاف لها الاحياء لغرض المعالجة . والبكتريا المزرقة وكما هو الحال مع غيرها من الاحياء التي تتعرض للجهودات فانها تحمي نفسها بتكوين تراكيب خارجية خاصة هي الحصيرة Mat والتي تشابه الأغشية الحيوية (Biofilms) التي تكونها البكتريا وهذه الحصائر المكونة لها دور كبير في إزالة التلوث النفطي .

وتستطيع الاحياء تخليص البيئة من عدة أصناف من مركبات النفط مثل السلاسل المستقيمة من Alkanes والسلاسل المتفرعة من Alkenes و الهيدروكربونات الحلقية ومركبات الكبريت العضوية

وتوجد في الحصائر أنواع وأجناس من البكتريا المزرقة مختلفة ، منها التي تكون الخيوط Trichomes بأحجام مختلفة ، ومنها احياء مشابهة للـ *Phormidium* وعرض الترخوم لبعضها يصل الى 1 مايكرومتر واخرى يصل الى 2 – 4 مايكرومتر . وهناك احياء مشابهة للـ *Oscillatoria* وترخومها بعرض يتراوح بين 3 – 8 مايكرومتر ، والبعض يمكن زراعتها على أوساط مختبرية .

واضافة الى ذلك وجدت انواع اخرى من البكتريا المزرقة في مناطق التلوث أمكن زراعتها في المختبر ، مثل *Phormidium* و *Oscillatoria* و *Leptolyngbya* و *Plectonema* وانواع من البكتريا العادية . وعندما تبدأ البكتريا المزرقة بتفكيك الهيدروكربونات تظهر بعدها او بشكل مرافق مجاميع من البكتريا تعود الى مجموعة β و γ ومجموعة *Cytophaga – Flavobacter* لاستهلاك المواد الناتجة من فعالية البكتريا المزرقة ، وتكمل عمليات التحليل مجاميع اخرى منها البكتريا المزيله للفوسفات وأخرى مزيله للكبريتات .

ويكون التفكك اللاهوائي أكثر أهمية في بعض الحالات وتقوم به بعض مجاميع البكتيريا المزرقة مثل *Geothrix fermentans* اللاهوائية المختزلة للحديد و *Holophaga foetida* اللاهوائية المجبرة ، إضافة إلى وجود أحياء أخرى لم يسجل وجودها بالطرق العادية .

الترشيح الحيوي لمعالجة الهيدروكربونات المتطايرة

توجد العديد من الملوثات وبكميات كبيرة تتطاير في الجو دون أن تتعرض للتفكك الحيوي ومنها مجموعة BTEX ومعالجتها بالطرق التقليدية تكون مكلفة وغير مقبولة ، لذلك تستعمل المعاملات الحيوية لأكسدة أبخرة المواد بواسطة الأحياء المجهرية المقيدة على أغشية حيوية موضوعة في مفاعلات حيوية والتي يطلق عليها المرشحات الحيوية ، وتحتاج المرشحات الحيوية أن تكون في محاليل مواد غذائية تحوي على النتروجين والفوسفات ، وفي هذه الطريقة تمرر الأبخرة على السطوح الصلبة المغطاة بالأغشية الحيوية والمواد الغذائية التي تقوم بامتصاص الأبخرة بعد ضخها إلى الطور السائل . ومن المفاعلات المستعملة Silicon membrane bioreactor system الذي يسمح بانتشار كميات كبيرة من الأبخرة العضوية والأوكسجين لغرض تفكيكها ، ويمكن لهذه المفاعلات إزالة 30 مايكروغرام من BTEX / ساعة / سم² وبكفاءة تصل إلى 77 – 99 % اعتماداً على تركيز المواد ومعدل سريان الأبخرة . ويمكن زيادة قابلية المفاعلات بزيادة كثافة الأحياء المجهرية إلى كثافة عالية ، ويمكن استعمال المشتتات لإذابة الأبخرة في الطور السائل المحيط بالطور الصلب الذي تستقر فيه الأحياء المجهرية .

وتكون طريقة الترشيح الحيوي Biofiltration سريعة مقارنة بالطرق الأخرى المستعملة لمعالجة الملوثات الصلبة أو السائلة التي تستغرق أشهر وتسمح بتطاير المواد . وطريقة الترشيح الحيوي يمكن أن تستعمل لمعالجة فضلات أخرى إضافة إلى المتطايرة في الوقت نفسه ، إذ أن المواد المتطايرة تساعد في إذابة المواد قليلة الذوبان مؤدية إلى جعلها أكثر جاهزية للأحياء وتساعد أيضاً على تفكيك المواد العصبية منها benzo [a] pyrene في مزارعها .

المعالجات باستعمال المفاعلات الحيوية

استعمال المفاعلات يؤدي في العادة إلى السيطرة على بعض المؤشرات المتغيرة التي تؤثر على العمليات . والمفاعلات استعملت بشكل واسع في مجال الترشيح الحيوي لمعالجة الملوثات المتطايرة كما ذكر أعلاه ، إلا أنه يمكن في بعض الأحيان استعمالها لمعالجة التربة الملوثة . وفيها تستعمل التربة أو المواد الصلبة بعد تكسيرها لزيادة سحب وفك امتزاز الهيدروكربونات من سطوح الحبيبات وتعريض أكبر مساحة ممكنة لتأثير الأحياء المستعملة . وتستعمل المواد الصلبة بنسبة 5 – 50 (وزن / حجم) . وتستعمل المفاعلات لمعاملة حمأة النفط بشكل أساسي . وتحتاج المفاعلات الهوائية إلى ضخ كميات كبيرة من الهواء لأكسدة الهيدروكربونات ذات الدرجة العالية من الاختزال .

التلوث الإشعاعي

لا يخفى على احد ما للإشعاع من تدمير للأنظمة الحيوية على الأرض . وعندما كان الإشعاع كبيرا في العصور الغابرة على الأرض لم تكن هناك حياة عليها ، وعندما خفت حدته بدأت الحياة بالنشوء . وفي الوقت الحاضر توجد النشاطات الإشعاعية في مفاعلات الانشطار الطبيعي في بعض المواقع ، ولا زالت النشاطات الإشعاعية الطبيعية والتي تدمر اهم الجزيئات الحيوية وهي DNA تؤثر على الأحياء وتنتج من الأشعة فوق البنفسجية وغيرها من الإشعاعات التي تؤدي الى توليد العوامل المؤكسدة لتهاجم الأنظمة الحيوية التي اهم ميزاتها انها أنظمة مختزلة ، ومما يزيد الضرر على الأنظمة الحيوية تكرار تعرضها لدورات الجفاف او دورات ارتفاع وانخفاض بدرجات الحرارة ، ولكن المشكلة الاساسية مع تلوث الإشعاع لا تكمن في المصادر الطبيعية وانما في فعاليات الإنسان التي دمرت البيئة وأصبح يتطلع الى مختلف التوجهات لإصلاحها ثانية .

وقد أنتجت الحرب الباردة تلوث إشعاعي كبير فهناك النفايات النووية في التربة التي قدرت بـ 7×10^7 متر مكعب ، كما ان هناك ما يقرب من 4 تريليون لتر من المياه الجوفية الملوثة وهذه تجمعت منذ أربعينات القرن الماضي ، واغلب هذه الملوثات نتجت من فعاليات الدول التي تسمى المتقدمة . اضافة الى ذلك فالإنسان لم يتعظ بما حصل من تلوث وإنما تفنن في إنتاج أسلحة نووية مخففة لتستعمل في الكبيرة والصغيرة من المشاكل بين الدول . وهذه المخففة تحتاج الى مئات ومئات السنين حتى تختفي آثارها ان لم تضاف إليها إمدادات اخرى . ومما يزيد من خطورة الإشعاع انه عالمي الانتشار ، وعند حدوث التلوث به لا يمكن احتوائه في مكان .

ومعالجة التلوث الاشعاعي بالطرق الحيوية تكاد تكون أنجع الوسائل لأنها لا تضيف تلوثا على تلوث ، كما انها تعمل بظروف معتدلة . وتوجد أحياء تقوم بهذه المهمة مثل أفراد عائلة Deinococcaceae التي يتناولها هذا الجزء من الكتاب . وتعتمد الآليات الحيوية على عمليات الأكسدة والاختزال ، فهناك بعض الانواع التي تستطيع اختزال اليورانيوم وغيره من المعادن مثل Cr VI , Tc VII , U VII تحت الظروف الهوائية واللاهوائية اعتمادا على الظروف المطبقة ويمكن ان تتم بدرجات حرارية مرتفعة باستعمال أحياء محبة للحرارة . ان اختزال الايونات الموجبة متعددة التكافؤ يمكن ان يؤثر على قابلية ذوبانها وبالتالي يقييد حركتها في البيئة وهذه تكون ملائمة لتقييد المعادن وانويتها المشعة Radionuclides ضمن الموقع البيئي الذي توجد فيه . ونظرا لخطر الإشعاع تم الاهتمام بالأحياء والبكتريا على وجه الخصوص التي يمكن ان تستعمل في حل هذه المعضلة ومنها :

عائلة Deinococcaceae

وهي أكثر الأحياء في حالة الطور الخضري تحملا ومقاومة للإشعاع الموجودة على الأرض . وتضم العائلة جنس *Deinococcus* الذي يضم 7 أنواع موصوفة لحد الآن وأفرادها هي الأكثر مقاومة للإشعاع من بين الأحياء المدروسة أو المكتشفة .

المواصفات العامة للبكتريا

هي مكورات موجبة لصبغة كرام ، لا تكون الابواغ ، كبيرة الحجم اذ يصل قطرها الى 1 – 2 مايكرومتر ، تتجمع بشكل رباعيات ، هوائية ، غير مرضية توجد في التربة وسهلة الزراعة في المختبر ، وبعض أفراد العائلة ينتج صبغة حمراء ، تقاوم العديد من ظروف الاجهاد اضافة الى الإشعاع ، فهي تقاوم العوامل المؤدية الى الإجهاد التأكسدي مثل بيروكسيد الهيدروجين ، تقاوم الجفاف وغيرها من العوامل المدمرة للـ DNA . تنتشر في جميع أنحاء العالم ، وتمتاز بقابليتها على التحول الوراثي السهل بواسطة قطع كبيرة من DNA الكروموسومي أو البلازميدي . ومن اهم أفرادها المقاومة للإشعاع والتي درست بشكل مفصل وزاد الاهتمام بها مقارنة بالانواع الأخرى هو :

★ *D. radiodurans* : وتوجد منها سلالات عزلت على مدى زمني مختلف ، فالسلالة R1 والتي تسمى ايضا سلالة DEIRA عزلت في ولاية Oregon عام 1956 من لحوم معلبة تالفة عقلت بتعريضها للأشعة السينية . والسلالة SARK عزلت بعد السلالة الاولى بوقت قصير من هواء ملوث في احد مستشفيات مدينة Ontario وسجلت عام 1958 ، وبعد ذلك تم تسجيل عدد اخر من الانواع منها :

★ *D. geothermalis* عزلت من الينابيع الحارة في البرتغال وقد زاد الاهتمام بها لمعالجة التلوث الإشعاعي عند درجة حرارة مرتفعة لانها محبة للحرارة ، وذلك لان مناطق التلوث الإشعاعي ترتفع فيها الحرارة الى حوالي 70°م نظرا لتفكك الانوية المشعة .

★ *D. murrayi* عزلت من مناطق الينابيع الحارة في ايطاليا .

★ *D. radiopugnans* عزلت من انسجة اسماك Hoddock .

★ *D. radiophilus* عزلت من البط الهندي .

★ *D. proteolyticus* عزلت من غائط حيوان اللاما *Lama glama* .

★ *D. grandis* عزلت من غائط الفيلة وتمتاز بشكلها العصوي الغالب .

ويمكن ان تعزل البكتريا من الأدوات الطبية المعقمة بالإشعاع وكذلك من أنظمة تنقية الهواء .

ومن دراسة تواليات 16S rRNA وجد ان هناك علاقة وثيقة لجنس *Deinococcus* بالجنس المحب للحرارة *Thermus* ، اذ يحتوي الجينسان على غلاف معقد التركيب من الاغشية الخارجية و

S - layers ، واحتواء المكوثر ألداري Murine على الحوامض الامينية الاورنثين والكلايسين ، ولكن جنس *Thermus* خلاياه سالبة لصبغة كرام . ويوضع الجنسين في مرحلة تطورية واحدة من شجرة الحياة تحت مسمى *Thermus – Deinococcus group* .

تقاوم البكتريا *D. radiodurans* و *D. geothermalis* الإشعاع بشكل ملفت للنظر ولو ان الثانية تكون بدرجة اقل من الأولى وتكون حساسة للمطر Nitrosoguanidine (NTG) الذي يؤدي الى أخطاء في ازدواج القواعد النتروجينية أثناء التضاعف .

وقد حظيت البكتريا *D. radiodurans* باهتمام كبير وتعرضت للتحليل الوراثي وتحديد القواعد النتروجينية في جينومها وطورت الوسائل لتحويلها الوراثي . وتعد نموذجا دراسيا ملائم جدا لدراسة عمليات إصلاح الحوامض النووية في الكائنات الحية . إضافة الى تشجيع استعمالها في معالجة النفايات النووية . وتستطيع *D. radiodurans* العيش بشكل طبيعي بوجود إشعاع بمستوى 6 كيلوراد / ساعة دون تأثير على معدل نموها او قابليتها للتعبير عن الجينات الغريبة المنقولة إليها ، في حين تموت خلايا *E. coli* والخلايا الخضرية من *Bacillus* عند هذه الجرعة . كما تستطيع تحمل وجود إشعاع بمستوى 1500 كيلوراد من أشعة كاما دون ان تحدث فيها طفرات مقابل استعمال 100 – 200 كيلوراد لتعقيم الأدوات وغيرها من *E. coli* او جنس العصيات .

ان استعمال الإشعاع يؤدي الى حدوث عدد كبير من الكسور في الأشرطة المزدوجة Double – stranded breaks (DSBs) والتي تعد من اهم أنواع الضرر الذي يصيب الأشرطة المزدوجة ويؤدي الى الموت لان الخلايا لا تتحمل عدد قليل من الكسور . ويعتقد ان المقاومة التي تبديها البكتريا تعود الى وجود أنظمة تصليح للـ DNA كفاءة جدا .

التركيب الخاصة بـ *D. radiodurans*

قبل الخوض في المسائل الوراثية هناك بعض الصفات التركيبية التي تمتاز بها البكتريا والتي يمكن ذكرها وان كانت الخلايا تمثل مجمع صفات من خلايا الأخرى كما سيتضح لاحقا .

فكما ذكر أنفا ان البكتريا موجبة لصبغة كرام ولكنها تحوي على غلاف غير طبيعي وهو غير موجود في الأجناس الأخرى ، فهو يختلف عن ما موجود في البكتريا السالبة لصبغة كرام ، وتحوي الخلايا على طبقات سميكة من البيبتيدوكلايكان ربما لا يسمح بقصر الصبغة عند استعمالها . ويتكون الغلاف Envelop من الأغشية الخلوية وأغشية خارجية تفصل بينها طبقة البيبتيدوكلايكان التي يصل سمكها الى 14 – 20 نانومتر . ويحوي الغلاف أيضا على طبقة خاصة لم توصف في البكتريا الأخرى . ودراسات المجهر الالكتروني تظهر ان الغلاف يحتوي على 6 طبقات ، الداخلية هي الغشاء الخلوي تأتي بعدها طبقة البيبتيدوكلايكان وتبدو مثقبة ربما تستعمل لتسهيل تصدير بعض المواد من داخل الخلايا عند تعرضها للإشعاع . وتلي طبقة البيبتيدوكلايكان طبقة ثالثة مقسمة ثم طبقة رابعة

هي الأغشية الخارجية . اما الطبقة الخامسة فهي طبقة غير متميزة Electrolucent zone ، والطبقة الأخيرة هي طبقة من البروتينات ذات ترتيب سداسي الشكل وهي طبقة S - layers المشابه لما موجود في البكتريا الحاوية عليها . وبعض السلالات تحوي على طبقة مكثفة من الكربوهيدرات . وكل من البيبتيدوكلايكان والغشاء الخلوي تشارك في تكوين الحواجز عند الانقسام والباقي تعد غلاف او غمد Sheath نظرا لأنها تحيط بمجموعة من الخلايا وتتكون على سطوح الخلايا البنية عند الانفصال .

والبيبتيدوكلايكان من النوع A 3 β murine chemotype ويحوي على الاورنثين وبذلك فهو يشبه التركيب الموجود في *Thermus thermophilus* ، ولذلك تعد البكتريا مرحلة انتقالية من البكتريا الموجبة الى البكتريا السالبة لصبغة كرام .

اما الغشاء الخلوي والغشاء الخارجي فتحتوي على حوامض دهنية مميزة للبكتريا *D. radiodurans* اذ تحوي على عدد من ذرات الكربون تبدأ من 15 - 18 ، وتوجد فيها حوامض مشبعة وغير مشبعة ولم يسجل وجود الحوامض الدهنية المشبعة Polyunsaturated او الحلقية Cyclopropyl والحوامض الدهنية المتفرعة . والبكتريا لا تحوي على الدهون الفوسفاتية الموجودة في دهون الأغشية الخلوية للبكتريا وإنما تحوي على دهون سكرية فوسفاتية Phosphoglycolipids الحاوية على Alkylamine وهذه ميزة لدهون البكتريا .

المسارات الايضية للبكتريا المقاومة للإشعاع

دراسة فسلجة البكتريا وتحليل جينومها يشير الى وجود مجاميع مثالية من البروتينات والمسارات الحيوية للحفاظ على الوظائف الأساسية وتنظيمها وهي مشابه لما موجود في *E. coli* ولكن اقل تنوعا . فهناك مسارات لهدم الكربوهيدرات للحصول على الطاقة ، إضافة الى وجود مسارات لتخليق الحوامض النووية وأوليئاتها وكذلك مسارات لتخليق الحوامض الامينية والفيتامينات والحوامض الدهنية والمكافئات المختزلة ومكونات السلاسل التنفسية من الإنزيمات والسايكرومات .

انتاج الطاقة

تمتاز البكتريا عن البكتريا الأخرى حرة المعيشة انها تستخدم نظام V- type ATPase لتخليق ATP وهذا النوع موجود في الفجوات في حين ان معظم البكتريا تحوي على النظام F_0F_1 - type لدفع البروتونات عبر الأغشية ، والنوع V-type ATPase يوجد بشكل أساسي في الخلايا حقيقية النواة والاركية ، وفي الاركية يحوي على 8 جينات لتخليق وحدات النظام . ويوجد النوع V في بعض البكتريا التي يعتقد انه وصل إليها بالنقل الأفقي للجينات ونقل كوحدة متكاملة ، ولكن الموجود في *D. radiodurans* يفتقر الى بعض الوحدات الموجودة في النظام المثالي فهو ينقصه Cyt. bd quinol oxidase complex وفقدان هذا المكون يحصل في البكتريا الأخرى التي تنمو تحت تهوية

قليلة ولكن *D. radiodurans* من الهوائيات المجبرة ، وتحت الظروف اللاهوائية تختزل مركبات الحديد التي تكون مرافقة لأكسدة اللاكتات لإنتاج الخلّات وثنائي اوكسيد الكربون .
وتحوي البكتريا على مضخات منها Na^+ / H^+ وهو نظام متعدد الوحدات الفرعية يقوم بالنقل المتعاكس لبروتونات وايونات الصوديوم والنظام مميز للأحياء التي تنمو تحت الظروف القلوية ، ويوجد في بعض الأحياء المحبة للحرارة وبعض سلالات *B. subtilis* ولكنه يوجد في *E. coli* او مجموعة بكتريا السل .

ايض الكربوهيدرات : توجد مسارات عدة لايض الكربوهيدرات في البكتريا ، وتواليات قواعدها النتروجينية تشير الى احتوائها على مسار تحليل السكر Glycolysis وكذلك Gluconeogenesis pentose phosphate shunt ودورة TCA ولكنها تفتقد بعض الجينات غير الضرورية كما هو الحال مع بكتريا أخرى . وضمن دورة تحليل السكر او ما يسمى مسار امبدن – ماير هوف EMP تظهر البكتريا خلافا مع البكتريا الاخرى اذ ينقصها الإنزيم الرئيس في المسار وهو keto -3- deoxy 6 – phosphogluconate aldolase 2 ومثل هذا الفقد موجود في الاركيا والبكتريا تعوض الالدوليز بإنزيم آخر . اما مسار Glyoxalate فيوجد في البكتريا كما هو الحال مع بكتريا أخرى مثل *E. coli* وبكتريا السل *Mb. tuberculosis* . وبما ان البكتريا متباينة التغذية فهي تحوي على إنزيمات تستعمل في ايض الكربوهيدرات المعقدة مثل Glycogen – debranching والذي يعتقد انه انتقل اليها أفقيا من الخلايا حقيقية النواة ، وتحوي البكتريا على عدد من الانزيمات اللازمة للنقل والتعامل مع عدة سكريات اخرى مما يشير الى سعة قابليتها في استخدام عددا من السكريات كمصدر للكربون والطاقة .

ايض الحوامض الامينية والنيوكلوتيدات

البكتريا لا تستطيع استعمال الامونيا ذات النتروجين المختزل مصدرا للنتروجين بغض النظر عن وجود الإنزيمات الأساسية لاستهلاك الامونيا . ولكنها تستخدم الحوامض الامينية الحاوية على الكبريت مثل السستئين والميثايونين لانها لا تملك مسارات لتخليقها ، ولكن عند تزويدها بحوامض امينية اخرى فهي تستطيع ان تحولها الى سستئين وميثايونين ، والبكتريا لا تحتاج الى الاليسين ولا تمتلك مسار لتخليقه . اما باقي الحوامض الامينية فهي تملك مسارات لتخليقها وان كانت جيناتها غير كاملة ولكن يمكن ان تعوض بانزيمات اخرى مثل ذاك الخاص بايض الارجينيون والذي قد تكون مجموعة *Thermus – Deinococcus* اكتسبته من الاركيا .

ايض الدهون ومكونات الجدار الخلوي

البكتريا ينقصها الجين الذي يشفر للإنزيم Phosphatidylglycerophosphate synthetase الموجود في معظم البكتريا الاخرى . اما باقي الجينات العاملة في ايض الدهون فتحويها البكتريا .

وجدارها الخلوي وكما ذكر انفا يكون غير طبيعيا وتحوي الخلايا على مسار ايض الاورنثين الذي يدخل في تركيبة الجدار والبكتريا لا تحوي على الانزيمات الرئيسية لتخليق Diaminopimelic acid .

الاحتياجات الأخرى

تستطيع البكتريا تخليق معظم المرافقات الإنزيمية Coenzymes ما عدا حامض النيكوتينيك ، وكذلك تفتقد الإنزيمات التي تخلق NAD وهذا مغاير لما موجود في البكتريا حرة المعيشة التي تمتلك هذه القابلية . وبالرغم من فقدانها لبعض المرافقات الإنزيمية الا انها تستطيع تخليق مشابهاة لها .

انظمه الترجمة

تحوي *D. radiodurans* على المكنائ الأساسية لعملية الترجمة ولكن اضافة الى ذلك تحوي بعض المكملات التي تشد عن باقي البكتريا فهي تحوي على مجمع او ذخيرة خاصة من الجينات Unique repertoire ، ومسارات لتكوين Asparaginylyl – tRNA , Glutaminylyl – tRNA وتكون مكنة الترجمة فيها مؤلفة من جزء يشبه خلايا حقيقيات النواة واخر يشبه الموجود في الاركيا واخر موجود في البكتريا مجموع كما γ .

انظمة التضاعف : تحوي البكتريا الجينات المثالية لمكائن التضاعف فهي تحوي على سبيل المثال على الانزيمات الحالة للفوسفات Phosphatases وإنزيمات القطع 3' – 5' Proof- reading exonucleases ، وتحوي على الوحدة الفرعية (α) لإنزيم الكثرة (Polymerase α subunit) الموجودة في البكتريا الاخرى ولكنها تخلص من فعالية 3' – 5' exonuclease . وبشكل عام تحوي على مكائن تضاعف تشبه الاركيا إضافة الى احتوائها على إنزيم كثرة DNAP X الذي يشبه DNAP B الموجود في حقيقيات النواة وغير شائع في بدائيات النواة ، وتحوي على جينات غير متكاملة تشفر للبروتينات التي ترتبط بالأشرطة المفردة Single strand binding proteins (SSB) .

تركيب الجينوم

تحوي خلايا *D. radiodurans* السلالة R1 على كروموسومين ، الأول I يتكون من 2.65 ميكازوج قاعدة ويسمى (Dr - Main) ، والكروموسوم الثاني II يتكون من 412 كيلو قاعدة (DRA) . والخلايا في طور اللوغاريتمي تحوي على 8 – 10 نسخ من الكروموسومات الفردانية ، و 4 نسخ في طور الاستقرار ، اما *E. coli* (للمقارنة) فتحوي على 4 – 5 نسخ في طور اللوغاريتمي . ان زيادة تعداد الكروموسومات قد يشكل وصفا ملائمة لمقاومة الإشعاع ولكنها لا تكون كافية فمثلا البكتريا *Micrococcus luteus* و *M. sodonensis* تحوي على عدة نسخ ولكنها حاسة جدا للإشعاع ، اما *Azotobacter vinelandii* تحوي في بعض مراحل حياتها على

80 نسخة كروموسوم / خلية ولكنها حساسة جد للأشعة فوق البنفسجية . ولا توجد علاقة بين عدد الكروموسومات ومقاومة الإشعاع كما اثبت ذلك من استعمال أوساط غذائية مختلفة لتنمية البكتريا . ويحوي جينوم البكتريا على حوالي 3195 جين .

وتحوي البكتريا على العناصر الوراثية المتحركة التي تساهم في الاصلاح التآشبي ومنها بلازميد كبير Mega plasmid (DRB) الذي يصل حجمه الى 177 كيلو قاعدة وبلازميد صغير (DRC) حجمه 46 كيلو قاعدة .

تحتوي البكتريا على اثنين من Inteins وهي عناصر لخيطة ووصل البروتينات ، وهذه موجودة في الجينات المسؤولة عن ايض DNA والإنزيمات المسؤولة عن استخدام النيوكليوتيدات واحد منها في Ribonucleotide reductase والآخر موجود في احد أفراد العائلة التي تتعامل مع ATP الخاصة التي تعمل على إعادة تشكيل الكروماتين .

ويحوي الجينوم على عناصر الإقحام IS وهي مشابه لما موجود في البكتريا الاخرى والبعض منها يحوي على Open frame readings (OFRs) التي تشفر لمنظمات انتساخ وكذلك تشفر لإنزيم القفز Transposase ، وتحوي هذه العناصر على تواليات طرفية . تحوي البكتريا على 52 من IS وبمكررات مختلفة منها IS4 ويوجد منها 3 نسخ ، وتحوي على 11 نسخة من IS2621 وثمان نسخ من IS200 ، وهذه العناصر غير منتظمة التوزيع على الكروموسومات او البلازميدات ، اذ ان تكرارها على البلازميدات أكثر مما موجود على الكروموسوم الاول والثاني . ووفرة IS هي أكثر بكثير من الجينومات البكتيرية الأخرى التي تم تحديد تواليات جينوماتها لحد الان ، اذ تحوي على 16.3 من عناصر الإقحام / 1000 جين في حين تحوي *E. coli* على 4 - 8 / 1000 جين . ويبدو ان العدد الكبير لم ينتج من عمليات القفز لان ذلك سيؤدي إلى عدم ثباتية الجينوم ، وجينوم *D. radiodurans* ثابت ولم تسجل الا حالات قليلة من القفز وتعطيل الجينات .

ويحوي جينوم *D. radiodurans* على مكررات غير مشفرة صغيرة Small noncoding repeats (SNRs) ويوجد العديد منها في المناطق بين الجينات Intergenic regions ، وهي كثيرة مقارنة بجينومات البكتريا الأخرى ، ولا توجد على البلازميدات وإنما توجد على الكروموسومات ، فمثلا الكروموسوم الثاني الذي يحوي على IS واحدة يحوي على 18 من SNRs ، وتوجد حول الجينات والوبرونات وهذه ربما توفر إمكانية كبيرة للتمدد في بعض المناطق للاستجابة وعمليات التنظيم لمناطق الجينوم استجابة للظروف البيئية الخارجية .

ويحوي الجينوم على اثنين من العاثيات الأولية Prophages لا توجد بينهما علاقة ، واحد على الكروموسوم الاول والثاني على الكروموسوم الاخر .

النقل الأفقي للجينات

ظهر مما ذكر أعلاه حول تراكيب جينوم البكتريا انها اكتسبت عددا من الجينات بعمليات النقل الأفقي ، بحيث أصبحت البكتريا مجمعا للجينات التي احتفظت البكتريا بما ينفعها وهو الذي يشكل حوالي 10 – 15 % من الجينات. وهناك العديد من الشواهد حول الانتقال الأفقي والذي يعد من الأساسيات في تطور ليس هذه البكتريا فحسب وانما في تطور البكتريا الاخرى والاراكيا . وبكتريا *D. radiodurans* ليست استثناءا فهي اكتسبت العديد من الجينات من مصادر عديدة واحتفظت بها كما موضح البعض منها في الجدول (27) .

جدول 27 : بعض البروتينات والجينات الموجودة في *D. radiodurans* المكتسبة من الاحياء الاخرى

البروتين	الاحياء الموجودة فيها	الملاحظات
Topoisomerase IB	حقيقية النواة والفيروسات مزدوجة اشرة DNA	يعود Topoisomerase I الى النوع الاول يستعمل في كسر اشرة DNA بشكل غير معتمد على ATP
البروتين الاصفر	ذبابة الفاكهة (<i>Drosophila</i>) ونحل العسل	يستعمل في تلوين الحشرة ، احد مكونات الغذاء الملكي
البروتين الرابط لـ Acyl Co A	حقيقية النواة و <i>Caenorhabditis elegans</i>	يرتبط الى استرات Acyl Co A طويلة ومتوسطة السلاسل
البروتين الرابط لـ Ro RNA	حقيقية النواة <i>Xenopus laevis</i>	يعمل معقدات مع جزيئات RNA الصغيرة التي تساهم في مقاومة البكتريا للأشعة فوق البنفسجية
بروتين يستحث بالجفاف LEA14-like	النباتات <i>Lycopersicon esculentum</i> , والاراكيا	بروتين يستحث في اوراق النبات بالجفاف او المعاملة بالاثيلين او Absciscic acid
بروتين الجفاف	نباتات <i>Craterostigma plantagineum</i>	بروتين يستحث في اوراق النبات بالجفاف او المعاملة Absciscic acid
بروتينات الجفاف LEA76/LEA26-like	حقيقية النواة واغلبها النباتات	بروتين يستحث في اوراق النبات بالجفاف او المعاملة بالاثيلين او Absciscic acid
كاينيز البروتين (عائلة RIO1)	حقيقية النواة <i>Schizosaccharomyces pombe</i> والاراكيا	بروتين يشارك في عمليات السيطرة في دورة الخلية
Peroxidase	فطريات <i>Polyporaceae</i> spp.	
Tryptophan-2,3-	حقيقية النواة	

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	dioxygenase
	<i>Homo sapiens</i> حقيقة النواة	Serine carboxypeptidase
يشارك في توليد الميثان	<i>Pyrococcus horikoshii</i> الاركيا	Tungsten formylmethanofuran dehydrogenase
بروتينات من البكتريا المزرقة واحياء اخرى		

ويتضح من الجدول ان عددا من الجينات موجودة في الاركيا والبكتريا الموجبة لصبغة كرام وأخرى خاصة بالبكتريا نفسها ، وتحوي على جينات من الخلايا حقيقيات النواة ، والنقل الأفقي قد لا يقتصر على جين واحد وانما يمكن ان يشمل نظام جيني كامل ، وهذه التشكيلة من الجينات هي التي تساهم في المقاومة للإشعاع الملفنة للنظر .

إصلاح أضرار الحوامض النووية :

ويمثل الموضوع الأهم الذي تم دراسته بغية الوصول الى معرفة آليات إصلاح DNA على وجه الخصوص والغرض الاخر معرفة الكيفية التي يمكن ان تستغل البكتريا في معالجة التلوث بالإشعاع .

خلايا البكتريا في طور ألترايدي لا تموت بوجود 500 كيلوراد من الإشعاع ، اذ يبقى منها حوالي 10 % حتى عند استعمال 800 كيلوراد ، في حين ان *E. coli* يبقى منها 10 % عند استعمال 15 كيلوراد فقط ، أي انها تظهر مقاومة أكثر من 50 مرة . اما في طور الاستقرار فتظهر *D. radiodurans* مقاومة لـ 1.5 ميكاراد وهي اكثر 100 مرة من مقاومة *E. coli* في طور الاستقرار . وتظهر البكتريا مقاومة أيضا تجاه الأشعة فوق البنفسجية بمعدل 33 مرة أكثر من *E. coli* . ومعظم الإشعاعات تؤدي الى حدوث كسور في الأشرطة المزدوجة DSBs التي تعد من التأثيرات الخطرة والمميتة وذلك لعدم وجود أشرطة مفردة لعمليات الإصلاح والبكتريا *E. coli* تستطيع إصلاح عدد قليل من الكسور اما *D. radiodurans* فتستطيع إصلاح المئات .

وتبدأ عمليات الإصلاح في طور الشفاء الذي يمر بثلاث مراحل ولكن تسبقها عملية تنظيف . فعند التشعيع بجرع تصل الى 1.5 ميكاراد فان الخلايا توقف النمو لمدة تصل الى ساعات ثم تستأنف النمو بعد ذلك ، والوقت المذكور يعتمد طوله على الجرعة المستعملة مما يشير الى وجود نقطة سيطرة تقيس وتسجل مدى الإصلاح الذي تحتاجه الخلايا وتحدد بدء عمليات تخليق DNA التضاعفي . وعند استعمال جرعة مختلفة فانه في البداية تبدأ الخلايا في الدور المبكر (الذي سيأتي ذكره لاحقا) بالتنظيف الخلوي وتشمل هذه عدة عمليات منها تصدير قطع DNA المدمرة التي قد يصل حجمها 2000 زوج قاعدة وتكون خليط من النيوكليوتيدات المدمرة موجودة في سايتوبلازم الخلايا

وتوجد في الوسط المحيط بالخلايا ، مما يشير الى ان *D. radiodurans* تخرج المواد عند تكونها مباشرة . ان تصدير النيوكليوتيدات المدمرة يحمي الخلايا من احتمالية حصول التلفير وارتفاع مستوياته وذلك بمنع النيوكليوتيدات المدمرة من الاندماج في DNA الجديد عند تخليقه . اما ما يتبقى من النيوكليوتيدات المدمرة والتي يمكن ان تكون طلائع للتأثير المطفر يمكن ان تصحح بواسطة انزيمات Pyrophosphohydrolases التي تعود الى العائلة الكبيرة (Nucleoside) Nudix (diphosphate linked to x) ومنها MutT الذي له فعالية 8-oxo - dGTPase والذي ينتج - 8 oxo - dGTP وفوسفات لا عضوية وذلك لان المركب 8-oxo - dGTP مطفر قوي ويمكن ان ينحسر في DNA ولذلك يقوم الإنزيم بتصحيح الوضع . وتكون *D. radiodurans* غنية ببروتينات Nudix التي تقوم بتصحيح طلائع DNA المتغيرة التي تنتج بعد التشعيع . اما مركبات الأوكسجين الفعالة التي تتكون بعد التشعيع فيتم التخلص منها بواسطة SOD (*soda*) والكاتيليز (*kata*) . وفي أثناء عملية التنظيف فان الخلايا تدخل الحوامض الامينية والنيوكليوتيدات والنيوكليوسيدات والسكريات والفوسفات من خارج الخلايا لتخليق DNA . والأدوار التي تلي عملية التنظيف من عمليات إصلاح واستعادة DNA تكون على درجة عالية من التنسيق وتكون على المراحل الآتية :

- الطور المبكر ويبدأ بعد انتهاء عملية التشعيع الى 3 ساعات ، وفيه تتوقف الخلايا عن النمو ، وفيه يحدث الجين *recA* ، ويعتقد انه تحصل في هذا الطور بعض الإصلاحات البسيطة للـ DNA ، ويكون الطور هو المرحلة النشطة لتنسيق عمليات التعبير عن الجينات .
- الطور المتوسط ويبدأ من 3 – 9 ساعات ويستمر فيه التعبير عن الجين *recA* واستمرار توقف النمو ولكن تحدث فيه بعض عمليات إصلاح للـ DNA .
- الطور المتأخر ويمتد من 9 – 24 ساعة ، وفيه يكبح الجين *recA* وتستعيد الخلايا قابليتها على النمو .

وعند تشعيع الخلايا بـ 15 والتي لها D37 (أي ان ما يتبقى من الخلايا هو 37 %) يحصل ما يقارب من 150 – 200 كسر في مكونات جينوماتها الأربعة وهي الكروموسوم الأول او ما يسمى Dr Main كما ذكر انفا ، والكروموسوم الثاني (DRA) والبلازميد الكبير (DRB) والبلازميد الصغير (DRC) وعند التشعيع وجد ان حوالي 832 جين (28 %) من جينوم البكتريا يتم حثها و 451 جين (15 %) يتم كبحها على الأقل في إحدى مراحل الشفاء .

وبروتين *recA* يعد أساسيا لاستعادة الجينوم بعد التشعيع وحثه يعد الصفة الغالبة والمميزة لبدء عمليات التأشب المتجانس . وتساهم مفردات الجينوم المذكورة في عمليات الشفاء ، فالبلازميد الصغير DRC الذي يحوي على 41 جين تحصل فيه عمليات تنشيط في الطور المتوسط والمتأخر من أطوار

الشفاء ويعد الأهم في مرحلة الشفاء مقارنة بمكونات الجينوم الأخرى إذ يعبر عن 38 جين من جيناته 41 في الطور الأخير .

وما يحدث أثناء الاطوار الثلاثة يكون بمثابة تجميع لقطع الجينوم التي نتجت من التشعيع والتي تصل في بعض الاحيان عند استعمال 1.75 ميكاراد الى 1000 - 2000 قطعة (في حين ان *E. coli* تستطيع تجميع 10 - 15 قطعة) ، وعند الالتئام فان كل قطعة تبحث عن مكملتها وهذا ان حدث فانه يعني وجود احتمالات كبيرة جدا من التوليفات ولكن الخلايا تستعمل طرق اصلاح بالاعتماد على المعلومات المتوفرة لديها وتستغلها بشكل لا يستطيع غيرها من الخلايا القيام به ، ولذلك فان عمليات الاصلاح تنتظم في سلسلة من الأحداث ومنها عمليات الاصلاح الفيزيائية وتحتاج الى ظروف تنمية تساعد في ذلك ، فالأوساط الصلبة يجب ان تكون مغذية جدا وفي حالة استعمال الأوساط السائلة فتحتاج الى إضافة أوساط جديدة غنية بالمواد الغذائية ، وتحتاج الى تنظيم عدد الخلايا لإبعاد اجهادات الزحام وليلائم وضع استئناف نموها ألترايدي ، وذلك لان الظروف المحفزة للنمو تكون ضرورية لإزالة إصابات DNA من الخلية ، والخلايا في هذه المرحلة تقوم بفعاليات ايضية عديدة ونشطة ولكن لا تنقسم وذلك لانشغال الخلايا بإصلاح DNA في الجينوم لان ذلك يعيق النمو . وطول مدة تعثر النمو والانقسام يعتمد على الجرعة التي تتعرض لها الخلايا ، فالجرع العالية تؤدي الى إطالة المدة والتي قد تزيد بكثير عن المدة اللازمة لتفكيك DNA .

أنظمة ومسارات إصلاح DNA

ان تعرض الخلايا لجرع مهولة من الإشعاع يؤدي الى تدمير كبير الذي لا يكون محتملا من قبل الأحياء الأخرى ، ولكن البكتريا *D. radiodurans* تستطيع التغلب عليها وهذا يعني ان هناك العديد من الأنظمة والفعاليات التي تعيد الخلايا وتساعد على الشفاء ، ولكن بالرغم من وجود عدد كبير من جينات إصلاح DNA الا ان عدد قليل منها يظهر الفعالية . واهم أنظمة الإصلاح هي الإصلاح الأستئصالي Excision repair وإصلاح تقابل القواعد Mismatch repair والإصلاح التآشبي . وتشارك العديد من البروتينات وفيما يلي مجمل للمكونات المشاركة في عمليات الإصلاح عند التعرض لإشعاعات مختلفة :

■ بروتين *recA* ، فبعد التشعيع يزداد عدد من البروتينات ومنها هذه البروتينات والتي تلعب دورا مهما في مقاومة الإشعاع القوي ، فهو ليس ضروريا عندما تكون جرعة الإشعاع واطئة وعدد الكسور قليل حوالي 10 / كروموسوم أي عند استعمال جرعة بحدود 100 كيلوراد وانما يتم تحفيزه بالإشعاع العالي أي أكثر من 100 كيلوراد لذا فهو لا يوجد في الخلايا التي لا تعاني من تدمير قاسي لـ DNA . والبروتين يشبه ذاك الموجود في *E. coli* بنسبة تصل الى 50 % . وعند حصول طفرات في الجين *recA* تصبح الخلايا حساسة للأشعة فوق البنفسجية . ويقوم البروتين بتكوين خيوط

على الأشرطة المفردة والمزدوجة ويشجع عمليات التبادل بين الأشرطة . كما ان له القابلية لتحليل ATP (DNA-dependent ATPase) بمدى واسع من الأرقام الهيدروجينية .

■ هناك مسارات لا تعتمد على *recA* وهو نظام يعمل مباشرة بعد تدمير DNA وقبل بدء التصليح الذي يقوم به *recA* والمسار يمكن ان يصحح ثلث الكسور المتكونة والتي قد تصل الى 150 – 200 بعد التعرض للإشعاع ، ثم يليه الإصلاح المعتمد على *recA* .

■ من البروتينات التي تزداد وتساهم في التصليح بروتين *uvrA* الذي يعمل على استئصال النيوكليوتيدات ، والإنزيم β - *uv endonuclease* وهو إنزيم بوزن جزيئي 35 كيلو دالتون يحوي على المنغنيز يتعرف على المركبات او المزدوجات الحلقية التي تتكون من قاعدتين ثايمين متجاورة نتيجة التعرض للأشعة فوق البنفسجية ويقوم باستئصالها ، وتكمل المهمة إنزيمات أخرى .

■ إنزيم *Recombinase* وهو إنزيم يساعد في إصلاح الكسور وينتج مع مكونات نظام *recA* .

■ نظام الإصلاح الضوئي *DNA photolyases* يشارك في اصلاح وإزالة مزدوجات الثايمين المتكونة بعد التعرض للأشعة فوق البنفسجية ، ويقوم بفعالياته عند وجود الضوء المرئي ، فوجود المزدوجات يؤدي الى موت الخلايا ، وفي الأحياء التي هي عرضة لمثل هذه الإشعاعات فانها تحوي على أكثر من مسار ضوئي للإصلاح كما في الاركيا *Sulfolobus acidocaldarius* .

■ تعد عمليات التأشب من الفعاليات الضرورية بعد التشيع وتكون مهمة لمقاومة التدمير وتشمل استعمال إنزيمات *Recombinase* و *Helicases* .

■ لا تظهر الخلايا ظاهرة التطيع لعدد من الظروف المجهدة .

■ اشتراك النظام المعتمد على عملية المثيلة في نظام اصلاح عدم تقابل القواعد *Mismatch repair* (MMR) الذي يشمل النظام *mutS ATPases* , *mutL ATPases* وإنزيم *Endonuclease III* (*XesA*) وتحوي هذه الأنظمة على إنزيمات المثيلة *Methylases* التي تكون متخصصة الموقع ولا تشابه الموجود في البكتريا الأخرى .

■ ومن الإنزيمات الأخرى المشاركة والتي تستحث بالضرر الإشعاعي *ATP – dependent DNA ligase* الذي يتعاون مع بروتينات أخرى لإتمام عمليات الإصلاح في حين ان الإنزيم الأصلي *NAD – dependent DNA ligase* يقل تحت ظروف الإشعاع .

■ يتم حث العديد من ناقلات *ABC* لتساعد في تصدير نواتج التدمير التي تحصل أثناء مرحلة التنظيف .

■ تحفيز عدد من الكاينزات .

■ تشارك إنزيمات *Topoisomerases* وهي مشابه لنظيراتها في الخلايا حقيقية النواة .

■ تساهم إنزيمات لف أشرطة DNA في عمليات التصليح ، اذ يتم التعبير عن الوحدات الفرعية للإنزيم DNA gyrase .

وتشمل عمليات الإصلاح انزيمات أخرى تشارك فيها ومنها Uracil glycosylase , Thymine glycol glycosylase, DNAP I و Deoxyribophosphodiesterase , DNAP I يكون من الإنزيمات الضرورية لمقاومة الأشعة فوق البنفسجية والأشعة المؤينة ، إضافة إلى حث بعض عوامل الانتساخ مثل عامل الاستطالة Tu . كما ان هناك بعض الجينات والبروتينات الناتجة يستمر حثها على طول عملية الشفاء ومنها بروتينات SSB و 8 - oxo - dGTPase و mutT ، إضافة إلى حث مجموعة كبيرة من الجينات غير معروفة الدور .

اما نظام الاستغاثة SOS الذي يؤدي إلى إنتاج الطفرات لم تلاحظ له فعالية في الخلايا ولكن لا يعتقد انه غير موجود ولكن قد يكون فعالا عند استعمال جرعة قليلة . والتي تؤدي إلى زيادة المقاومة اللاحقة . وبما ان استجابة الاستغاثة قد لا تؤدي دائما إلى التطهير ، ولذلك فعدم حدوث التطهير في *D. radiodurans* لا يعني ان الاستجابة غير موجودة .

اما الأنظمة المؤدية إلى حدوث الأخطاء Error - prone DNA repair فهي غير موجودة - او على الأقل لم تلاحظ - وهذا يؤدي إلى عدم حدوث طفرات بعد الإشعاع المكثف بالأشعة فوق البنفسجية ، والتي تؤدي في *E. coli* إلى حدوث التطهير بمعدل 200 مرة . ومن الجدير بالذكر ان *D. radiodurans* لا تحوي على الجين Error - prone UmuC الذي يعد الأساس لاستجابة الاستغاثة في العديد من البكتريا ، ويمكن عند حصول استجابة الاستغاثة فالبكتريا يمكن ان تستعمل أنظمة مشابهة اذ انها تشفر لبروتين Lex A وهو لا يشبه الموجود في البكتريا الأخرى .

وبهذه الشبكة المعقدة والمنظمة بشكل دقيق تستطيع الخلايا التخلص من تأثير الإشعاعات لتبدأ حياتها ثانية ، فالإنزيمات المشاركة في الايض العام لا تتأثر أثناء عملية الشفاء ولكن يتم حثها بشكل اكبر في المرحلة النهائية استعدادا لاستئناف عمليات النمو التي توقفت ثم يتم التعبير عن الجينات الموجودة في مكونات جينوم الخلايا ولكن بترتيب معين ، اذ تكون البداية مع البلازميد الصغير ، ثم البلازميد الكبير ثم الكروموسوم الثاني ثم الكروموسوم الاول الكبير والرئيس .

اما الحامض النووي RNA فهو يتضرر أيضا بشكل كبير بالتشعيع ، لذلك تقوم بعض البروتينات بتفكيك الجزيئات المدمرة وتستحث الجينات المسؤولة عنه في الطور التمهيدي وتستمر أثناء عمليات الشفاء وان كان بعضها يكبح في الطور المتوسط .

وتقوم الخلايا المشبعة بإحباط الإجهاد التأكسدي بشكل كبير وربما كان ذلك محاولة من الخلايا للتغلب على الاجهاد الإضافية التي تؤثر على الجينوم للمحافظة عليه . وقد لوحظ انه في الطور

المبكر والمتوسط لعمليات الشفاء وعندما يكون الطلب على الطاقة على أوجه لدفع العمليات التخليقية والإصلاحية تقوم الخلايا بكبح دورة TCA خصوصا الخطوات المولدة للـ O_2^- . وتحاول الخلايا تقليل الطلب على الطاقة اللازمة للتخليق بحث الناقلات الغشائية لنقل البيبتيدات الخارجية وغيرها من مواد الايض التي تعتمد عليها عمليات مقاومة الإشعاع ، كما انها تزيد من التعبير عن البروتينات والإنزيمات المحللة للحوامض النووية ، لذلك فان التخليق الجديد *de novo* للحوامض الامينية والنيوكليوتيدات ومرافقات الإنزيمات تبقى بمستوى واحد او يقل على الأقل في الطور المبكر والمتوسط من أطوار الإصلاح . ويساعد في ذلك حث دورة Glyoxylate بقوة للتزويد بالعديد من المركبات الوسطية اللازمة لعمليات الشفاء بدون توليد الجذور الحرة . ومن اهم الجينات المستحثة في هذا المجال هو Transaconitate methylase وهو الجين الأكثر حثا في المراحل المبكرة من الشفاء . والمركب Transaconitate هو ليس مادة ايض طبيعية في العديد من البكتريا وانما هو موهن للإنزيم Aconitase الانزيم الرئيس في دورة TCA ويعتقد ان Transaconitate ينتج عند التشجيع . وان حث الجين الخاص بـ Transaconitate methylase يكون لازما لإزالة سمية Transaconitate.

وأثناء الطور المتأخر يبدأ حث دورة TCA ببطيء وكذلك يحث مسار EMP ثم بعد ذلك تزداد ويكون ذلك مرافقا لحث جينات الإنزيمات الخاصة بكبح الجذور الحرة مثل *sodA* , *katA* . اما من ناحية تكوين الطاقة فقد تقدم ان البكتريا تستعمل نظام V-type ATPase الذي يوفر طاقة اكبر والتي يزداد عليها الطلب أثناء عمليات الشفاء ، وتزداد عمليات تخليق الجدار الخلوي وكذلك الغشاء الخلوي وهذا متوقع والأخير يساعد في الحصول على ATP اللازم لعمليات النمو . اما الجينات المسؤولة عن ايض النتروجين وكذلك الكربوهيدرات الخارجية والداخلية فكلها يتم حثها في أوقات متأخرة . والجينات الخاصة بايض الكبريت فلا تطرأ عليها زيادة لأنها تكون محثوة بمستويات جيدة وتبقى كذلك طول مدة الشفاء التي تصل ذروتها بين 3 – 5 ساعات .

الاستجابة للجهدات

عند تعرض *D. radiodurans* للجهدات تقوم بإنتاج عدد كبير من البروتينات التي تشابه بروتينات الإجهاد في بكتريا وأحياء أخرى ، إضافة الى إنتاج بروتينات خاصة بها . واغلب جينات الإجهاد الموجودة في البكتريا الأخرى موجودة في *D. radiodurans* وعند فقدانها فإنها تقوم بالتعويض بمسارات أخرى كما في تخليق التريهاوز .

إجهاد الجفاف

توجد علاقة وثيقة بين الجفاف والتعرض لأشعة كاما . وقد وجد ان العديد من البروتينات مقاومة الجفاف موجودة في البكتريا وأثناء تعرضها للإشعاع تحث هذه الجينات او البروتينات . وفي مواجهة

إجهاد الجفاف تنتج الخلايا التريهالوز الذي يلعب دورا مهما في مقاومة الجفاف في *E. coli* وغيرها من الأحياء . وتحوي *D. radiodurans* على جينين إضافية لتخليق التريهالوز وتايضه وهي تمثل اوبرونات متحركة ربما اكتسبتها عن طريق النقل الأفقي للمعلومات نظرا لان نظائرها موجودة في *Rhizobium* التي تشاركها البيئة في التربة .

إجهاد التأكسد

تقاوم البكتريا إجهاد الأكسدة بإنتاج 3 أنواع من الكاتيليزات ، اثنان متشابهة فيما بينها وتشبه ما موجود في البكتريا الأخرى ، اما الثالث فلا يشبه البقية وإنما يشبه كاتيليزات الخلايا حقيقية النواة وخاصة الخلايا النباتية ويعتقد انها انتقلت اليها من البكتريا المثبتة للنتروجين والتي اكتسبتها بدورها من النباتات . وتحوي *D. radiodurans* على انزيم Peroxidase والذي يكون قريب الشبه لما موجود في الفطريات ، ويعتقد ان الاوبرون انتقل افقيا بشكل كامل من الفطريات .

وتحوي البكتريا على بروتينات أخرى لمواجهة الاجهادات الأخرى البعض منها يعتقد انه اكتسب من العائلة Rhizobiaceae . وتنتج البكتريا عدة بروتينات لا يعرف دورها ولكن يعتقد ان لها أدوارا مهمة في مقاومة عددا من الاجهادات ومنها الجين *mazE* , *mazF* فالأول ينظم وجود ppGpp التي تنتج بتأثير البروتين RelA او غيره من البروتينات او الإنزيمات استجابة لقلة الحوامض الامينية او إجهاد المجاعة . وقد تشارك *mazEF* في الموت المبرمج للخلايا .

وتحوي البكتريا ايضا على بروتينات الصدمة الحرارية ، البعض منها يحوي على ثمالتين من السستينين لذلك يعتقد انها تعمل في مجال إصلاح الأكسدة والاختزال ، إضافة الى احتوائها على وصيفات حاوية على جسور كبريتيدية مزدوجة . ولا تحوي *D. radiodurans* على Hsp90 والذي يكون غير مهما بالنسبة لفعاليتها وهو لا يوجد في الاركيا او البكتريا المحبة للحرارة في العموم

مسارات نقل الاشارات

ان الاستجابة للاجهادات ومنها الإشعاع لابد وان تكون هناك مسارات ومسالك لنقل إشارات الى ان تصل الى المناطق المعنية بالاستجابة والرد عليها . ومسارات نقل الإشارات في *D. radiodurans* تتسم بكونها هجينة من المكونات الموجودة في حقيقية النواة وبدائية النواة . ومثل هذا التهجين موجود في مجاميع أخرى مثل Actinomycetes و Myxobacteria وبعض البكتريا المكونة للابواغ التي تظهر فيها ظاهرة التخصص والتمايز . وتتكون وسائل نقل الإشارات من أنظمة ثنائية المكونات وفيها كائينيزات الهستيدين وجزء مستلم وكذلك Cyclicguanylate المكون من عدة أجزاء والتي تعمل كإنزيمات Cyclases , Phosphodiesterases . والأنظمة الأخيرة تتحسس بجهد الأكسدة والاختزال ، والضوء ، وغيرها من المؤشرات البيئية . والبكتريا تحوي على

Phytochromes الموجود في النباتات والبكتريا المزرقة والتي تعمل كمستلمات للضوء وتشارك في تنظيم تخليق الصبغات والتي تؤثر على المقاومة ضد العوامل المدمرة للـ DNA .

مظاهر خاصة بالبكتريا المقاومة للإشعاع

وجد في البكتريا ان هناك تضاعف وتضخيم لبعض البروتينات التي تساعد في المقاومة الكبيرة للإشعاع . ومنها Ferredoxin والذي يكون مضاعفا ايضا في الارقيا ذاتية التغذية . وتضاعف البكتريا الإنزيمات المشاركة في هدم الدهون كما هو الحال مع *Mb. tuberculosis* ، وتضاعف Cytochrome C بشكل مشابه لما موجود في البكتريا المختزلة للمعادن *Shewanella* وتتفرد البكتريا *D. radiodurans* بزيادة عدد وكمية عددا من إنزيمات Hydrolases مثل Nudix hydrolases (المذكورة سابقا) وإنزيمات Lipase / (α / β) hydrolases و epoxidase ، وإنزيمات البروتيازات مثل Subtilisin – like proteases وإنزيمات اخرى مثل Sugar deacetylases و Amino group acetyltransferases وكذلك تزداد الإنزيمات التي تشارك في عمليات تنظيف الخلية بعد عملية التشعيع . ولعل اهم الزيادات هي زيادة Nudix ومنها بروتين mut T المضاد للتطهير اذ يمنع انحشار 8-oxo – dGTP في DNA . وهناك إنزيمات مشابهة للـ mut T تستعمل عددا من مواد الأساس وهي تشكل عائلة كبيرة تعرف بـ House cleaning التي تدمر المواد الضارة وتوجد مشابهاة لها في بكتريا اخرى .

اما بروتينات نقل مجموعة الأمين المذكورة فيوجد حوالي 11 بروتين تشابه الموجودة في البكتريا الأخرى وهي تقاوم المضادات الحيوية البيبتيدية ، ويعتقد انها تساعد *D. radiodurans* في مقاومة المضادات الحيوية البيبتيدية التي تنتج من الأحياء التي تشاركها البيئة وتنافسها على مصادر الكربون والنروجين لأنها تعيش بنمط متباين التغذية .

وتستعمل البكتريا الإنزيمات العاملة في ابيض الدهون Lipase (α / β) hydrolases في تدمير المواد الدخيلة ، وتساهم الإنزيمات في تخليق معقد الغلاف الذي يحيط بالخلايا .

وتضاعف الخلايا الانزيمات والبروتينات العاملة في مجالات الحوامض النووية اذ تزيد من الإنزيمات العاملة في DNA topology والتي لها دور مهم في عمليات إصلاح DNA وكذلك تزداد إنزيمات RNA ligases المساهمة في ابيض RNA وتشارك ايضا في عمليات نقل الإشارات وتزيد الخلايا من بروتينات وإنزيمات اخرى تساهم في مقاومتها للإشعاع وغيره من الاجهادات وتكون هذه خاصة بالبكتريا وتقلل من تأثير الإشعاع وكذلك تأثير المعادن الثقيلة والمواد المطفرة مثل Mitomycin C و Methyl methane sulfonate .

وتنتج البكتريا عددا من الإنزيمات القاطعة غير موجودة في بكتريا أخرى .

تحتوي البكتيريا على عدد من البروتينات التي لها علاقة بتوليد الأمراض الموجودة في بكتيريا أخرى وكذلك في حقيقيات النواة .

وتحتوي البكتيريا على الجينات المسؤولة عن تخليق الشعيرات الجنسية ولكنها لا تكونها ولكن يعتقد ان نواتجها تشارك في عمليات الإفراز للمكونات التي تشكل التراكييب السطحية .

وهناك مظهرا اخر تتبعه البكتيريا لغرض العيش تحت الظروف غير الطبيعية وهو ربط عدة أجزاء من البروتينات في بروتين واحد يقوم بعدة وظائف مما يؤدي الى التعاون بين الوظائف وسهولة عمليات التنظيم اذ يسهل مثلا تغير تخصص مواد الأساس التي تعمل عليها ، وهذا الربط يعد نوعا من انواع التطبع للعيش بنمط حياتي غير شائع . فتحوي *D. radiodurans* على أكثر من 20 بروتين لها أكثر من جزء فعال وهذا الارتباط غير الطبيعي لا يوجد في الأحياء الأخرى ومن أمثلة ذلك ارتباط Nudix hydrolase مع الإنزيم Methyl transferase وإنزيم Cytosine deaminase ، وكذلك ارتباط Endonuclease مع Helicase . وارتباط (α / β) hydrolases مع Flavin – containing monooxygenase فالبروتين الاخير يقوم بفعالية تحليل المواد الدخلية وفعالية Oxygenase ، والاثنان يعملان في مسارات الايض الثانوي والتعامل مع المركبات البيئية .

وهناك تشكيلة أخرى من اندماج البروتينات مثل ربط din وهو بروتين ثنائي التركيب يحدث في الظلام مع sen1 المسئول عن الهرم Senescence وتربط البكتيريا هذين البروتينين بأحد بروتينات الصدمة الحرارية . وتربط البكتيريا ايضا بروتينات بعض الإنزيمات مثل Phosphatases مع بروتينات Polynucleotide kinases .

وكل هذه المذكورة وغيرها الكثير تعد من المظاهر الفريدة لمكنون البكتيريا البروتيني *Deioncoccus proteome* الذي تم تحديده واكده تحديد مكنون النسخ Transcriptome .

بكتيريا *D. geothermalis*

بكتيريا تعود الى الجنس *Deinococcus* قريبة من البكتيريا *D. radiodurans* ، وهي محبة للحرارة وقد زاد الاهتمام بها لاستعمالها في علاج التلوث الإشعاعي ، حيث ترتفع الحرارة في المناطق الملوثة نتيجة لتفكك الانوية المشعة ، ففي مثل هذه المناطق تتفكك المواد مثل ^{90}Sr ، ^{137}Cs لترتفع الحرارة الى 70° م عند عمق 18 م او أكثر ، وعندها تصبح *D. radiodurans* غير ملائمة لأنها تنمو بحرارة اقل من 39° م .

والبكتيريا قادرة على اختزال عدد من المعادن Hg^{2+} ، Cr^{6+} ، U^{6+} ، Fe^{3+} بدرجات حرارية عالية 55° م وبوجود إشعاع بمستوى 1500 راد / ساعة ، وتعد البكتيريا من الاحياء المحبة للإشعاع

Radiophiles ويمكن ان تعيش عند حرارة عالية ووجود الإشعاع المزمن ، والجرع العالية من الاشعاع لا تؤدي الى حدوث الطفرات فيها .

وقد اختبرت *D. geothermalis* التي تم تسجيلها عام 1997 لأنها محبة للحرارة ولان لها قابلية عالية على التحول الوراثي ، ووجد ان معظم أنظمة الهندسة الوراثية المستعملة في البكتريا *D. radiodurans* يمكن ان تعمل فيها ، وعليه هندست وراثيا لعدد من القابليات .

واستعمل البلازميد pMD66 الموجود في *E. coli* وهو بلازميد يتضاعف ذاتيا يحمل صفة المقاومة للكاناميسين Kan^r والنتراسايكلين Tet^r والاميسيلين Amp^r واشتقت منه نواقل تحمل صفات اخرى مثل مقاومة الزئبق من *mer operon* (من *E. coli*) الذي يشفر لمقاومة ايون الزئبقيك واختزاله ، ويحوي ايضا على جين *TolC1* من بكتريا *Pseudomonas* والذي يفكك التولوين جزئيا واستعمل الناقل بنجاح في البكتريا *D. geothermalis* ويمكن للناقل ان يوجد في البكتريا بعدة نسخ .

وتحويل السلالات والأنواع لجنس *Deinococcus* تكون محدودة وذلك لان عملية التثقيب الكهربائي تكون غير مجدية لسمك جدرانها الخلوية ، اما عملية دمج الجبيلات *Protoplast fusion* فتكون غير مجدية ايضا وذلك لصعوبة تحضير الجبيلات منها ، إضافة الى صعوبة استعادة تخليق الجدار الخلوي في الخطوات اللاحقة . ولكن أفضل طريقة هي إجراء عمليات التحول وإدخال النواقل ، وتكون قابلية التحول في *D. geothermalis* أكثر من *D. radiodurans* .

وقد وجد ان السلالات المحولة من *D. geothermalis* يمكن ان تؤدي العديد من الوظائف التي نقلت اليها مثل اختزال ايون ألزئبقيك وتحويله الى عنصر الزئبق المتطاير Hg^0 عند النمو بدرجة حرارة 50 °م وبوجود مستوى إشعاع يصل الى 5000 راد / ساعة وبتكرير زئبق يصل الى 50 مايكرومول وهو اكثر من المسجل في مناطق التلوث الذي يبلغ 10 مايكرومول .

وإضافة الى ما ذكر من مزايا *D. geothermalis* مقارنة بمواصفات *D. radiodurans* ، فان ايض الأولى يكون اكثر قوة فعند غياب الإشعاع ويكون النمو غير معتمدا على الحوامض الامينية من البيئة المحيطة ويمكن للخلايا النمو على ايونات الامونيوم والمركبات الوسطية لدورة TCA ، اما عند وجود الإشعاع فهي اقل اعتمادا على الحوامض الامينية الحاوية على الكبريت (السستئين والميثايونين) والحوامض الامينية الاخرى من المصادر الخارجية مقارنة بالبكتريا *D. radiodurans* ، وهذا يعني انها يمكن ان تنمو في بيئات فقيرة من الناحية الغذائية التي لا تستطيع تدعيم نمو *D. radiodurans* .

كل هذه المواصفات ترجح كفة استعمالها على *D. radiodurans* لمعالجة الفضلات النووية ، ويمكن زيادة مواصفاتها في التحمل بإدخال البلازميدات دون تفقد ان هذه البلازميدات او تظهر فيها

الطفرات ، كما ان زيادة عدد نسخ البلازميدات التي لوحظت في *D. geothermalis* بعد إدخالها تشير الى إمكانية وجود مواد أساس لغرض إجراء عمليات إصلاح كفوءة بواسطة التأشب المتجانس .

والحقيقة ان ما يشجع المعالجة الحيوية للخطر الإشعاعي ان هذه البكتريا (*D. geothermalis* و *D. radiodurans*) هي البكتريا الخضرية الوحيدة التي تكون مقاومة للإشعاع وهي مطواعة جدا لعمليات الهندسة الوراثية . ويمكن استعمال باقي أفراد الجنس في معالجة الإشعاع وان بطريقة غير مباشرة مثل استعمالها كمضاييف لتكثير البلازميدات والحصول على بعض المشتقات التي تساعد في هندسة وإنتاج سلالات كفوءة .

إطلاق الأحياء المهندسة وراثيا الى البيئة

التطورات التي حدثت في التقنيات وازدياد المعلومات الجزيئية في علوم الحياة أدت الى تطوير احياء وانزيمات يمكن ان تستعمل في المعالجات الحيوية ، كما انها أدت الى توفير المعلومات حول المجاميع الميكروبية في المناطق الملوثة لتسهيل الوصول الى أفضل الوسائل للمعالجات ، ولكن عملية إطلاق الأحياء المهندسة وراثيا جوبهت بالتقييدات الكثيرة على إطلاق مثل هذه الأحياء الى البيئة كما هو الحال في استعمالها في نواحي أخرى من الحياة . واستعمال الأحياء المهندسة وراثيا تتجاذبها الآراء المتفائلة والمتشائمة ، وتغلب الأخيرة في العديد من الأحيان . وهناك أعدادا كبيرة من الأحياء التي هندست لغرض إطلاقها الى البيئة ، وكل مصمم لمسار وراثي يرنو الى استغلال إمكانيات الخلايا لأبعد حد ممكن ، وقد قامت الجهات المختصة بوضع تصنيف للأحياء المهندسة ودرجة خطورتها التي تحدد إمكانية إطلاقها :

- الدرجة الأولى ، وتمثل الأحياء التي ليس لها خطورة على الأحياء الأخرى مثل الإنسان او الحيوان والنبات والتنوع الحيوي ، ويكون ضررها غير محتمل فهذه تعد أمينة الاستعمال ويسمح بإطلاقها .
- الدرجة الثانية ، عندما يكون الخطر او الضرر محتمل الوقوع ولكن لا يشكل خطرا على الأحياء الأخرى ، ويحدث الخطر في مواقع الاستعمال ، والأخطار يمكن ان تتراجع بشكل تلقائي بالاعتماد على مرونة البيئة وقابليتها على الرجوع ، او تكون الأخطار من النوع الممكن السيطرة عليه بالإمكانات المتوفرة ، فهذه الأحياء يكون انتشارها قليل الاحتمال فيسمح بإطلاقها تحت شروط .
- الدرجة الثالثة وهي الأحياء التي تولد الأخطار وتؤثر على الأحياء الأخرى والتنوع الحيوي ، ولكن احتمال انتشارها الى مناطق بعيدة عن مناطق الاستعمال يكون ضئيل جدا ، فهذه تطلق عند توفر إمكانيات معاملتها ومنع أخطارها .

● الأحياء التي تؤدي الى أخطار على الأحياء وتؤثر على التنوع الحيوي سواء في مناطق استعمالها وخارجها فمثل هذه لا تكون هناك احتمالية لمنع أخطارها ولا يصرح باستعمالها .

وهناك عدة جوانب يمكن مناقشتها في هذا الموضوع :

▲ عند إطلاق الأحياء المهندسة وراثيا (والأكثرية من البكتريا) فإنها يمكن ان تفترس من قبل أحياء أخرى خاصة في التربة ، وهذه عملية مكلفة ، والجهات التي تطلق الأحياء تبتغي ان تؤدي الأحياء مهمتها ثم تختفي ولكن ذلك لا يحصل دائما .

▲ ان عملية الهندسة بحد ذاتها تجعل الخلايا تحت الإجهاد ، ومثلما ذكر سابقا فان الاجهادات تؤدي الى تخليق البروتينات الوصيفة وبروتينات الصدمة الحرارية . وقد اتضح ذلك من تنمية الخلايا المهندسة تحت ظروف انعدام الإجهاد ولكنها كانت تنتج بروتينات الإجهاد فمثلا خلايا *E. coli* التي نقل إليها جين إنتاج الإنزيم غير الذائب α -glucosidase من خميرة الخبز ونميت تحت ظروف ملائمة وجد بعد 3 ساعات ان هناك عددا من بروتينات الإجهاد مرتبطة بتجمعات بروتين الإنزيم الناتج . وكذلك الحال مع *E. coli* التي استخدمت لإنتاج مواد أخرى غير البروتينات مثل PHB (Poly (3- hydroxyl butyrate)) وتستطيع الخلايا المهندسة إنتاج كميات كبيرة من PHB وتجميعها في الخلايا ، ولكن هذه الخلايا تغير التعبير فيها عن 20 جين منها 3 خاصة ببروتينات الإجهاد وهي GroEL , GroES , DnaK التي تزداد كمياتها في الخلايا وهذا يعني ان تجميع PHB داخل الخلايا يشكل عامل إجهاد ، ولذلك فان الخلايا توقف عمليات تخليق البروتينات العادية وتتجه لتخليق البروتينات الحامية ، ويبدو ان هذه الاستجابة ناتجة من تغيير البيئة الداخلية للخلايا الناتجة من قلة محبة الماء للسايتوبلازم نتيجة لتجمع المواد الغريبة غير الذائبة .

وهذا يعني ان الأحياء المهندسة تكون مجهدة دون وجود ظروف إجهاد ومثل هذه الخلايا عندما تدخل الى البيئة وتعاني من اجهاداتها فهي تحتاج الى استعادة وضعها الفسلجي الطبيعي ، لذلك ربما اكتسبت مقاومة عامة وزادت من قابلية تطورها أي حدوث الطفرات فيها . وقد لوحظ هذا فعلا عند استعمال أنظمة تعتمد على نقل البلازميدات لنقل جينات تخليق الهستيدين من البكتريا *Az. brasilienses* الى *E. coli* (طفرات عوز غذائي للهستيدين) ، فتحت الإجهاد الشديد من نقص للهستيدين تتغير البلازميدات وهذه التغيرات يمكن ان تحصل في البلازميدات والكروموسومات . فتحت مثل هذه الظروف يحصل إعادة ترتيب للجينوم ويؤدي الى ظهور الطفرات ، وتظهر مثل هذه الطفرات تحت ظروف إجهاد أخرى . وظهور الطفرات في الأحياء المهندسة في البيئة هي حالة غير مرغوب فيها .

ولذلك فان الأحياء المهندسة وراثيا هي أصلا مجهدة بواسطة المعلومات الوراثية التي أدخلت إليها وذلك من ملاحظة زيادة محتوياتها من بروتينات الإجهاد تحت الظروف الطبيعية والتي تؤدي

الى تغيرات كبيرة في جينومها . ومن الطبيعي افتراض ان إطلاقها الى البيئة سيعرضها الى اجهادات إضافية مما يؤدي الى ظهور الطفرات المتطبعة وحالة تضخم التطبع (يراجع فصل السادس) ، وذلك محاولة منها لزيادة عبوسيتها وبقائها ، فبدلاً من ان تموت تقوم بالتطور والعيش اذ ان عملية التطور تزيد من قابليتها التنافسية على مواد الأساس البديلة (أي غير الملوثات) المتوفرة في البيئة بشكل طبيعي وسيزيد هذا من احتمالية بقاءها في البيئة .

ومن جهة ثانية فان الخلايا المهندسة تحمل الجينات المطلوبة على بلازميدات وتكون الجينات عادة ذات إنتاجية مفرطة وهذا يعني ان الخلايا محملة أكثر من طاقتها وهذا يقلل من فرص عيشها وبقائها في البيئات الجديدة حتى وان زودت بإمكانيات أكثر للنمو من الخلايا الخالية من البلازميدات . ووجد بالتجارب ان هناك قلة في ملائمة الخلايا الحاملة للبلازميدات عند غياب المجال الذي يعمل فيه البلازميد ، كما ان الخلايا لا تكون مستعدة لحمل كلفة وجود البلازميدات الموجودة فيها كل هذه الاسباب ستؤدي الى :

- o اما اكتسابها مقاومة عامة وتدخل طور الاستقرار .
- o تحدث فيها حالة التطفر العالي او الفائق ويموت اغلب الأفراد المجتمع ، والحالتين يسيطر عليها بـ δ^S .

وفي الحالتين تكون الخلايا بين الانتظار لتحسن الظروف او الدخول المسلك الزلق وهو حدوث التطفر الفائق الذي مر ذكره . ولذلك فان حسن إعداد الأحياء المهندسة وراثيا سوف يمكن من الاستغلال الأمثل ، ومنها تعطيل جينات *rec* العاملة في التأشب المتجانس وكذلك جينات *rpoS* المسؤولة عن تقليل فعالية نظام MMR وحث العامل δ^S وهذا يقلل من الأخطار المتعلقة او المرتبطة بعمليات التحويل الوراثي للميكروبات في نظام بيئي مفتوح .

فالخلايا المطلقة الى البيئة المطلوب منها ان تقوم بمهمة التخلص من المواد الملوثة ويكون ذلك ممكنا باستعمال نظام الاحتواء المعتمد على استعمال الجينات القاتلة التي تعمل في البيئة عند وجود المواد المحفزة للمهدات المستعملة ثم تنخرط الخلايا في مسار الانتحار (Suicide pathway) عند انتهاء المواد المحفزة . وبذلك يمكن التحكم بعمليات تكاثرها غير المسيطر عليها وكذلك التحكم بعمليات الانتقال الأفقي للجينات ، ولذلك توضع الأحياء المهندسة في نماذج بيئية مصممة لتشابه البيئات الطبيعية وتقاس قابليتها للتطفر الفائق ودراسة كل المؤشرات الممكنة قبل إطلاقها الى البيئة الطبيعية .

الانتقال الأفقي للجينات : ويعد من المخاطر التي تشكلها الأحياء المهندسة وراثيا في كافة المجالات وهو انسياب الجينات الى النظام البيئي والذي يعد من أهم الأخطار على المدى البعيد نظرا لاحتمالية تغييره للتنوع الحيوي .

فانتقال الجينات الأفقي أصبحت الشغل الشاغل للمختصين في مجال السلامة الحيوية ، فانتقال الجينات المقاومة للمضادات الحيوية والتي تستعمل كواسمات انتخاب في الأحياء المهندسة وراثيا يمكن ان تنتقل بين الأحياء وهذا يؤدي الى انتشار المقاومة غير المرغوب فيها ، إضافة إلى أنها تؤدي الى تطور الأحياء الميكروبية بشكل لا يناسب الحياة . فمن المعروف ان التطور وكما أشارت دراسة تحليل الجينومات يسبقه عادة نقل أفقي للجينات وانسياب الجينات بين الأنواع والأجناس المختلفة ، ومما يزيد في ذلك ان عمليات التأشب في البلازميدات - التي تستعمل في الهندسة الوراثية - تكون بمعدلات أعلى من تلك التي تحصل في الكروموسومات .

عدم كفاءة الأحياء المهندسة وراثيا : بالإضافة الى ما ذكر اعلاه من التوجهات التي تسلكها الاحياء المهندسة المطلقة الى البيئة ، فقد وجد ان الاحياء يمكن ان تولد مواد سامة وراثيا لعدم اكتمال عملية تفكيك الملوثات خاصة عندما تكون في التربة او المياه الحاوية على خليط من الملوثات ، كما ان بعض الأحياء هندست بشكل غير مخطط لعملية تفكيك حيوي متكامل وتحت ظروف مختلفة . فمثلا عند تفكيك مركبات النفط الحلقية في التربة فان انخفاض الأوكسجين يؤدي الى عدم اكتمال التفكيك او تجمع مواد الايض خاصة الحامضية في محيط الخلايا كله يؤدي الى عرقلة وانخفاض قابلية التفكيك الحيوي ، وبذا فان المواد السامة في البيئة يمكن ان تقل ولكن لا تختفي ، اذ أثبتت الفحوص المستعملة مثل نظام أيمس في البكتريا *Sal. typhimurium* بوجود وغياب نظام التنشيط الايضي *S_o* وكذلك استعمال فحص تكون النواة الصغيرة في الفطر *Tradescantia* الى وجود مواد سامة وراثيا *Genotoxic* في المناطق المعاملة بالاحياء المهندسة وراثيا .

ولكن عند هندسة الاحياء يمكن في بعض الاحيان معالجة الجوانب الثانوية وذلك بتعطيل بعض الجينات إضافة الى التحويل الأساسي ، ومنها :

- تعطيل جينات *rpoS* (δ^S) وبذلك لا تتعرض الخلايا الى تحسس الزحام ، ولا تطور قابلية تحمل الإجهاد وتكون غير قادرة على تخميد وإحباط نظام MMR ، وذلك لان إحباط النظام الجيني يمكن ان يؤدي الى قلة عيوشية الخلايا ولكنه يحد من انتشارها في البيئة وكذلك يحد من ظاهرة التطفر العالي او المفرط ، كما انه يقلل من احتمالية انتقال الجينات الافقي بين الأنواع .
- تعطيل النظام الجيني *recABCD* وهذا يقلل من عمليات التأشب المتجانس وكذلك يقلل من ظهور حالة التطفر المفرط ويمنع انتشار الجينات بين الأنواع .
- تعطيل الجين *recA* الذي يؤدي الى إلغاء استجابة الاستغاثة وما يتبعها من حصول الطفرات وحالة التطفر العالي ويحد أيضا من انتشار الجينات بين الأنواع .
- تعطيل الجين *dnaK* الخاص بتخليق *Hsp70* وهذا يقلل من ظاهرة التحمل ويمنع عمليات تحرك الجينات القافزة ولكنه يؤدي الى انخفاض عيوشية الخلايا .

أمثلة على الأحياء المهندسة وراثيا المستعملة

أكثر الأحياء التي هندست وراثيا لأغراض بيئية هي جنس البكتريا *Pseudomonas* لما لهذه البكتريا من سعة اىضية كبيرة ومقاومة طبيعية وغيرها من المؤهلات ومن استعمالاتها :

■ استعملت البكتريا *Ps. syringae* التي تكون بلورات ثلجية على النباتات في المناطق الباردة والتي تستعمل في رش صالات الترحلق على الجليد ، هندست الخلايا وصممت بحيث لا تستطيع توليد البلورات الثلجية لترش على النباتات وتنافس الأحياء الطبيعية وتحمي النباتات الحساسة للجليد .

■ استعملت البكتريا *Ps. putida* HK44 في المعالجة الحيوية ، وتحتوي السلالات المستعملة على البلازميد المسئول عن تفكيك النفثالين وجين *lux* للوميض الحيوي والمطفر باستعمال جين قافز ، وفيها ادمج جين الوميض مع مهده جين تفكيك النفثالين ، وميزة وجود الوميض الحيوي للإشارة الى إمكانية تفكيك المواد الملوثة وتايضها من قبل السلالات المهندسة . ولكن السلالات لم تكن قادرة على التنافس مع الأحياء الطبيعية ، إضافة الى عدم إمكانية العمل في بيئة تحوي على خليط من الملوثات .

■ استعملت سلالات *Ps. putida* و طورت عمليات هندستها لتحوي على عناصر او دوائر للاحتواء الحيوي (ABC) (Active Biological Containment) لتفكيك التلوين المحمولة جينات تفكيك على البلازميد *Tol plasmid* ، وهذه الخلايا تنمو عند وجود الملوث وتقوم بتفكيكه وعند غيابه تحث عملية الموت ، ولكن كانت هناك بعض المعوقات لاستعمالها منها :

- معدل موت الخلايا في البيئة يكون بطيئا .
- ظهور طفرات بمعدل 10^{-8} / خلية / جيل والتي لا تموت بعد استهلاك المواد الملوثة واختفائها اذ أمكن تسجيلها بعد 100 يوم من اختفاء الملوث .
- لذلك أجريت بعض التحسينات على الخلايا بحيث كانت لا تنمو الا بوجود مواد غذائية معينة من الحوامض الامينية و Diaminopimelic acid فقلت الطفرات التي تستمر بالحياة الى 10^{-9} / خلية / جيل ، واختفت السلالة بعد 20 – 25 يوم من التربة .

التقنية الحيوية الميكروبية في مجالات الطب

الصفحة	الموضوع
417	المضادات الحيوية
423	المضادات الحيوية النباتية
428	مقاومة المضادات الحيوية
436	تقليل المقاومة والتوجهات الحديثة
441	الأغذية العلاجية
443	صفات الأحياء العلاجية
445	الأحياء العلاجية والجهاز المناعي
455	الببتيدات العلاجية
457	الببتيدات الحيوية في منتجات الحليب
458	تأثير الببتيدات الحيوية على المناعة
459	الببتيدات المخفضة لضغط الدم
461	الببتيدات المخدرة
463	عمليات التصنيع
463	التجفيد
464	التجفيف بالرداذ
466	اللبن
468	اليوكالت
469	الاجبان العلاجية
470	الأغذية الشرقية المتخمرة
472	مستقبل الاغذية العلاجية
475	Oxalobacter
476	السرطانات
476	جينات السرطان الخلوية
477	فيروسات السرطان
481	العلاجات المقترحة لمعالجة السرطان
484	استعمال السموم في العلاج
486	بعض تطبيقات الهندسة الوراثية في مجالات الطب
488	المجسات
489	انتاج مانع تخثر الدم

التقنية الحيوية الميكروبية في مجالات الطب

ترتبط التقنية الحيوية الميكروبية بعلاقة كبيرة مع المجالات الطبية وقد يكون توجه العلاقة ايجابيا او سلبيا . الهندسة الوراثية متعلقة بشكل كبير بالمجالات الطبية وقد حصلت اغلب التطورات في المجال الطبي اذ وجدت صناعة إنتاج البروتينات العلاجية والمهرمونات وغيرها ، واغلبها يتم في مزارع الخلايا الحيوانية او عمليات التحول الحيوي بواسطة الخلايا النباتية ، ونظرا لان المجالات المذكورة خارج نطاق موضوع الكتاب لذا سيتم التركيز على ما يتعلق بالاحياء المجهرية .

المضادات الحيوية

التعريف التقليدي لها ، هي مواد ايض ثانوي تنتجها بعض الاحياء للتنافس مع احياء أخرى توجد في البيئة التي تشغلها في أكثر الأحيان . ويرتبط إنتاج المضادات الحيوية باعتبارها مواد ايض ثانوي بانخفاض معدلات النمو ، وتكونها بعض الاحياء عند عملية التبروغ ، كما ان النباتات تكون مضادات ميكروبية استجابة للظروف البيئية . وتوجد عدة توجهات لتصنيفها (يراجع الفصل الخامس) .

بدأ عصر المضادات للأحياء في النصف الأول من القرن الماضي . وأول اكتشاف واستعمال كان للبنسيلين الذي ينتجه الفطر *Penicillium notatum* ثم تحول إنتاجه من *Pen . chrysogenum* للأغراض التجارية الموسعة ، وزادت الدراسات ومجالات البحث عن مواد جديدة ولا زالت ، وسميت الأدوية ذات الأصل الميكروبي بالمضادات الحيوية Antibiotics وتطور إنتاج العديد من المضادات ويضطلع جنس *Streptomyces* البطيء النمو بالحصة الأكبر من الإنتاج للمضادات المستعملة في العلاج لمكافحة الأمراض والجدول (28) يوضح بعض المضادات والاحياء المنتجة لها .

جدول 28 : بعض المضادات الحيوية والاحياء المنتجة لها

الكائن المنتج	المضاد الحيوي	موقع التأثير
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycin	منع تخليق البروتينات بالتأثير على وحدة الرايبوزوم الصغيرة
<i>S. fradiae</i>	Neomycin	
<i>S. aureofaciens</i>	Tetracyclines	
<i>S. spectabilis</i>	Spectinomycin	
<i>Micromonospora purpurea</i>	Gentamycin	
<i>S. tenebrarius</i>	Tobramycin	
<i>S. pactum</i>	Pactamycin	
<i>S. kanamyceticus</i>	Kanamycin	
<i>S. erytherus</i>	Erythromycin	منع تخليق البروتينات بالتأثير على وحدة الرايبوزوم الكبيرة
<i>S. halstidii</i>	Carbomycin	
<i>S. venezuelae</i>	Chloramphenicol	

<i>S. lincolnesis</i>	Lincomycin	منع وتدمير الجدران الخلوية
<i>S. graminofaciens</i>	Streptogramins	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicillins	
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Cephalosporins	
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacitracin	
<i>S. orientalis</i>	Vancomycin	
<i>S. garyphalus</i>	Cycloserine	
<i>B. polymyxa</i>	Polymyxin	تدمير الأغشية الخلوية
<i>B. brevis</i>	Tyrothricin	
<i>B. brevis</i>	Gramicidin S	
<i>S. mediterranei</i>	Rifampin	منع تخليق الحوامض النووية
<i>S. niveus</i>	Novobiocin	

وقد تعرضت عمليات إنتاج المضادات الحيوية الى عمليات تطوير وتحسين من حيث الأوساط الغذائية المستعملة لتنمية الاحياء المنتجة ، وطرق الاستخلاص وتحسين السلالات المنتجة وإنتاج المضادات شبه التركيبية وغيرها من الجوانب

آليات تأثير المضادات الحيوية

كما موضح في الجدول (والفصل الخامس) ان هناك أكثر من هدف يمكن للمضادات العمل عليه . واهم ميزة في المضادات الحيوية وحتى المواد الكيميائية التي يجاز استعمالها في العلاج هو السمية الانتقائية Selective toxicity ، فالمضاد الجيد هو الذي له انتقائية عالية بحيث يؤثر على الكائن الممرض المستهدف دون التأثير على المضيف ، وفي العديد من الاحيان تكون السمية الانتقائية نسبية وليست مطلقة ، واهم العوامل المؤثرة في ذلك هو التركيز . وتعتمد السمية الانتقائية على وجود المستلمات او المجاميع التي تتفاعل مع المضاد على سطوح الخلايا الممرضة ، تليه في الأهمية قابلية المضاد على منع حدوث تفاعلات او مسارات كيموحيوية في الاحياء الممرضة وليس المضيف . واهم الخطوط العريضة لتأثير المضادات تقع في احد المجالات الآتية :

- تثبيط تخليق الجدران الخلوية للاحياء الممرضة .
- التداخل مع وظائف الأغشية الخلوية .
- تثبيط تخليق البروتينات .
- تثبيط تخليق الحوامض النووية

تثبيط تخليق الجدران الخلوية

يعد المركب البيبتيدوكلايكان خاصا بالبكتريا لذلك فهو يوفر انتقائية عالية جدا ، وهناك بعض المضادات التي تؤثر عليه . وصلابة المركب تعتمد على الاتصالات العرضية المكونة من البيبتيدات

التي تتكون بواسطة تأثير عددا من الإنزيمات المشاركة في تفاعلات Transpeptidation reactions لتكون في اغلب الأحياء أوأصر Pentaglycine bonds ، وطبقة البيبتيدوكلايكان أكثر سمكا في البكتريا الموجبة لصبغة كرام منها في البكتريا السالبة لصبغة كرام ، لذلك فالمضادات مثل البنسيلينات تكون أكثر تأثيرا في الأولى .

♦ أدوية البتا – لاكتام β - Lactams

تنشط تخليق الجدران الخلوية في البكتريا والتي هي في حالة نمو وتمثل واحدة من تأثيرات هذه المجموعة وهي التي درست بشكل مفصل . وتكون آلية تأثيرها بعدة خطوات :

- ارتباطها الى المستلمات الخلوية وهي البروتينات الرابطة للبنسيلين (Penicillin) PBPs (binding proteins) ويوجد حوالي 3 – 6 أنواع ، أوزانها الجزيئية تتراوح بين 4 – 12 x 10⁵ والبعض منها إنزيمات نقل البيبتيدات ، وللمستلمات ألفة مختلفة للارتباط بالأدوية ولذا تظهر تأثيرا مختلفا ، فمثلا ارتباط البنسيلين الى احد المستلمات يمكن ان يؤدي الى استطالة الخلية ، وآخر يؤدي الى تحلل الخلايا . والبروتينات الرابطة للبنسيلين هي تحت السيطرة الكروموسومية في اغلب الاحيان وحدث الطفرات يمكن ان يؤدي الى تغيير عددها او كمياتها او الفتها نحو مضادات اللاكتام .

- بعد الارتباط الى المستلمات يحدث منع لتفاعل نقل البيبتيدات Transpeptidation ويغلق تخليق البيبتيدوكلايكان ، يلي ذلك إزالة او تثبيط الإنزيمات المحللة الذاتية في الجدار ، ولكنه يؤدي الى نشاط الإنزيمات المحللة للخلايا في البيئات المتوازنة تنافذيا ، اما في البيئات ذات الضغط التنافذي العالي فان الجبيلات Protoplasts الناتجة من البكتريا الموجبة لصبغة كرام و Sphaeroplasts الناتجة من البكتريا السالبة لصبغة كرام يمكن ان تبقى حية خلايا هشة وتستمر الفعاليات الأخرى مثل تخليق البروتينات والحوامض النووية وغيرها لمدة من الزمن .

ان تثبيط البنسيلينات والسيفالوسبورينات Cephalosporins لإنزيمات نقل البيبتيدات ربما يعود الى تشابه المضادات مع مادة الأساس للإنزيمات (Acyl - D - alanyl - D - alanine) ممل يؤدي الى فقدان الأخير من السلسلة البيبتيدية الخماسية التي تكون الاتصالات العرضية . والاختلاف في تأثيرها في البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام يشير الى اختلاف تراكيب الجدران مثل كمية البيبتيدوكلايكان ، ووجود المستلمات ، والدهون وطبيعة الاتصالات العرضية وفعالية الإنزيمات المحللة الذاتية وكل هذه تؤثر على نفوذ المضاد وارتباطه وفعاليته .

♦ Novobiocin يثبط تخليق حامض التيكويك ، لذلك فهو يثبط البكتريا الموجبة لصبغة كرام الحوية عليه .

♦ ومن المضادات الأخرى المؤثرة على الجدار الخلوي Cycloserine , Vancomycin .

بعض المضادات تؤثر على عمليات تخليق الجدران الخلوية في مراحل مبكرة التي تتم في السايكوبلازم لذلك كان لابد للمضادات ان تدخل الخلايا لممارسة دورها ومنها , Bacitracin , Teicoplanin , Vancomycin , Ristocetin .

التأثير على الأغشية الخلوية

يعد الغشاء الخلوي الحد الفاصل بين الحياة داخل الخلية والبيئة غير الحية خارجها ، ويساهم في الحفاظ على البيئة الخلوية بشكل متوازن نظرا لنفاذية ونضوحيته الانتخابية ، وعند تدمير الأغشية الخلوية واضطراب سلامتها الوظيفية تخرج الجزيئات الخلوية والايونات مؤدية الى الإضرار بالخلية وربما موتها .

تختلف الأغشية الخلوية في البكتريا عنها في الفطريات واللبائن لذلك كان من السهل تدميرها دون التأثير على المضيف مقدمة بذلك أهداف انتقائية فمثلا مضادات Polymyxins تؤثر على البكتريا السالبة لصبغة كرام اذ تدمر المركب Phosphatidylethanolamine ، في حين ان Polyenes تؤثر في الفطريات اذ ترتبط الى الستيرويدات التي توجد في أغشية الخلايا الفطرية ولا توجد في الخلايا البكتيرية .

كما ان المنظفات والمضادات المشابهة والتي تحوي على مجاميع محبة للماء واخرى كارهة للماء يمكن ان تؤدي الى اضطراب الأغشية الخلوية وبالتالي قتل الخلايا .

اما المضادات الحاملة او الناقلة للايونات Ionophores تؤدي الى اضطراب وظائف الأغشية الخلوية وذلك لانحسارها في تركيب الغشاء مما يؤدي الى حركة وانتشار ايونات معينة ، فمثلا المضاد Valinomycin يساعد في نقل ومرور ايونات البوتاسيوم . ان انحسار مثل هذه المضادات الحيوية يمكن ان يؤدي الى تكوين قنوات أيونية كما في المضاد المذكور ، او تكون ممرات وثقوب محبة للماء مما يسهل مرور الجزيئات الخلوية . ومضادات اخرى تكون بمثابة مواد حاملة للمواد الذائبة في الدهون .

وحاملات الايونات بتأثيراتها المذكورة اعلاه يمكن ان تقتل الخلايا بتأثيرها على الجهد الكهربائي الغشائي الذي يكون ضروريا لعملية الفسفرة التأكسدية وغيرها من الوظائف المتعلقة بالجهد الكهربائي الغشائي . وبعضها لا تكون متخصصة وانما تكون عامة للأغشية الخلوية لذلك لا تستعمل نظرا لسميتها في الإنسان والحيوان .

مضادات تثبيط تخليق البروتينات

هناك عددا كبيرا من المضادات التي تؤثر على تخليق البروتينات وذلك لان العملية معقدة جدا وهناك مسارات ومعقدات تتم بواسطتها ، فهي تشكل أهدافا جيدة لمهاجمتها . وتختلف تأثيرات المضادات في الأحياء بدائية النواة التي تكون رايبوزوماتها 70S في حين تكون في حقيقية النواة 80S . كما انها تختلف بشكل كبير في الوحدات الفرعية وتركيبها الكيميائي ووظائفها الخاصة وغيرها من الاختلافات

وهذا ما يوضح الاختلاف في تأثير بعض المضادات في البكتريا في حين لا تؤثر في عمليات تخليق البروتينات في حقيقة النواة .

• مضادات Aminoglycosides ومنها الستربتومايسين الذي درس بتفصيل أكثر من غيره والذي ربما تشابهه في التأثير وآلية العمل عددا من المضادات الأخرى ، وتبدأ فعاليته بارتباطه إلى بروتين مستلم P_{12} الخاص للارتباط بالستربتومايسين وهو أحد بروتينات الوحدة الصغيرة 30S من وحدات الرايبوزوم وبذلك يغلق تكوين معقد البدء لعملية الترجمة المكون من (tRNA + formyl - methionine - mRNA) ويؤدي إلى خطأ قراءة الرسالة الموجودة على mRNA على الرايبوزوم ويتم إدماج حامض أميني غير صحيح في الببتيد وبالتالي إنتاج بروتين غير فعال . ويؤدي ارتباط المضاد إلى كسر أو تفريق تجمع الرايبوزومات Polysomes وجعلها بشكل وحدات متفرقة وينتهي بقتل البكتريا .

• التتراسايكلينات ترتبط إلى الوحدات الصغيرة من الرايبوزومات وتمنع تخليق البروتينات بغلق ارتباط tRNA المحمل بالحامض الأميني (Aminoacyl - tRNA) وبذلك تمنع دخول حامض أميني جديد إلى السلسلة الببتيدية الناشئة ، وتأثير المضاد قابل للرجوع إذ تعود الخلايا لتخليق البروتين عند سحب المضاد .

• أما مضادات Macrolides و Azalides ومنها الأثرثرومايسين و Azithromycin Clarithromycin فترتبط إلى الوحدة الكبيرة من الرايبوزوم 50S وخاصة إلى جزيئة 23S rRNA ويمكن أن تتداخل مع تكوين معقد البدء ، وكذلك تتداخل مع تفاعلات Aminoacyl translocation . وتشابهها في التأثير وآلية المقاومة مضادات اللنكومايسين .

• يرتبط مضاد الكلورومفينيكول إلى الوحدة الرايبوزومية الكبيرة ويتداخل مع ارتباط الحامض الأميني الجديد إلى السلسلة الببتيدية الجديدة وذلك لأنه يرتبط إلى الإنزيم Peptidyl transferase . والمضاد من النوع الموقف (-Static) ويمكن للخلايا استئناف تخليق البروتينات والنمو بعد إزالته .

المضادات المؤثرة على تخليق الحوامض النووية

وهذه تكون قليلة الاستعمال وتستعمل عند الحاجة القصوى خوفا من تداخلها مع عمليات وفعاليات الحوامض النووية للمضيف ومنها :

• الريفامبيسين (Rifampicin) وله تسميات أخرى ، وهو يرتبط إلى الوحدة β من إنزيم الكوثرنة RNAP (DNA - dependent RNAP) ويمنع الانتساخ وتكوين mRNA . ويؤثر على الفيروسات بإغلاق المراحل النهائية من جميع الفيروسات مثل Poxvirus .

• اما مضادات الكوينولات Quinolones ومشتقاتها مثل Fluoroquinolones فهي تثبط تخليق DNA بغلق فعالية الإنزيم DNA gyrase . كما يؤثر المضاد Nalidix acid على تخليق DNA .

وهناك مضادات اخرى تعمل في هذا المجال غير التي ذكرت .

مضادات عمليات الايض Antimetabolite antibiotics

وتعمل المضادات في هذه المجموعة بواسطة تداخلها مع العمليات الايضية للخلايا . فمثلا تعد مادة *p*-ABA (*p*- amino benzoic acid) من مواد الايض المهمة للعديد من الأحياء المجهرية ، وتكون مهمة للحيوانات التي لا تخلفها وتعتمد على الأحياء المجهرية في أمعائها لتلبية حاجاتها لذلك لا تحتاج الى مصادر خارجية . وترتبط المادة او تتكاثف مع Pteridine بتفاعل يعتمد على ATP لتكوين المركب Dihydropteroic acid لتدخل فيما بعد بتفاعلات أخرى وينتج حامض الفوليك الذي يعد من طلائع (Precursors) المهمة في تخليق الحوامض النووية . ومن المضادات المؤثرة في هذه التفاعلات مركبات الكبريت Sulfonamides التي هي مضاهيات تركيبية للـ *p*-ABA ولذلك تتداخل مع الإنزيم Dihydropteroate synthetase مؤدية الى إغلاق التفاعل ، ويمكن إلغاء تأثير المادة بزيادة تركيز *p*-ABA أي إيجاد التثبيط التنافسي .

ومن المضادات الاخرى المؤثرة على مسارات تخليق حامض الفوليك هو Trimethoprim الذي يثبط فعالية الإنزيم Dihydrofolic acid reductase بشكل كبير جدا ويمنع اختزال المركب Dihydrofolic الى مركب Tetrahydrofolic الذي يمثل احد مراحل تخليق القواعد النيتروجينية البيورينية وبالتالي يمنع تخليق DNA . ومن المضادات التي تثبط الإنزيم المختزل هو Pyrimethamine ويكون اكثر تأثيرا من المضاد الاخر .

المواد الميكروبية والجهاز المناعي

تنتج الميكروبات عددا من المواد التي تساعد في تحويل الاستجابة المناعية ويمكن ان تقع ضمن محورات الاستجابة المناعية Biological response modifiers ، وهذه المواد تساعد في تحويل الاستجابة المناعية وتزيد من كفاءة الجسم ضد الأمراض المميتة مثل السرطان وأمراض الدم وتكون ذات أوزان جزيئية واطنة . وقد تكون حادثة لإنتاج الساييتوكينات او مثبطات لالتصاق الخلايا ومنها على سبيل المثال لا الحصر Cytogene و Cytoblastin وهذه تحفز إنتاج المونوكاينات من الخلايا Monocytes و Conagenin يحفز إنتاج اللمفوكاينات مثل IC- 101 الذي يثبط التصاق الخلايا .

مضادات الفطريات والخمائر

نظرا لكون هذه الأحياء حقيقية النواة فان هذا يؤدي الى ان ايجاد مضادات حيوية لها ليست بالعملية السهلة دون ان تتداخل مع جسم الإنسان . ولكن هناك بعض المنافذ منها ان الفطريات تحوي على ستيرويدات غير طبيعية مثل Ergosterol , Zymosterol في حين ان خلايا الإنسان تحوي في أغشيتها على الكولسترول . لذلك كانت المضادات الفطرية تستهدف الاركوستيرون وعمليات تخليقه فمثلا Azole والمضاد Allylamine يوقف او تمنع تخليق الاركوستيرون ويستعمل للإصابات السطحية وله تأثيرات أخرى ، وهناك مضادات تمنع تخليق الدهون ، وأخرى تمنع نقل المواد عبر الأغشية الخلوية ، ومن المضادات التي تؤثر على فعاليات أغشية الخلايا الفطرية ، Amphotericin B , Imidazoles , Colistin , Triazoles .

والأهداف الأخرى التي تعد انتقائية في الفطريات هي جدرانها الخلوية التي تحوي على مركبات لا توجد في خلايا الإنسان ويمكن استهدافها مثل الكلوكان (Glucan) ، ويمكن ان يهاجم بواسطة Griseofulvin الذي تنتجه بعض سلالات الفطر Penicillium ويستعمل لمعالجة الفطريات الجلدية Dermophytes ويستعمل عن طريق الفم ويذوب في العرق وعندما يتبخّر الأخير يترك المضاد على الجلد ليمارس تأثيره على انقسام خلايا الفطريات .

والمضاد Colchicine يؤثر على الانقسام الخيطي للفطريات وذلك بتداخله مع عمليات تخليق وتجميع مكونات الهيكل الخلوي وخاصة Microtubules . ويتداخل ايضا مع تخليق الكلوكان وهي السكريات المكوّنة التي تخلق وتصدر لتكوين الجدران الخلوية .

وتستعمل بعض المضاهيات Nucleoside analogues لمنع تخليق البروتينات في الفطريات اذ تحشر في RNA الفطري .

المضادات الميكروبية النباتية

ذكر في مستهل الموضوع ان المواد القاتلة للميكروبات وذات الأصل الميكروبي اصطلح لها تسمية المضادات الحيوية ، ولكن التعريف يمكن ان يمتد ويشمل العديد من المضادات القاتلة للميكروبات يمكن ان تنتج من الممالك الأخرى ومنها النباتات واغلبها يؤثر في الفطريات ذات الأهداف المحدودة .

فالعديد من النباتات تنتج مواد ايض ثانوي تكون ذات طبيعة مضادة للميكروبات ويكون ذلك ضمن احد توجهات النبات الفسلجية الآتية :

- تنتج ضمن النمو الطبيعي للنبات .
- تنتج أثناء تطور النبات وتمايز تراكيبه .
- تنتج استجابة لمهاجمة الأحياء الممرضة مثل الفطريات .

• تنتج استجابة للجهدات التي تتعرض لها .

وتحوي النباتات على بعض المضادات الفطرية بشكل طبيعي لتعمل كحواجز كيميائية أمام مهاجمة العديد من الممرضات النباتية ، اما الدواحر النباتية Phytoalexins فهي مضادات فطرية يحث تخليقها نتيجة الإصابة أو الإجهاد ولا توجد في النباتات الطبيعية السليمة ، ولذلك تكون بمثابة استجابة دفاعية وتكون محددة بالأنسجة المصابة بالفطر والخلايا المحيطة بمنطقة الإصابة ، وتكون بتركيز عالية بحيث تؤثر في الفطريات الغازية . وتوجد بعضها في خلايا الطبقة السطحية مثل بشرة الجذور لحمايتها من الإصابات الغازية . وقد تكون مواد ملونة مثل 3- deoxyanthocyanidin flavonoid . والدواحر تتجمع بعد حثها بالإصابة في العضيات الخلوية والفجوات لذلك هي تؤثر على الفطريات عندما تقوم بعملية التغذية الحيوية Biotroph على النباتات المصابة . ومن الجدير بالذكر ان بعض الدواحر تستحث بالتأثيرات الميكانيكية لذا تقوم النباتات باستعمال أنظمة مراقبة لمنع حثها عند عدم الحاجة اليها ، وبالمقابل فان الفطريات التي تستطيع توليد الأمراض يجب ان تتخطى حواجز الدواحر والتغلب عليها لذا تقوم بإنتاج جزيئات تؤدي الى إخماد استجابات النبات ومنع تخليق الدواحر وكذلك إنتاج إنزيمات تفكك الدواحر أو تستعمل آليات الدفع الخارجي لمنع تراكم الدواحر داخلها وهذه من ضمن الآليات العامة لمقاومة المضادات التي سيأتي ذكرها لاحقا . وهناك العديد من المواد النباتية التي تعمل بمثابة مضادات ميكروبية (مضادات للفطريات على وجه الخصوص) ومنها :

Phytoanticipins

مجموعة من المواد المضادة للميكروبات ، اذ تحوي النباتات على مواد ايض ثانوي منها مركبات Cyanogenic glycosides , Glucosinolates والصابونيات Saponins وهذه تكون مخزونة في الخلايا النباتية بشكل غير فعال ، ولكن عند الحاجة تحول الى مواد مضادة فعالة بواسطة الإنزيمات النباتية عند الإصابة بالمرضات ولذلك يطلق عليها المضادات الفطرية الجاهزة Performed antifungal نظرا لان الانزيمات التي تنشطها تكون موجودة أصلا في النباتات السليمة ولكنها تفصل عن المواد التي تعمل عليها بالحواجز الداخلية للخلية ، وهذا يؤدي الى تنشيط المواد دون الحاجة الى عمليات انتساخ جديدة للجينات ، كما ان بعض المواد تكون موجودة بشكلها الفعال ولكن بتركيز واطنة في عضو معين ولكنها تزداد بالحث عند إصابة عضو اخر من النبات . ولذلك تكون المواد الموجودة بشكل طبيعي لعملية الحماية .

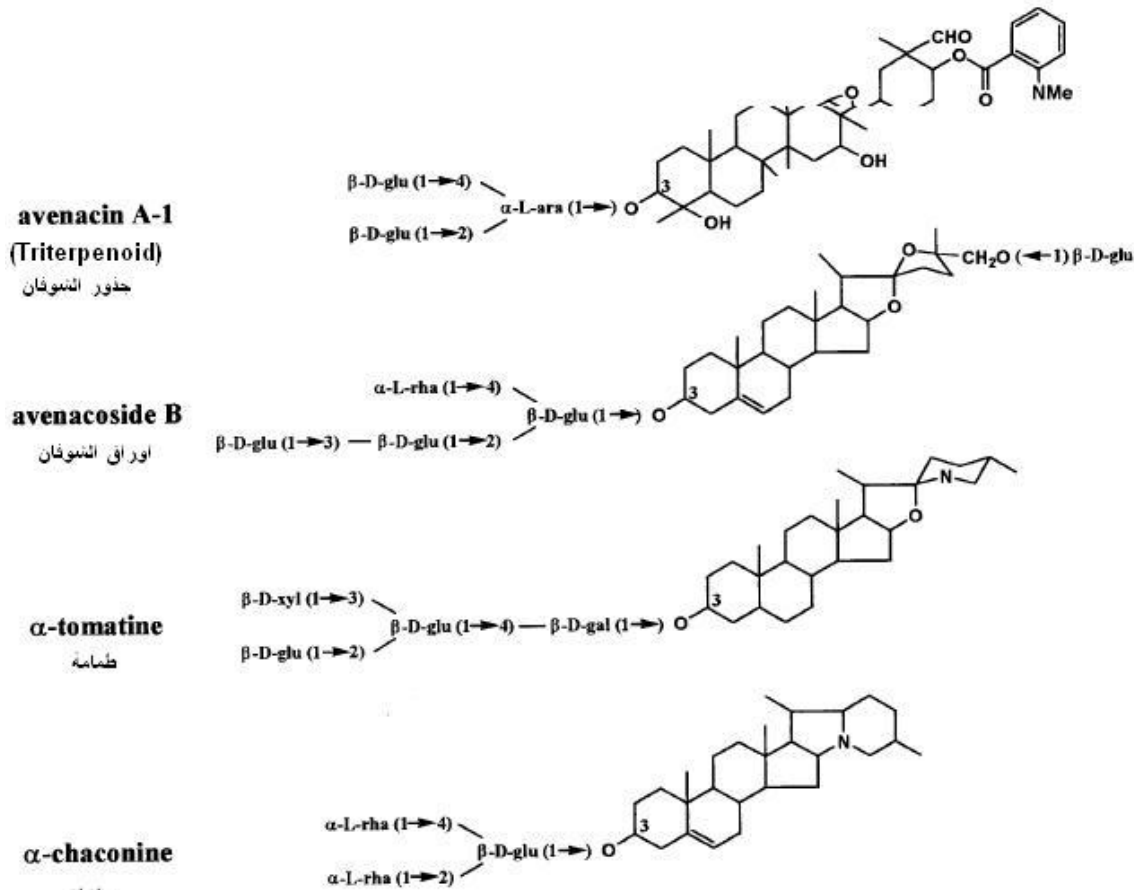
الصابونيات Saponins

تضم مجموعة من المركبات منها Steroids Glycosylated و Steroidal alkaloid و triterpenoids وتوجد بشكل طبيعي في النباتات ولها تأثير مضاد للفطريات . والمركبات موضح بعضها في الشكل (60) .

وتكون بشكل غير فعال ولكنها تتحول الى شكل فعال عندما يحصل تدمير للأنسجة او الإصابة بالمرضات بواسطة الانزيم Glucosyl hydrolase .

آلية تأثير الصابونيات

اهم الآليات هو تكوينها معقدات مع الستيرويدات الموجودة في الأغشية الخلوية الفطرية مؤدية الى اضطراب الاغشية ويمكن ان يحصل تجمع للمعقدات المتكونة وذلك بتداخل ثملات السكر في الصابونيات فيما بينها ، او انها تقوم باستخلاص الستيرويدات من الاغشية الخلوية . والية التأثير موضحة في الشكل (61) .



شكل 60 : تركيب بعض الصابونيات النباتية المضادة للاحياء المجهرية (الفطريات)

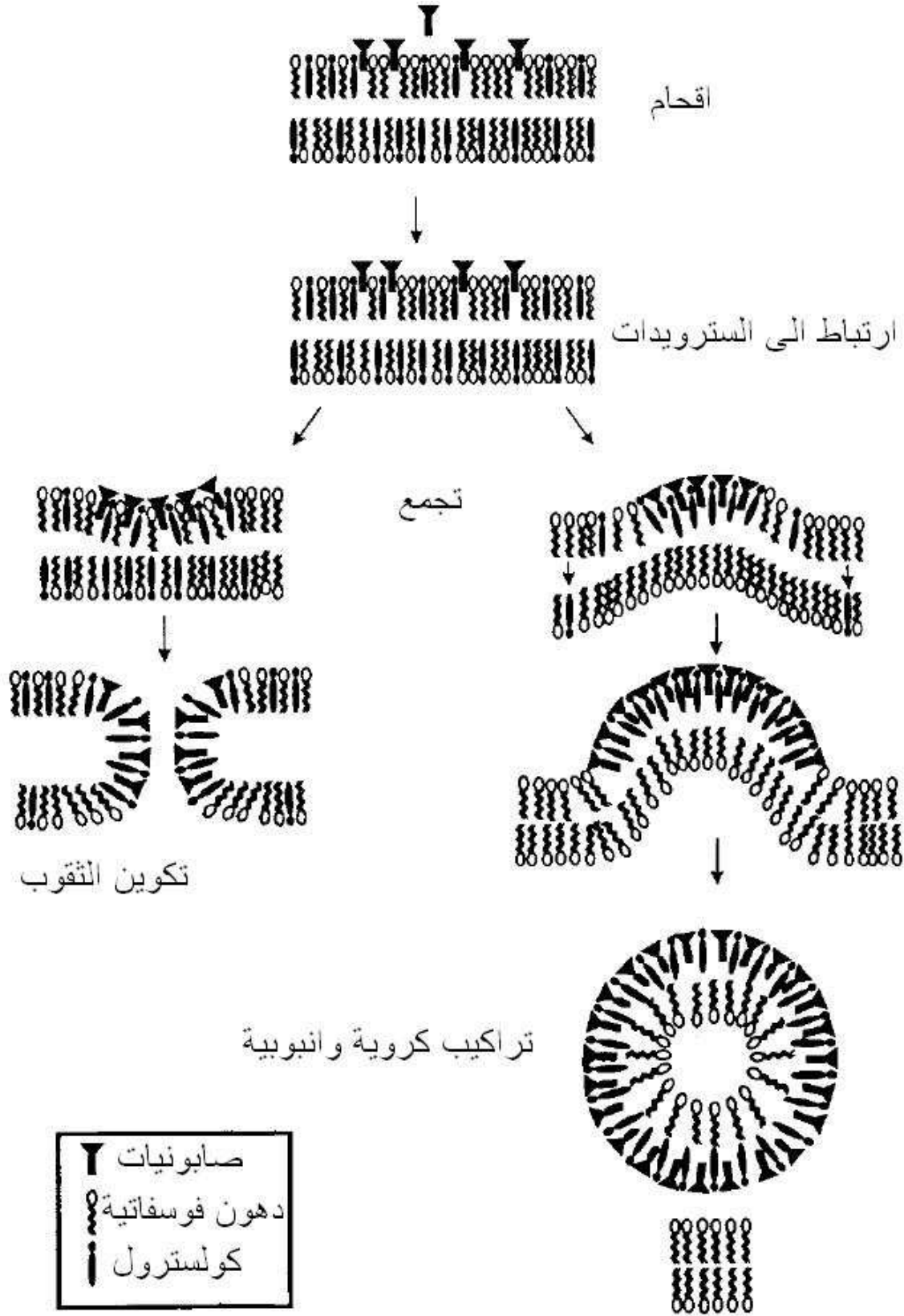
ويعد الجزء السكري من الصابونيات الأهم في إحداث اضطرابات في الأغشية الخلوية وبالتالي الصفات المضادة للفطريات ولذلك فإنته تؤدي الى فقدان تأثير الصابونيات على الفطريات ، ويظهر التآزر بين مركبات الصابونيات لذا تظهر فعل اكبر ضد الفطريات .

وتتوزع الصابونيات على أجزاء النبات مضافة عليها المقاومة للإصابة بالفطريات . وتوجد الصابونيات في عدد من أفراد العائلة الباذنجانية Solanaceae ومن أهمها الطماطة والبطاطا . فالطماطة تحوي في أوراقها على α - tomatin بتركيز 1 ملي مول والذي يكون كافيا لمنع نمو الفطريات . اما البطاطا فتحتوي على مواد مضادة للفطريات أخرى مثل مجموعة Steroidal glycoalkaloids ومنها α - chaconine و α - solanine والفطريات التي تصيب البطاطا تدمر هذه المركبات بواسطة الانزيمات .

المركبات النباتية الأخرى : ومنها المركبات السيانيديّة Cyanogenic glycosides و Glucosinolates وتنتشر في العديد من النباتات وتخلق من طلائع الحوامض الامينية لتحول الى مركبات Oximes ثم يضاف لها الجزء السكري فيما بعد . وتكون في النباتات السليمة معزولة عن الانزيمات التي تحللها وعندما تتضرر الأنسجة تتفكك المركبات لإطلاق سيانيد الهيدروجين (Hydrogen cyanide) والالديهايد والكيون . ويكون سيانيد الهيدروجين المتحرر ساما جدا لعمليات التنفس وهو إحدى آليات الدفاع النباتي ضد الممرضات وآكلات النبات .

اما Glucosinolates فهي من المركبات الحاوية على الكبريت التي تنتشر في نباتات ذوات الفلقتين خاصة العائلة الصليبية مثل جنس *Brassica* والدغل *Arabidopsis thaliana* . وهناك تشابها بين المركبات السيانيديّة و Glucosinolates من حيث مسارات التخليق ، فالاثنتين تخلق من الحوامض الامينية عن طريق مركبات Oximes الوسيطة وتكون الانزيمات المشتركة في عمليات التخليق متماثلة وتنشط بتضرر الأنسجة او مهاجمة الفطريات ، وتساهم في الدفاع النباتي ضد الآفات والممرضات .

ومن الإنزيمات التي تفكك المركبات Thioglucosidase و Myrorinase والتي تؤدي الى تفكيك المركبات وكذلك الصابونيات الى مواد سامة للفطريات مثل Nitrile و Isothiocyanate و Thiocyanate .



شكل 61: آلية تأثير الصابونيات على الأغشية الخلوية

: (1,4 - benzoxazinones) Cyclic hydroxamic acids

من المركبات الحلقية التي توجد في بعض النباتات مثل العائلة النجيلية بشكل طبيعي وهي من مركبات الكلايكوسيدات ، وتتوزع في جسم النبات ولكنه يتركز في الحزم الوعائية ، وتنتشر مركبات مشتقة منه في العديد من النباتات وتكون بشكل غير فعال . وعندما تضرر الأنسجة تقوم بتفكيك هذه المركبات وإزالة الجزء اللاسكري منها . وتكون المركبات الناتجة من الموقوفات لفعالية الفطريات والبكتريا وكذلك مضادات لتغذية عدد من الحشرات . وتكثر المركبات في البادرات بتراكيز عالية وتستمر لعدة أيام بعد الإنبات ثم تقل بعد ذلك مما يجعلها بمثابة مركبات دفاع جاهزة في المراحل الأولى من النمو ، وتؤثر على عدد كبير من الفطريات الممرضة .

ومن مركبات الدفاع الجاهزة في النبات مركبات توجد في الفواكه الناضجة لحمايتها من غزو الفطريات وتوجد في القشور ، والفطريات الموجودة على السطح الخارجي للفواكه تبقى هاجعة ولكن تظهر فعاليتها عندما يقل تركيز المواد المضادة الى مستويات اقل من المستويات السامة . ولذا تكون عملية الهجوع بالنسبة للفطريات وسيلة لتفادي تأثير المواد السام . فالعديد من الفواكه القابلة للإصابة يحدث فيها نقصان في المواد المضادة للفطريات بسرعة فتظهر فيها الإصابات ، ويتم تنظيم مستوى المواد السامة بواسطة بعض الانزيمات وأهمها Lipooxygenases فالانزيم يزداد اثناء عملية نضج الفواكه .

ويمكن ان تزداد تراكيز المواد السامة عند إصابة الفواكه بالفطريات والجروح او معاملة الفواكه بالاثيلين او المعاملة بثنائي اوكسيد الكربون او مثبطات الانزيم Lipooxygenases مما يؤدي الى تأخير عمليات النضج ، وهذه المعاملات تزيد من مقاومة الفواكه ، ولذلك يمكن التدخل وإحداث تغيير في فلسجة الفواكه والسيطرة على الإصابات والأمراض بعد الحصاد .

مقاومة المضادات الحيوية

في الوقت الحاضر اصبح العديد من الأحياء الممرضة مثل البكتريا والفطريات والخمائر مقاومة للمضادات الحيوية وحتى الأدوية الكيماوية . وبعض البكتريا يمكن ان تقاوم كل المضادات الحيوية المستعملة وهي التي يطلق عليها أحيانا Superbugs . فتشير الإحصاءات الى ان اكثر من مليون طن من المضادات أطلقت أثناء الـ 50 سنة الماضية ، وهذه أدت الى تدفق كبير للجينات في عالم الميكروبات . فقبل استعمال المضادات الحيوية كانت الاحياء المقاومة للمضادات غير موجودة في الإنسان والحيوان ، ولكن الاحياء وخاصة البكتريا اكتسبت المقاومة من مصادر خارجية او طورتها داخل الخلايا ، وانتشرت المقاومة بشكل رهيب بواسطة البلازميدات وغيرها من وسائل الانتقال الأفقي للجينات مما ساعد الاحياء على مواجهة الضغط الانتخابي الذي تفرضه المضادات .

وأصبحت مقاومة الأحياء متعددة أي ان السلالة الواحدة يمكن ان تقاوم عددا من المضادات فظهرت سلالات خطيرة مثل سلالات MRSA (Methicillin –resistant *Staphylococcus aureus*) وسلالات خطيرة من *E. coli* و *Klebsiella* وبكتريا السل . وأصبحت الإصابات المستعصية مصدرها مكان الاستشفاء وهي المستشفيات والتي أطلق عليها HAIs (Hospital acquired infections) فهي تؤدي في بعض الدول المتقدمة الى حدوث 5000 وفاة سنويا ، وتحدث الإصابة لأكثر من ربع مليون ممن يترددون على المستشفيات الكبيرة سنويا ، وسجلت في بعض الدول المتقدمة أيضا نسبة 9 % من الاصابات تحدث للراقيين في المستشفيات .

وبلغة الأرقام يمكن ملاحظة ان بكتريا السيلان Gonococci كانت في الستينات حساسة لـ 1.2⁶ وحدة عالمية من Penicillin G وأصبحت في بداية التسعينات تحتاج الى 2.4 x 10⁶ وحدة عالمية من Penicillin G وازدادت بعد ذلك الى 4.8 x 10⁶ وحدة وربما ازدادت اكثر في الوقت الحاضر . ولذلك تعالج الحالات المستعصية باستعمال تشكيلة من المضادات لمحاربة الاحياء المقاومة ولكن هذا يكون غير مجديا وذلك :

- زيادة التداخل بين الأدوية او المضادات .
 - زيادة كلفة العلاج .
 - تجعل المريض تحت خطر اكبر .
 - احتمالية زيادة المقاومة بشكل كبير .
- وكل هذه تؤدي الى تعقيد عملية العلاج .

طبيعة المقاومة

هناك عدة جوانب لدراستها لغرض فهم عمليات المقاومة قبل محاولة دراسة إمكانية السيطرة عليها ومنها :

- **مقاومة لا وراثية :** قد تكون المقاومة ناتجة عن غياب الهدف فمثلا البنسيلينات تؤثر على البيبتيدوكلايكان الموجود في البكتريا فقط فلذلك لا يتوقع ان يؤثر في الفطريات والخمائر .
- اضافة الى ذلك ذكر سابقا ان البنسيلينات تؤثر على الاحياء التي هي في حالة نمو لذلك تظهر الخلايا الهاجعة المقاومة ، في حين ان استئناف النمو يعيدها الى حالة الحساسية .
- وكذلك الحال مع بكتريا *Mb. tuberculosis* التي تعيش في أنسجة المضيف لسنين عديدة بعد الإصابة ولكن تكون مكبوتة بآليات دفاعات الجسم وتبقى بدون تكاثر وتكون الخلايا المقيمة مقاومة للأدوية ولا يمكن التخلص منها ، ولكن عندما تبدأ بالتضاعف بعد حصول إحباط لمقاومة المريض تصبح حساسة للأدوية التي كانت مقاومة لها .

ويمكن لبعض الاحياء ان تفقد الهدف الذي يتأثر بالدواء بعد عدة أجيال من نموها بوجود الدواء وبذلك تصبح مقاومة فمثلا تفقد البكتريا بعض مكونات جدارها الخلوي وتتحول الى L - form الخيطية أثناء إعطاء البنسلين وتصبح مقاومة له ، ويمكن ان تبقى لعدة اجيال في حالة مقاومة وعندما تستعيد جدرانها الخلوية السليمة تصبح حساسة للبنسلين ومركبات اللاكتام الأخرى .

والمقاومة الأخرى التي ليس لها أصل وراثي تنشأ من عدم وصول المضادات الى أهدافها نتيجة للحواجز النضوحية ، فالبكتريا السالبة لصبغة كرام الحاوية على الغشاء الخارجي لا تسمح لعدد كبير من المضادات ذات الوزن الجزيئي الكبير بالمرور او الدخول اليها . وكذلك المضادات ذات الطبيعة الكارهة للماء او المحبة للماء يمكن ان تصطدم بالطبيعة الكيماوية للأغشية الخارجية . كما ان طبيعة الاصابة يمكن ان تؤثر في المقاومة مثل صعوبة وصول المضادات او الأدوية الى داخل الخزاجات .

ويؤثر التركيز على المقاومة فبعض المضادات يمكن ان تتايض داخل الجسم وتفرز بعد ذلك ، أي تحصل زيادة في تركيز المضاد لمدة قصيرة تمثل الذروة ثم ينخفض تركيزه ، وهذا يؤدي الى ان البكتريا التي تحتاج الى تراكيز عالية لمدة طويلة سوف لا تتأثر وانما يكون حافظا لها لتطوير المقاومة وبعض المضادات تتراكم وتتركز بسرعة في بعض المناطق في الأنسجة والأعضاء وتبقى الاجزاء المصابة وأحيائها بعيدة عن الأدوية .

المقاومة ذات الأصل الوراثي

اغلب الاحياء التي أصبحت مقاومة للأدوية طورتها بحصول تغيير وراثي والذي أعقبه انتخاب بوجود المضاد الحيوي ، وتقسم المقاومة الى :

• مقاومة وراثية كروموسومية

ويمكن ان تحدث نتيجة الطفرات الوراثية التلقائية في الموقع الذي يتأثر بالدواء ، ولذا فهو يعمل بوجود المضاد او الدواء ويعمل الأخير كعامل انتخابي فيشجع الخلايا المقاومة ويقتل الحساسة فالطفرات التلقائية تحدث بتردد 10^{-7} - 10^{-12} ومثل هذا التردد القليل قد لا يكون مسئولا عن تطور المقاومة في المريض أثناء مدة المرض والتي تعد قصيرة . ولكن في بعض الاحيان مثل مضاد الريفامبسين تحدث الطفرات بتردد أعلى يصل الى 10^{-5} - 10^{-7} وهذا يؤدي الى نشو الطفرات بمعدلات عالية ، ولذلك كانت المعالجة بالريفامبسين لوحده فاشلة .

والطفرات الكروموسومية تؤدي الى تغيير تركيب في المستلم مثل تغيير البروتين P_{12} الذي يرتبط الى الستربتومايسين وكذلك البروتينات الرابطة للبنسلينات .

وتزداد مقاومة البكتريا على وجه الخصوص مقارنة بالاحياء المجهرية الاخرى نتيجة لوجود التواليات قصيرة السلسلة SSR في الكروموسوم بكثرة والتي تهيأ الفرصة لتغييرات كروموسومية كثيرة مؤدية الى عمليات التطور (يراجع الفصل الثالث) . كما ان وجود المضادات والمواد الكيماوية

الدوائية في محيط الخلايا يجعلها تحت اجهادات كبيرة لذلك تظهر فيها الخلايا ذات القابلية العالية على التطفر الفائق (يراجع الفصل السادس) .

● **المقاومة الوراثية اللاكروموسومية** : وتتمثل هذه بوجود العناصر الوراثية المتحركة مثل البلازميدات والجينات القافزة والتي تشفر عادة لانزيمات تفكك المضادات الحيوية . كما ان البلازميد الواحد يمكن ان يضيفي المقاومة لأكثر من مضاد .

فبلازميد المقاومة R factor ينتقل بأكثر من طريقة ، والبكتريا السالبة لصبغة كرام تتبادل هذه العوامل بطريقة الاقتران ، اما في البكتريا الموجبة لصبغة كرام فيمكن ان تنتقل عوامل المقاومة بالتحول او التنبيغ .

وهناك بلازميدات متعددة المضاييف مثل البلازميد pAMβ1 الذي عزل من أجناس بكتيرية متعددة من البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، والبلازميد Rp4 الذي عزل من البكتريا السالبة لصبغة كرام . وتوجد جينات مقاومة على بلازميدات غير اقترانية ولكنها يمكن ان تنتقل وتتحرك بواسطة البلازميدات الاقترانية ، كما ان الجينات يمكن ان تتحرك من بلازميد الى اخر بشكل يعتمد على بروتين recA او بعملية القفز بالنسبة للجينات القافزة .

ويمكن ان تنتقل المقاومة بين الاجناس المختلفة مثل انتقال البلازميد TEM-1 الحاوي على جين قافر الذي انتقل من البكتريا المعوية الى مكورات السيلان البنية ، كما يمكن للقافرات ان تنتقل دون البلازميد مثل انتقال Tn4 من بلازميد البكتريا المعوية الى بلازميد مكورات السيلان البنية . اضافة الى وجود إمكانات لانتقال المقاومة من البكتريا الموجبة لصبغة كرام الى البكتريا السالبة لصبغة كرام وبالعكس في الطبيعة .

أصول المقاومة

قد تكون المقاومة للمضادات الحيوية مكتسبة من الاحياء التي أنتجتها وانتقلت أفقيا الى الاحياء الاخرى وهذه الاحتمالية تشكل نسبة قليلة ، اما الاحتمالية الأكبر فهي حصول تغيرات وراثية داخل الخلية أي في الكروموسومات او اكتساب صفات المقاومة من العناصر المتحركة مثل البلازميدات .

آليات المقاومة

توجد عدة آليات متوفرة للخلايا المقاومة لاستعمالها والتخلص من التأثير القاتل لهذه العوامل ، كما ان الاحياء يمكن ان تستعمل اكثر من آلية تجاه المضاد الواحد ، ويمكن للمقاومة في كثير من الاحيان ان تكون لأكثر من مضاد ضمن ظاهرة المقاومة المتداخلة او المتقاطعة Cross resistance ، وهذه الأدوية قد تكون بعيدة عن بعضها من الناحية التركيبية ولكنها متشابهة في الهدف الذي تؤثر

عليه ، او تكون متشابهة من ناحية التركيب الكيماوي ، وبذلك تؤدي الى مقاومة عدة عوامل MDR (Multidrug resistance) والتي تكثر في الوقت الحاضر بشكل كبير . ومن آليات المقاومة :

• انتاج الانزيمات التي تكسر او تفكك المضاد وافضل الامثلة عليها الانزيمات المفككة للبنسلينات Pencillinases (β - lactamases) وتؤدي الانزيمات الى فتح حلقة اللاكتام في البنسلينات والسيفالوسبورينات مؤدية الى فقدان المضاد قابليته في التأثير على الاحياء . وتوجد انواع من هذه الانزيمات في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، البعض يشفر لها بالبلازميدات كما في *Staph. aureus* والبعض يشفر لها بالكروموسومات كما في العديد من البكتريا السالبة لصبغة كرام .

ووجد ان هناك اكثر من 30 بلازميد يشفر لإنتاج هذه الانزيمات التي تبلغ حوالى 80 نوعا من الانزيمات ، كل له خصائص وألفة معينة . وتصنف اعتمادا على الوزن الجزيئي والتشابه فيما بينها وكذلك نسق مواد الأساس التي تعمل عليها . واغلب الإنزيمات تنتج بدون حث . اما الجينات الكروموسومية فالبعض منها مستحث كما في البكتريا *Enterobacter* , *Citrobacter* , *Pseudomonas* وقد لا تحتاج الى حث كما في البكتريا *Acinetobacter* , *Bacteriodes* . وتوجد بعض انزيمات β - lactamases التي تفكك حلقة البتا -لاكتام الموجودة في مضادات من أجيال مختلفة مثل *Aztreonam* , *Ceftazidime* , *Cetotaxime* ويطلق عليها الانزيمات واسعة المدى ESBLs (Extended –spectrum β - lactamases) وتوجد في بعض البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *E. coli* و *K. pneumoniae* .

ومن المثبطات لإنزيمات β - lactamases مركبات *Clavulanic acid* , *Sulbactam* , *Tazobactam* وتكون ذات ألفة عالية للانزيمات وترتبط بعض الاحيان بشكل غير قابل للرجوع . والمثبطات يمكن ان تحمي عددا من المضادات مثل *Tricarcillin* , *Amoxicillin* , *Ampicillin* من التدمير .

ويحدث في بعض الاحيان ان تفشل البنسلينات في تحفيز الانزيمات المحللة الذاتية في الجدار الخلوي ، لذلك فان الكائن سوف يثبط ولكن لا يقتل ويؤدي الى ظهور حالة التحمل كما في العديد من المكورات العنقودية والمكورات المسبحية .

ويمكن للاحياء ان تقاوم مضادات اخرى بالاعتماد على إنتاج انزيمات تهاجم مجاميع خاصة مثل الاستيل او الفوسفات او غيرها وتؤدي الى تعطيل المضاد كما في تعطيل عدد من المضادات العاملة في تثبيط تخليق البروتينات ، ويكون عددا منها بلازميدي المصدر ، ومنها انزيم مقاومة الكلورامفينيكول *Chloramphenicol acetyltransferase* .

وتستطيع الفطريات الممرضة للنباتات من إفراز الانزيمات التي تدمر المواد القاتلة في النباتات ، اذ ان بعض الفطريات قادرة على إزالة الجزء السكري من العمود الفقري للصابونيات المضادة بواسطة الانزيمات ، وهذه الخاصية شائعة في المجاميع الفطرية التي تصيب الجذور بشكل خاص . وكذلك تكون شائعة في ممرضات نبات الطماطة ، اذ تنتج الفطريات انزيم α - tomatinase وتحول α - tomatin الى مركب β_2 - tomatine . وتوجد فطريات متحملة لمركبات اليسانيد التي تنتجها النباتات فهي اما تستعمل طريق تنفسي لا يتأثر بالسيانيد او تفرز انزيم Cyanide hydratase لتفكك المركبات السيانيدية . وتستطيع الفطريات تحليل المركبات السامة في النباتات الى مركبات اقل سمية بواسطة الإنزيمات وقد حددت الجينات المسؤولة عن التفكك في عدد من النباتات ، ونقل هذه الجينات يشكل وسيلة ملائمة لهندسة ابيض النباتات لتوليد المقاومة ضد الامراض والتي يمكن فهمها استعارتها في الجوانب الطبية .

● الالية الثانية من المقاومة هي التعامل مع الأهداف الخلوية الذي يتفاعل معها المضاد ، فتستطيع الخلايا تغيير الأهداف للتخلص من سمية المضاد فمثلا بعض انواع مضادات Macrolides يتفاعل مع 23S rRNA وتحبط عملية تخليق البروتينات ، والخلايا المقاومة تقوم بتغيير جزيئات RNA بمثلتها ، وهذه الآلية اما ان تكون بلازميدية او كروموسومية .

اما مقاومة الريفامبين والتي تحدث بمستويات عالية فوجد ان طفرة كروموسومية تؤدي الى إحداث تغيير في وحدات انزيم الكوثر RNAP ، كما تقوم الخلايا المقاومة بمثيلة RNA على الوحدات الكبيرة من الرايبوزوم لمقاومة الارثرومايسين . ويمكن ان تغير الخلايا اهداف اخرى في مكنة تخليق البروتينات كما في تغيير S_{12} في بكتريا *E. coli* بحيث تفقد حساسيتها للستربتومايسين الذي يؤثر على الوحدة الصغيرة من الرايبوزومات .

وتقاوم بعض الأحياء تأثير البنسيلين بتغيير البروتينات الرابطة له PBPs نتيجة طفرة كروموسومية ، وتصبح المضادات غير قادرة على تميزه ، او تكون ذات ألفة واطئة للارتباط به . وفي حالة الاصابات النباتية فان الفطريات الممرضة تكون متحملة للمواد القاتلة في النباتات بإبدائها المقاومة ومنها غياب الهدف وعدم وجود الستيرولات في أغشية الفطريات الممرضة مثل *Pythium phytophthora* يضيف عليها المقاومة وكذلك حصول بعض الطفرات للستيرولات تجعل الفطر مقاوما وهي من الامثلة الواردة للأحياء الممرضة العاملة في الجوانب الطبية .

● اما النمط الثالث من اليات المقاومة هو الذي يتخذ عند الحدود الخارجية للخلايا ولا تسمح للمضادات بالدخول الى الخلايا ، او تقوم بدفق الجزيئات الداخلة الى الخارج .

وتستطيع الخلايا تغيير نضوحية الاغشية فمثلا البكتريا السالبة لصبغة كرام يمكن تغيير LPS او القنوات Porins وهذا يؤدي الى تغيير شحنات السطح الخارجي للخلايا لإبعاد المضادات . او تغيير

مركبات اخرى في الغشاء بحيث يكون المضاد غير قادرا على الوصول الى أهدافه داخل الخلية ، فتغير الخلايا نضوحية الأغشية الخارجية وبذلك تمنع Amikacin , Polymyxins وكذلك تغير المكورات المسبحية نضوحية أغشيتها لتغلق دخول مضادات Aminoglycosides .

واكثر الأدوية يمكن ان تطرد بواسطة ناقلات MF , ABC في الخلايا بدائية النواة تكون اكثر انظمه طرد الأدوية في حالة المقاومة المتعددة MDR تتم باستعمال القوة الدافعة للبروتون pmf كمصدر للطاقة عن طريق المقايضة drug / H⁺ antiport ومنها البروتين LM RA في البكتريا *Lactococcus lactis* وفي *E. coli* وربما غيرها من الأحياء والمواد التي تعمل الناقلات على نقلها هي ايونات موجبة كارهة للماء وتكون الأنظمة مشابهة للـ MDR1 الموجودة في الإنسان .

وفي الأحياء المجهرية حقيقية النواة الاخرى منها الابتدائيات المتطفلة مثل *Entamoeba* , *Plasmodium* , *Leishmania* تكون الجينات المسؤولة عن ناقلات ABC مختلفة في عدد النسخ ومستوى التعبير ولكنها تشترك في مقاومة الأدوية . وفي خميرة الخبز كنموذج دراسي يوجد على الأقل 4 انواع من عوائل ABC المشاركة في المقاومة المتعددة ومنها YCR₁ , SNQ₂ , PDR₅ , YOR₁ ، والمجاميع SNQ₂ , PDR₅ تكون متخصصة بالمركبات الحلقية الموجبة ، اما الاخرى فتكون متخصصة بالمركبات السالبة و PDR₅ يكون أكثر شبيها بـ MDR₁ البشري . وتختلف الأنظمة في ترتيبها وتوزيعها في الأغشية الخلوية . وتحتوي الخميرة على ناقلات اخرى .

اما الخميرة المنشطرة *Sz. pombe* والخميرة *C. albicans* فتحتوي على أنظمة لدفع الأدوية الى الخارج ، وعملية الطرد تعتمد على زيادة التعبير عن الناقلات ABC ، ففي الأولى يوجد PMD1 BFR⁺ ، اما الخميرة المرضية فتحتوي على CDR1 , CDR2 لدفع المضادات الى الخارج . اما في الفطريات الخيطية تكون أنظمة دفع الأدوية الى الخارج مثل تلك المستعملة لدفع المبيدات وتقوم بطرد المواد خارج خلايا المايسيليوم وتعمل في العديد من الفطريات الممرضة للنباتات والإنسان .

ولذلك يلاحظ ان ناقلات ABC (يراجع الفصل السابع) تعمل في مجال عدم الحساسية الطبيعية وتعمل ايضا في المقاومة المكتسبة في عدد كبير من الأحياء . وقد استعملت مثبطات هذه الناقلات لتتأزر في علاج خلايا السرطان ذات النمط المقاوم الادوية . كما ان مثبطات الناقلات يمكن ان تستغل في زيادة كفاءة المبيدات بأنواعها مثل المبيدات الفطرية في مجال الزراعة ، وذلك لان تثبيطها يزيد من مقاومة المضيف والتقليل من ضراوة الأحياء الممرضة ولذلك فان هذا التوجه يمكن ان يقلل من الأمراض وتطورها .

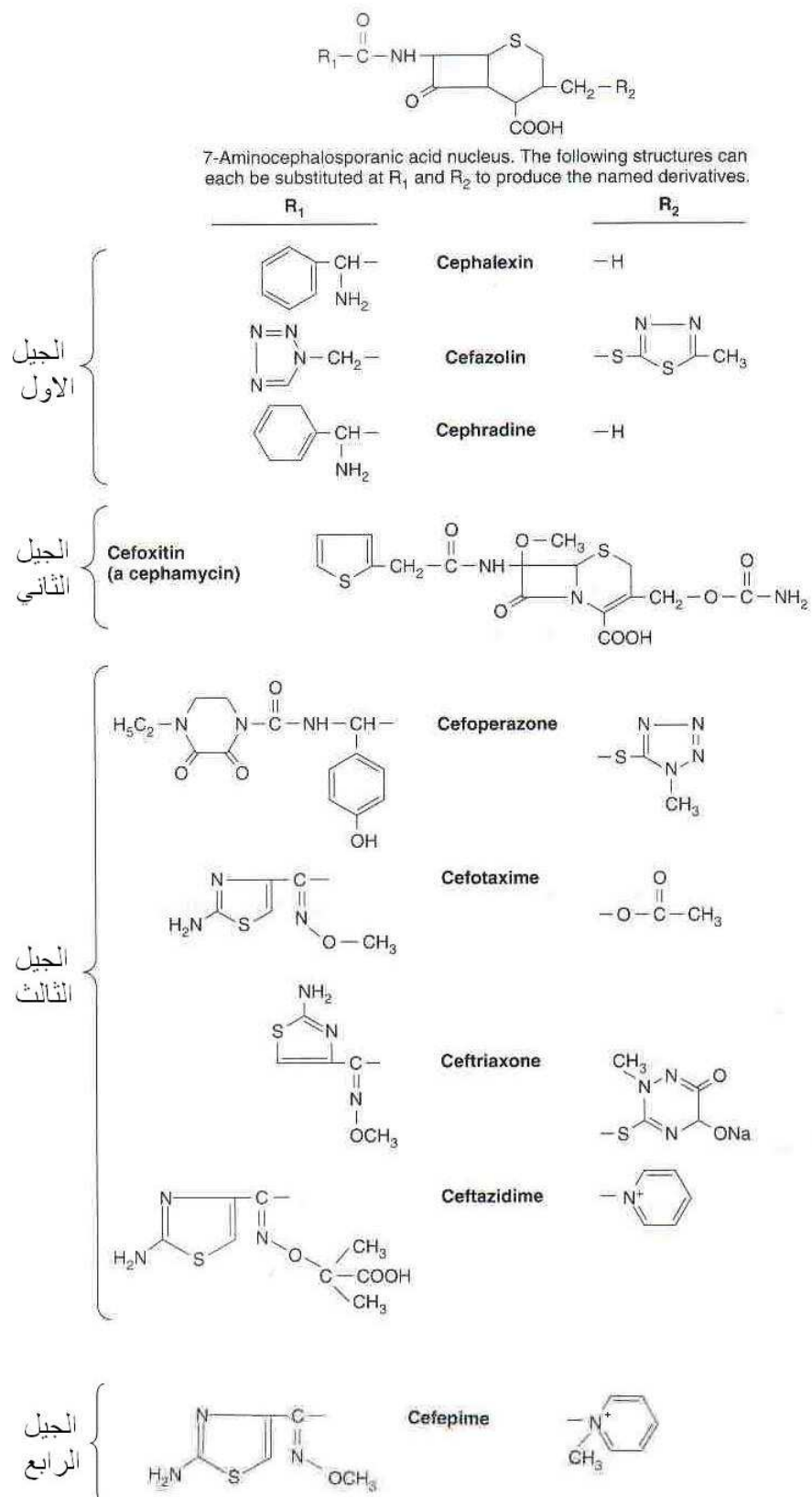
- النمط الرابع الذي تستعمله الأحياء لمقاومة المضادات هو تغيير المسارات الايضية وهذا يكون خاصا بالمضادات التي تتداخل مع العمليات الايضية لتحاكي التأثير فمثلا Sulfonamide (كما ذكر

سابقا) يؤثر على مسار تخليق حامض الفوليك وأصبح غير مؤثرا في الأحياء المقاومة نتيجة لتغيير المسار او زيادة الانزيمات العاملة والتي تهاجم بالدواء باستغلال ظاهرة التثبيط التنافسي ، وكذلك الحال مع Trimethoprim الذي يؤثر على الإنزيم Dihydrofolic reductase الذي تم تغيير تركيبه في الأحياء المقاومة ليصبح اقل تأثيرا .

تقليل المقاومة والتوجهات الحديثة

بعد انقضاء أكثر من نصف قرن على طرح واستعمال المضادات الحيوية لا زالت الأمراض الناتجة عن الاصابات تشكل نصف الامراض المؤدية للوفيات ، وقد زادت المقاومة في معظم السلالات المرضية اذ أصبحت بعض الاصابات لا يتوفر لها علاج ولعل أخطرها ظهور سلالات خاصة من بكتريا السل المقاومة والتي ظهرت عالميا مرافقة لمرض نقص المناعة المكتسبة AIDS ، وهناك بعض المحاولات التي اتخذت للتغلب على هذه المشكلة التي تتفاقم باستمرار ، ومن هذه المحاولات :

- استعمال تراكيز عالية من المضادات لزيادة تركيزها في الأنسجة المصابة ولمنع الأحياء من تطوير المقاومة .
 - استعمال أكثر من دواء او مضاد سوية على ان تكون مختلفة الأهداف وكذلك مختلفة البنية التركيبية للابتعاد عن ظهور المقاومة المتداخلة .
 - اجتناب تعريض الأحياء للتراكيز الواطئة من الأدوية لتفادي تدريبها على المقاومة .
 - تجفيف الموارد المؤدية لظهور المقاومة مثل عدم استعمال المضادات الحيوية في أعلاف الحيوانات والمواد الحافظة للأغذية .
 - التقليل الى ابعد حد ممكن من استعمال المضادات ذات المدى الواسع من التأثير .
- ونظرا لكون استعمال المضادات من الطرق الملائمة للعلاج لان العلاج بها يعد قصير الأمد ، ومن جهة ثانية فان كل دواء يحتاج الى حوالي 8 - 10 سنوات (عند استعمال المسح العشوائي) من حين الاكتشاف الى الاستعمال وإطلاقه الى السوق ، اذ يحتاج الى العديد من الخطوات ومراحل سريرية متعددة ، ثم الخضوع للعديد من عمليات التقييم وعبور التقييدات والتشريعات مما حدى بالعاملين بالقفز على هذه الحواجز باستعمال المضادات المجازة أصلا وإجراء التحوير عليها أملا في التخلص من المقاومة ، ولذلك بدأت تظهر الأدوية على شكل أجيال وأجيال من المضادات ومن اهم (واحد الأمثلة من العديد) اجيال المضادات الحيوية السيفالوسبورينات الموضحة في الشكل (62) .
- ولكن معظم هذه المحاولات باءت بالفشل . وأصبحت عملية إنتاج مضادات جديدة عملية خسارة اقتصادية وخسارة في مواجهة الأحياء المجهرية الممرضة وأدت الى انسحاب الصناعات الصيدلانية



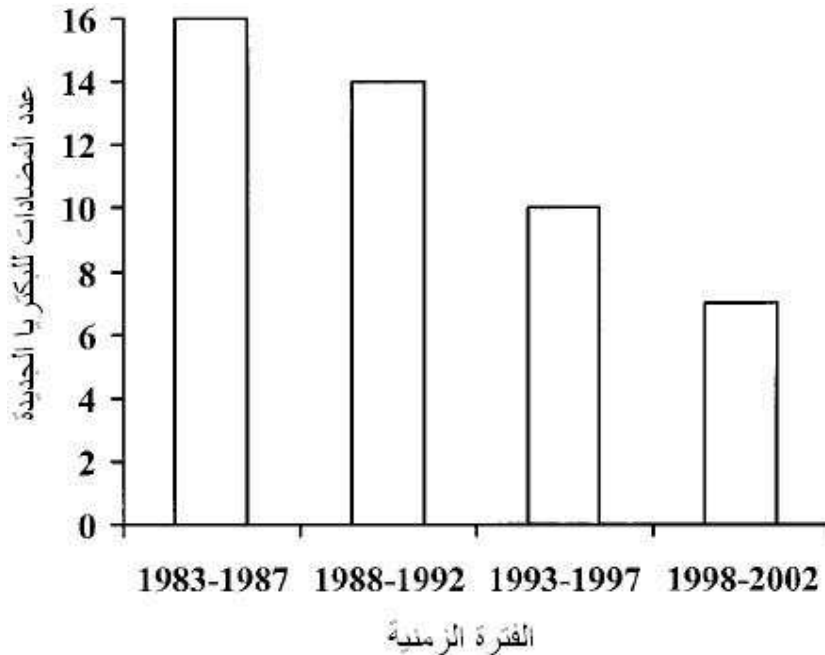
شكل 62 : الاجيال المختلفة من السيفالوسبورينات لتتلافي مقاومة الاحياء المجهرية

من تطوير مضادات للميكروبات ، وهذه تعد مشكلة جماعية وتؤثر على الصحة العامة . ويمكن ملاحظة ذلك من قلة عدد المضادات الجديدة المسجلة فمثلا بين عامي 1998 – 2002 تراجعت النسبة بـ 56 % بالنسبة لشركات الأدوية الكبرى العالمية عما كانت عليه بين عامي 1983 – 1987 ، اما في عام 2002 لم يسجل أي طلب لتسجيل للمضادات الجديدة ويمكن ملاحظة ذلك من الشكل (63) . وهذه الحالة أدت الى الشعور بالقلق من قبل الجهات المختصة لذلك زادت هذه المؤسسات مثل FDA و WHO من اهتمامها وبدأت بتشجيع الصناعات الصيدلانية بالعودة الى البحث والتقصي عن الادوية المضادة للميكروبات المرضية وذلك بإقامة المؤتمرات ورصد الموارد المالية الكبيرة لتصب في هذا الاتجاه .

إذن المقاومة في الاحياء المجهرية هي المحفزة للبحث عن وسائل جديدة لاستهداف الآليات غير المستغلة مسبقا لتأثير المضادات . وبدأت الجهود الجادة التي يمكن وضع بعضها في النقاط الآتية :

- التركيز على دراسة الكيمياء التركيبية للمضادات الموجودة أصلا والمركبات الجديدة
- دراسة الأهداف الممكن استهدافها .

- تطوير عمليات المسح السريعة مثل High throughput screens التي تساعد بمسح الآلاف من المواد بوقت قصير جدا .



شكل 63 : مستويات تصنيع واكتشاف المضادات الحيوية الجديدة

ولا تزال الاهداف في الخلايا البكتيرية هي التقليدية الممكن استهدافها مثل المواد النووية والجدران والاعشية الخلوية ، والجديد في الوقت الحاضر استغلال المسارات والعوامل التي تشارك فيها والتي أسفرت الدراسات الجزيئية في الكشف عنها ، ومن اهم الاهداف هي المضخات التي تضخ المضادات الى خارج الخلايا المقاومة ، وكذلك استهداف عمليات تخليق الحوامض الدهنية ومزامرتها تحت ظروف الإجهاد . كما ان الدراسات تستهدف الخلايا الهاجعة التي تمثل عقبة كبيرة لأنها الأكثر مقاومة وكذلك الخلايا بطيئة النمو . وتستهدف الدراسات معرفة فلسجة الخلايا تحت ظروف الإجهاد (يراجع الفصل السادس) ومعرفة كيفية تصرف الخلايا عند استعمال ممهدات الإجهاد خاصة بوجود المضادات التي تمثل احد الاجهادات على الخلايا . ودراسة مسارات نقل الإشارات والاستجابات الناتجة ، وكذلك تكثيف الدراسات على الاحياء التي تتطفل داخل الخلايا والتي من المفارقات ان بعضها تتطفل داخل أجهزة دفاعات الجسم وهو الجهاز المناعي .

واجراء الدراسات حول الاحياء الموجودة داخل الاغشية الحيوية التي تمثل العقبة الكوؤد امام استعمال المضادات الحيوية ومقارنة نمط حياة الخلايا بشكل هائم او عالق مع نمط الحياة في الأغشية الحيوية (يراجع الفصل الخامس) . وتعتمد الجهات البحثية على ما توصلت اليه العلوم الجزيئية في الاحياء المجهرية . فقد تم تحديد توالي جينومات بعض البكتريا مثل *H. influenzae* (عام 1995) وتلت ذلك العديد من الاحياء خاصة ذات العلاقة بالحالات المرضية السريرية والتي وفرت معلومات جينومية قيمة عن الجينومات ساعدت في فهم جوانب كبيرة من فلسجة الخلايا .

وتتم الاستعانة بقواعد معلوماتية حول المكنون البروتيني للبكتريا Bacterial proteome وكذلك مكنون النسخ Transcriptome لتحديد عوامل الانتساخ ومواقع ارتباطها لاستعمالها كأهداف . كل هذه تساعد في تحديد طريقة التأثير MOA (Mechanism of action) التي تساعد في التكهّن لعمل المركبات مما يهيئنا الفرصة لإيجاد نسق تعبيرى لطرق التأثير البديلة باستعمال الطفرات او إيجاد مضادات تعمل على أهداف جديدة . ومما يؤثر في فعالية توجيه طرق التأثير هو توفر القواعد المعلوماتية كي تكون مراجع يقاس عليها .

وقد أسفرت المحاولات عن بعض الجوانب المشجعة ومنها :

- القيام بتطوير برامج لدراسة وإنتاج الأدوية اليتيمة Orphan drugs وهي التي تنتج بكميات قليلة لان الحاجة اليها قليلة وبذلك فهي غير مجدية من الناحية الاقتصادية ولكن المحاولات ترمي الى توسيع مجالات استخدامها ، حتى ان بقيت بمستوى خسارة اقتصادية فان الشركات يمكن ان تعوض من مبيعات اخرى او من المنح المالية التي تقدمها الجهات المختصة .
- إنتاج المضادات الهجينة ، اذ يهدف ألّوجهه الى تخليق مضاد حيوي مكون من قطعتين من المضادات وذلك بهندسة الاحياء المنتجة وإدخال الجينات الخاصة بتخليق الإنزيمات من كائنات

مختلفة منتجة لمضادات مختلفة وإنتاج مضاد حيوي واحد . وقد تمت الاستفادة من *Streptomyces* المهندس وراثيا لإنتاج مضادات جديدة من مجموعة Macrolides .

- محاولة الاستفادة من الأحياء غير المستغلة مثل الأحياء البحرية والطحالب لان الاعتقاد (ومن ورائه اليقين) ان الأحياء تنتج عددا هائلا من المركبات التي لبعضها صفات مضادة للميكروبات .
- التوجه الى دراسة المضادات المنتجة من المملكة الحيوانية فالكثير من الحيوانات وخاصة اللافقرات التي لا تمتلك جهاز مناعي كفؤ .

فالحوانات تنتج عددا من المضادات واغلبها من البروتينات او الببتيدات من خلايا الجهاز المناعي تقوم بنخر الخلايا المصابة بالفيروسات او غيرها من الممرضات ، ومن أمثلتها Defesin البروتين الذي يؤدي الى زيادة نضوحية الأغشية الخلوية للبكتريا ، وهناك مركبات اخرى مشابهة في التأثير مثل Azurodinin , Bactenecin و Lsozyme الذي يحلل جدران البكتريا الموجبة لصبغة كرام بشكل خاص ، وكذلك البروتين Lactoferrin الذي يمنع نمو البكتريا بسحب ايونات الحديد الحرة بقوة .

- استهداف الامراضية وعوامل الضراوة Pathogenesis – targeted antibiotics ويهدف التوجه دراسة عوامل الضراوة التي تؤدي الى توليد الأمراض والظروف المشجعة لها مثل ظروف الإجهاد واستهدافها بدلا من القضاء على الخلايا كاملة وبذلك يمكن القضاء على البكتريا المقاومة ، وفي هذه الحالة ستكون المضادات المستعملة مختلفة عن المضادات التقليدية ومن ثم لا تنشأ المقاومة . كما انها لا تشكل ضغطا انتخابيا يؤدي في النهاية الى تطور المقاومة اذ سيكون مؤثرا على الأحياء الممرضة فقط . وتستهدف مشاريع دراسة تواليات الجينومات التعرف على المناطق المسؤولة عن الامراضية وعوامل الضراوة .

- استعمال العاثيات لعلاج الإصابات البكتيرية وهي طرق ليست تقليدية ، فالعاثيات تستعمل في بحوث الوراثة والتعرف على الأهداف الخاصة من بروتينات الارتباط ، كما انها تستعمل وسيلة لإيصال اللقاحات الوقائية . وقد أجريت التجارب لاستعمال العاثيات الخيطية كحامل للأدوية للتخلص من البكتريا المرضية ، وحوار العاثي لإيجاد جزء استهداف على سطحه يستخدم لربط الدواء على السطح بوصلة غير ثابتة Labile linker لغرض إطلاق الدواء عند الحاجة . فعندما يكون الدواء مرتبطا الى العاثي فانه يكون بمثابة دواء أولي Prodrug ويكون غير فعال فيخلو من القابلية السمية للخلايا ولكنه ينشط بعد إطلاقه من العاثي عند موقع الهدف . كما ان هناك محاولات لاستعمال العاثيات الخاصة ببكتريا السل Mycophages لغرض معالجة السلالات التي ظهرت مع اجتياح موجة الايدز والاخرى التي تظهر مقاومة لعدد من المضادات والادوية قيد الاستعمال ، ومثل هذا التوجه يفيد لبعض المضادات التي تكون فعالة ضد البكتريا الممرضة ولكنها لا تستعمل لتأثيراتها

الجانبية على المضيف مثل الكلورومفينيكول وكذلك مع الأدوية ذات السمية الانتقائية الواطئة لمواجهة المقاومة .

ولابد ان تكون هناك أفكار وأفكار يمكن ان تنشأ للحاجة الملحة للبحث عن الأدوية الجديدة ما دام الإنسان في صراع مع الاحياء الاخرى .

الاغذية العلاجية

وتسمى ايضا المغذيات الدوائية Nutraceuticals ويمثل هذا الحقل تداخلا شديدا بين الجوانب الطبية ومجال الأغذية (الذي سيتم تناوله في فصل قادم) ولكن هذه المجموعة من الأغذية كان الأفضل طرحها في الفصل الحالي لشدة علاقتها بالجوانب الطبية .

فالأغذية وخاصة المتخمرة تعد من اهم إفرازات التقنية الحيوية الميكروبية التي تقدمها في الجوانب الطبية ، والفصل لا يتناول الأغذية المهندسة وراثيا نظرا لان اغلبها يقع ضمن مجالات استعمال الحيوانات والنباتات . كما ان انواع الاغذية الاخرى التي تتجارب مع الجوانب الصحية بتعديل تركيبها بإضافة المواد الكيماوية او الفيتامينات سوف لا يتم التطرق اليها بشكل كبير ، وانما سيركز الفصل على الأغذية المتخمرة وخاصة العلاجية واستعمال الأحياء العلاجية Probiotics فيها الاغذية المتخمرة لها مجال واسع من التطبيق ومن امتدادات زمنية طويلة مما يشير الى فوائدها من الناحية التغذوية بشكل واضح ومحسوس إضافة الى كونها أغذية وقائية وعلاجية . وقد اثبت العديد والكم الهائل من الدراسات بجدوى استعمال الاغذية المتخمرة وتأتي منتجات الألبان في مقدمتها . وقد تميزت بعض الانواع او السلالات لتصبح الأساس في الانتاج مثل *Lactobacillus casei* Shirota اذ أصبحت سلالة شيروتا تستعمل لإنتاج ملايين الأطنان من المنتجات المتخمرة ليستعملها ملايين البشر لأغراض طبية ووقائية . وتأتي بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria (LAB) والتي تضم السلالة المذكورة في مقدمة الاحياء العلاجية .

والفوائد الناتجة من استخدام بكتريا حامض اللاكتيك متعددة ومتداخلة بعلاقات معقدة بين مكونات الحليب ومكونات الخلايا البكتيرية مع الطبقات المخاطية في القناة الهضمية التي تصلها . فمن فعاليتها في الحليب هو تحليلها لبروتينات الحليب الذي يساعد البكتريا على النمو وكذلك يؤدي الى إطلاق البيبتيدات الفعالة حيويًا التي تكون ضمن بروتينات الحليب وتنطلق عند تخمره وتعرضه للبروتيازات الهاضمة (كما سيأتي ذكره لاحقا) لذلك فان الحليب وما يحويه من بيبتيدات فعالة وكذلك المركبات الاخرى التي تنتج أثناء التخمر تلعب الدور الأهم في تحسين الصحة وتقليل الإصابة بالعديد من الأمراض .

وتنتج العديد من الاغذية المتخمرة في مختلف أنحاء العالم وفق المواد الأولية المتوفرة في منطقة الانتاج . اذ ليس من الضروري ان تكون منتجات للحليب ، فمنها اللحوم المتخمرة والحبوب والبقول

المتخمرة والكثير من المنتجات . واستهلاك المنتجات اللبنية المتخمرة مرتبط منذ زمن بعيد بتأثيراته الصحية المفيدة . وقد وجد ان كل من العصيات اللبنية Lactobacilli والبكتريا المنشطرة Bifidobacteria هي المؤثرة خاصة في المواليد اذ تكون هي السائدة في غائط الأطفال ذوي الرضاعة الطبيعية .

وفي الوقت الحاضر تتوفر الاحياء العلاجية بأشكال مختلفة من منتجات الحليب المتخمرة ، او بشكل مدعمات غذائية او على شكل أقراص او كبسولات ، وأسواقها في اتساع في العالم اجمع . وقد عرفت Probiotics بطرق تنم عن بعض الاختلاف ، ففي البداية عرفت على انها " المواد المنتجة من كائنات مجهرية محددة تشجع نمو الاحياء الاخرى "، ثم تلا ذلك تعريفها على انها " ميكروبات حية أحادية تكون بمثابة مدعمات غذائية تؤدي الى فائدة المضيف وذلك بايجاد التوازن الميكروبي في الامعاء " . ثم تلا ذلك توسيع التعريف لينص على انها " مزارع مفردة او خليطة من احياء مجهرية حية والتي عند استعمالها في الانسان او الحيوان تؤدي الى فائدة المضيف وذلك بتحسينها للفلورا الميكروبية الداخلية " ، ويلاحظ من التعاريف المذكورة التأكيد على كون الخلايا يجب ان تكون حية ، وبعد ذلك امتد التعريف لينص على انها " خلايا ميكروبية او مشتقاتها تؤدي عند تناولها الى تأثيرات مفيدة على صحة المضيف " وهذا يعني ان الخلايا قد تكون حية او ميتة او يمكن استعمال اجزاء منها مثل الجدران الخلوية (بشكل خاص) . ونظرا للاهتمام الشديد بهذه المجموعة من الاحياء وضعت المنظمات العالمية التابعة للأمم المتحدة (FAO / WHO) عام 2001 التعريف الخاص بالـ Probiotics لينص على انها " كائنات حية مجهرية عند تناولها بكميات كافية (قد تكون جزءا من الغذاء) تضيف فوائد صحية على المضيف " وهنا عاد التأكيد على وجوب كون الخلايا حية .

فلورا جسم الإنسان

بما ان الانسان هو الهدف من تصنيع الاغذية كان لابد من دراسة الاحياء الموجودة في جسمه والتي تتركز في الامعاء الغليظة وتكون الاحياء على العموم في الحالات الطبيعية :

● احياء ذات فوائد تضيف فائدتها بشتى الطرق مثل العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة تساعد في الهضم وتنشيط الجهاز المناعي وتثبيط الممرضات .

● احياء بدون تأثير ظاهري وربما لا يعرف دورها في الوقت الحاضر وهذه تنتظر المستقبل لاكتشافها

● احياء مؤذية وهي المؤذية للأمراض والتي قد تكون انتهازية وتظهر فعاليتها عند انعدام التوازن الصحي للجسم وتؤدي الى امراض وقد تكون ناتجة من الاصابات والبعض منها (أي المقيم في جسم الانسان بصورة طبيعية) تساعد في توليد السرطانات خاصة سرطان القولون .

صفات الاحياء العلاجية

من اهم الاحياء العلاجية المستعملة *Lb. casei* Shirota , *Lb. acidophilus* LC1, *Lb. rhamnosus* GG وهذه لها تأثيرات محسنة للصحة وقد وضعت شروط ومواصفات لهذه الأحياء وللأحياء الأخرى التي يرام استعمالها كأحياء علاجية ومنها :

- ان تكون ذات أصل بشري .
 - ان تعد من الأحياء GRAS (Generally regarded as safe) .
 - ان تكون معروفة الحساسية والمقاومة للمضادات الحيوية أي معروفة Antibiotogram
 - منتجة للمواد المضادة للميكروبات مثل إنتاج البكتريوسينات والمواد العضوية قليلة الوزن الجزيئي المثبطة .
 - لها عمليات ايض مرغوب فيها .
 - ثابتة من الناحية الوراثية والتطوعية .
 - غير ممرضة حتى في الأشخاص معلولي المناعة .
 - لا تولد الالتهابات .
 - ان تكون قادرة على اجتياز الحواجز في الجهاز الهضمي (لأنها تستعمل مع الأغذية عادة) مثل حموضة المعدة ووجود أملاح الصفراء في الأمعاء .
 - ان تكون قادرة على البقاء والعيش في الأمعاء عند ارتباطها للأغشية المخاطية للأمعاء .
 - ان يكون لها تأثير محفز للمناعة في النظام المناعي للطبقة الطلائية للأمعاء .
 - لها صفات مضادة للتطهير والتسرطن .
 - ان تستطيع العمل كوسائل لتوصيل لبروتينات والبيبتيدات العلاجية (Recombinant proteins and peptides) الى أماكن محددة من القناة الهضمية للإنسان .
 - يفضل ان تكون من الاحياء التي تتحمل العمليات التصنيعية للأغذية لان الأغذية تمثل أفضل الوسائل لإيصالها الى الأمعاء وان تكون قادرة على البقاء حية في الأغذية وبكفاءة عالية في الاغذية المعروضة تجاريا أي تكون ذات مواصفات جيدة من حيث طول مدة صلاحية المنتج .
- ويلاحظ ان أول الشروط هو وجوب عزلها من الانسان وذلك لان بعض الفوائد التي تبديها الاحياء هي متخصصة بالنوع ، كما ان هذا الشرط يضمن عدم رفض الجسم البشري لها . وتكون مهينة للالتصاق لوجود المستلمات على سطوح خلايا أمعاء الإنسان وبالتالي تتمكن من البقاء وتصيح جزءا من فلورا الأمعاء ، والمستودع الأخير هو الأمعاء الغليظة .

وفي المستودع الأخير للأحياء العلاجية توجد *Lb. acidophilus* التي تستطيع ان تعبر المعدة والأمعاء الدقيقة لتصل الى الأمعاء الغليظة ويمكن ان يبقى منها 1.3 – 1.5 % من الجرعة المعطاة عن طريق الفم ، لذلك فان تحمل الحموضة يكون ضروريا في حالة وجودها في المنتجات المخمرة التي تمتاز بارتفاع حموضتها وكذلك لتتحمل حموضة المعدة عندما تمر بها . وقد وجد ان العصيات اللبنية مقاومة للحموضة خاصة تلك المعزولة من بيئات قاسية مثل القناة الهضمية للإنسان اذ يصل الرقم الهيدروجيني في المعدة الى حوالي 2 وبذلك فهي تعد متحملة للحموضة Acid tolerant وصامدة للحموضة Aciduric والبكتريا *Lb. acidophilus* يمكن ان تبقى حية حتى عند انخفاض الرقم الهيدروجيني الى اقل من 2 ومع هذا تحافظ على الرقم الهيدروجيني داخل الخلايا بمستوى قريب من التعادل . وفي مثل هذه الحالات يتم تحفيز الجينات المسؤولة عن الاستجابة لإجهاد الحموضة وتنشيط F_1F_0 ATPase الذي يعد مهما في الاستجابة للحموضة المفرطة ويمكن ان يؤدي الى تغييرات كبيرة في أداء الخلايا للوظائف الفسلجية . وقد اعتمدت الآليات المذكورة في تطبيع بعض السلالات للعيش في حموضة مميتة كما في اللبن الرائب وتستهلك في الإنتاج .

وتمتاز الأحياء العلاجية بمواصفات خاصة بها فهي تتأثر بالأوكسجين الزائد لان موطنها الأصلي الأمعاء التي يقل فيها الأوكسجين ، لذلك يفضل المحافظة على المنتجات الحاوية عليها في علب زجاجية لمنع نضوح الأوكسجين . ولكن مع هذا توجد بعض السلالات مثل البكتريا *Lb. fermentum* المعزولة من الإنسان لها قابلية مضادة للأكسدة وتستطيع البقاء طويلا بوجود تراكيز عالية من الأوكسجين مقارنة بالسلالات التي لا تملك الصفة المضادة للأكسدة ، كما توجد بعض السلالات المتحملة للهواء .

اما البكتريا المنشطرة فتتأثر بالعديد من العوامل وظروف الإجهاد وفي العموم تكون اكثر حساسية من العصيات اللبنية ، لذلك اقتصر استعمال انواع محددة منها في الأغذية العلاجية منها *Bif. animalis*, *Bif. longum* , *Bif. pseudolongum* . وقد استعملت معها عمليات التطبيع اذ امكن تطبيع بعض السلالات بوضعها برقم هيدروجيني 5.8 لمدة ساعتين ، ثم تنقل الى رقم هيدروجيني واطئ (2) وكانت قابلية الخلايا المتطبعة تزيد 100 مرة عن الخلايا غير المتطبعة للتطبيع للحموضة . ويمكن ان تخضع لعمليات تطبيع اخرى عندما يراد استعمالها لإغراض صناعية مثل تطبيعها لإجهاد الأكسدة وذلك بتعريضها لبيروكسيد الهيدروجين بتركيز 100 جزء بالمليون لمدة ساعة وكذلك تطبيعها للحرارة المنخفضة وذلك ب تخزينها بدرجة حرارة 4°م لمدة اسبوع ، كل هذه المعاملات تساعد في ما بعد على تحمل الظروف المتطرفة التي تمر بها اثناء التصنيع .

وبما ان البكتريا المنشطرة هي احياء لاهوائية ، فوجود الهواء يؤدي الى إطالة طور التكاثر للسلالات المستعملة ، ويتغير شكل الخلايا وتصبح طويلة وتكون العقد على السطح نتيجة لعدم

انقسامها . وتتغير الحوامض الدهنية في الاغشية الخلوية اذ يقل طول السلاسل الكربونية فيها ويزداد وجود الحوامض الدهنية الحلقية (يراجع الفصل السادس) ، ويزداد فيها بروتين بوزن جزيئي 35.5 كيلو دالتون في السلاسل المتحملة للأوكسجين ويعتقد ان هذا البروتين يساعد في حماية الخلايا والدفاع عنها ضد إجهاد الأوكسجين ويمثل احد بروتينات الإجهاد .

وتتطبع الاحياء العلاجية لأملاح الصفراء وتحملها بآلية تعتمد على كراهية السطوح الخارجية للماء (CSH) Cell surface hydrophobicity فالاحياء ذات القيم CSH عالية تكون مقاومة لأملاح الصفراء والتي تكون عادة مرافقة لزيادة المقاومة لبيروكسيد الهيدروجين كعامل من عوامل الإجهاد التأكسدي ويزداد التحمل الحراري وتحمل الحموضة والخزن بدرجات الحرارة الواطئة . وعليه يمكن التحكم لمدى معين بصفات الخلايا والخارجية منها على وجه الخصوص للوصول الى أفضل تطويع للخلايا .

الاحياء العلاجية والجهاز المناعي

علاقة الاحياء العلاجية مع الجسم متعددة الجوانب وهذا يعني انها تتداخل مع شبكة الجهاز المناعي لأداء مثل هذه الفوائد وفي مقدمة الموضوع لابد من ذكر بعض الشيء عن الجهاز المناعي لفهم تداخل الاحياء العلاجية معه .

الجهاز المناعي

يدافع الجسم ضد الأحياء الممرضة والأجسام الغريبة الغازية بالاستجابة المناعية والتي تعتمد على :

- نوعية الجسم الغريب الداخل هل هو بكتريا او فطريات ، او فيروسات ، او حبوب طلع ، او مواد غذائية .
 - طريق دخول الاجسام الغريبة الى الجسم مثل طريق الفم ، الجلد ، الدم ، الرئتين ، الطبقة الطلائية للأمعاء او غيرها من المداخل .
- وعلى ضوء هذه المعطيات يتم تصرف الجهاز المناعي بعد ان تتخطى الأجسام الداخلة الدفاعات الاولى التي تكون دفاعات فيزيائية - كيميائية مثل وجود حواجز الجلد ، طبقات المخاط في الفم والأمعاء والتي تساعد في التخلص من العديد من الممرضات والأجسام الغريبة . ولذلك يمثل الجهاز المناعي خط الدفاع الثاني ضد الغازيات ، وتكون الاستجابة شاملة لعلاقات معقدة جدا بين مكوناته ومحددة بخطوات :

- التعرف على الأجسام والجزيئات الغريبة .
 - تنظيم الاستجابات والتهيئة لأحداث مقبلة .
 - تدمير الأجسام الغريبة .
- وللجهاز المناعي نوعين من الاستجابة :

◇ الاستجابة الطبيعية Innate وتكون غير متخصصة .

◇ الاستجابة المكتسبة وتكون متخصصة .

وعند التعرض للأحياء الممرضة وغير الممرضة يشارك النوعان في الاستجابة المناعية
أولا الاستجابة الطبيعية : وتشترك فيها عدة أنواع من الخلايا والتي تكون ذات طبيعة التهامية ،
 وتستجيب للمستضدات بإدخالها إلى داخل الخلايا وهذا يؤدي إلى استجابات أخرى لتبدأ سلسلة من
 الأحداث منها تقديم المستضد إلى الطرف الثاني (المكتسبة) من الجهاز المناعي . ويكون تحفيز
 الخلايا بواسطة إنتاج الساييتوكاينات (مهورات الخلايا) .

والساييتوكاينات أو مهورات الخلايا بروتينات تنتج من بعض الخلايا وتؤثر في أنواع أخرى إذ ترتبط
 إلى المستلمات على سطوح الخلايا المتأثرة ويمكن أن تحفز فعاليتها أو تخمدتها اعتمادا على نوع
 الخلايا والساييتوكاين العامل .

ثانيا الاستجابة المناعية المكتسبة وتشمل مجموعتين من الفعاليات أو الاستجابات وهي

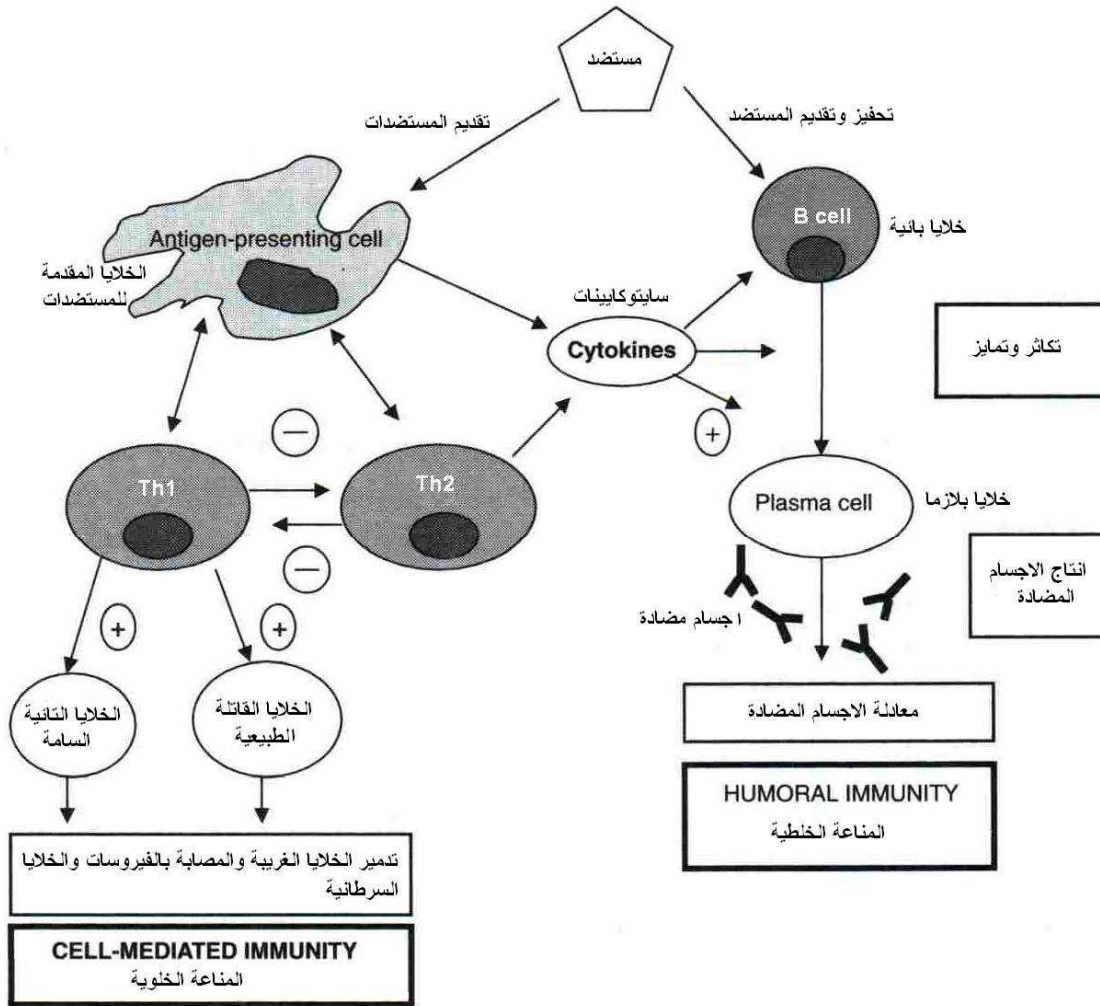
◇ الاستجابة الخلطية .

◇ الاستجابة الخلوية أي التي تتوسطها الخلايا .

وهناك تداخلات معقدة بين ذراعي الاستجابة فيما بينها وكذلك التداخل مع مكونات الاستجابة
 الطبيعية والتي يمكن إيضاحه بشكل مبسط في الشكل (64) .

ويلاحظ وجود تعاون متداخل بين الاستجابات فان تنشيط المناعة المتخصصة يحتاج إلى
 تشخيص المستضد وتقديمه بواسطة نظام المناعة الطبيعية والتي تشمل الخلايا الشجرية Dendritic
 cells والخلايا الالتهامية الكبيرة Macrophages ، والخلايا وحيدات النواة Monocytes وبعض
 الأحيان الخلايا للمفاوية البائية B - lymphocytes . اما المناعة التي تعمل فيها الخلايا التائية T -
 cells فهي تتم بواسطة خلايا تائية متخصصة البعض يقوم بقتل الخلايا مباشرة وهي الخلايا التائية
 السامة Tc وتعاونها في هذه المهمة الخلايا القاتلة الطبيعية (NK) Natural killer . وتساعد
 وتشترك في هذه العمليات الخلايا التائية المساعدة Th التي تقوم بعمليات التنظيم عن طريق
 الساييتوكاينات .

وتقسم الخلايا التائية المساعدة إلى أنواع :



شكل 64 : تداخلات مكونات الجهاز المناعي

◊ Th1 وتنتج الساييتوكاينات الالتهابية مثل $IL-2$, $IFN - \gamma$.

◊ Th2 وتنتج الساييتوكاينات المسؤولة عن الاستجابة الخلوية وذلك بإنتاجها $IL-13$, $IL-10$, $IL-4$.

◊ Th3 وتنتج بشكل رئيس $TGF-\beta$ وهو الساييتوكاين المسؤول عن تخفيض الاستجابة المناعية .

ويوجد تبادل للسيطرة بين Th1 و Th2 لتنظيم الاستجابة .

والساييتوكاينات تضم مجموعة من المكونات التي لها وظائف معينة وتؤثر في خلايا واعضاء الجسم ومنها :

▪ الانترفيرونات (IFN) Interferones .

▪ الانترلوكينات (IL) Interleukins .

▪ عوامل تحفيز المستعمرات (CSFs) Colony – stimulating factors .

■ عوامل نخر الورم (TNFs) Tumor necrosis factors .

وتوجد عوامل أخرى يمكن أن تشارك في فعاليات الجهاز المناعي .

الاستجابة الخلطية Humoral response

تتم بواسطة الخلايا البائية ، فعند تنشيطها بالساييتوكاينات التي تنتجها الخلايا التائية المساعدة تبدأ الخلايا بالانقسام والتميز لتكون خلايا البلازما Plasma cells التي تخلق وتفرز الكلوبولينات المناعية المسماة الأجسام المضادة Antibodies . والأجسام المضادة تكون قادرة على تمييز الحاتمات Epitopes وهي قطع من المستضد وتتفاعل معها مؤدية الى اغلاقها كما في منع ارتباط الفيروسات الى الخلايا التي تستهدفها .

وفي حالة الإصابات البكتيرية على وجه الخصوص يتم تنشيط مكونات المتمم Complement لغرض تفكيك الخلايا والتخلص منها .

الأنسجة اللمفاوية

إضافة الى ما ذكر اعلاه من مكونات الجهاز المناعي هناك أنسجة لمفاوية متخصصة لها صفات معينة تنتشر في بعض مناطق الجسم وأهمها بالنسبة لموضوع الكتاب هي الموجودة في القناة الهضمية فالقناة الهضمية تحوي على نظام مناعي متخصص يرتبط بالطبقة المخاطية - Mucosa associated lymphoid tissue (MALT) الذي هو جزء من الأنسجة اللمفاوية المرتبطة بالاغشية المخاطية والتي تشمل القناة الهضمية والرئتين وغيرها ويطلق على الجزء الموجود في القناة الهضمية Gut-associated lymphoid tissue (GALT) .

وتستقبل القناة الهضمية عددا هائلا من المستضدات الميكروبية الموجودة في الغذاء عن طريق الفم . وأهم الدفاعات في القناة الهضمية :

■ الدفاعات التي تتم بواسطة عصارات الهضم وتساعد في ذلك طبقة المخاط الداخلية والفلورا الطبيعية في منع دخول الاحياء المجهرية الى داخل أنظمة الجسم .

■ الخط الدفاعي الثاني هو GALT ويتكون من الأنسجة اللمفاوية للفانفي (Ileum) متمثلة بجيوب باير Peyer's patches اضافة الى العديد من الخلايا المناعية مثل الخلايا التائية والبائية او خلايا البلازما وكذلك الخلايا الابتلاعية الكبيرة والخلايا الصارية Mast cells والخلايا المحبة للحموضة Eosinophiles والمحببة للقاعدية Basophiles والعدلات Neutrophils . و GALT يحوي على ما يقرب من 60 بليون خلية وتشكل الخلايا المذكورة حوالي 25 % من خلايا الطبقة المخاطية للأمعاء ، وأهمها الخلايا البائية التي تفرز الكلوبولين sIgA الذي يوجد في سوائل

الجسم الأخرى مثل اللعاب والمخاط واللبأ Colostrum والدموع . ويضم sIgA الى خط الدفاع الأول اذ يقوم بالارتباط و غلق دخول عددا من الممرضات المعوية .

ان عملية إيجاد الفلورا الطبيعية في الأمعاء تعد أساسية لتطوير جهاز مناعي فعال ومتوازن ومنها تطور الخلايا البائية المنتجة للـ IgA .

تأثير إعطاء الاحياء العلاجية على المؤشرات العامة : إعطاء العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة يزيد من IgA وكذلك يزيد من أعداد الخلايا المنتجة له ، وفي بعض الاحيان تؤدي هذه الزيادة في بعض الحيوانات الى زيادة IgM والخلايا المنتجة له ، كما ان إعطاء اللبن الرائب يؤدي الى زيادة طول زغابات الأمعاء مما يشجع زيادة امتصاص الاغذية والاهم زيادة إفراز المخاط وبذا يمنع انتقال البكتريا الموجودة في الامعاء الى أنسجة الجسم ويزيد من وظيفة الامعاء كحواجز .

والبكتريا الموجودة في اللبن الرائب التقليدي المصنع في الأساس من *St. thermophilus* , *Lb. bulgaricus* ، المكورات معزولة من مواد نباتية والعصيات معزولة من الحليب لا تستطيع استيطان أمعاء الانسان او الحيوان فهي لا تتحمل حموضة المعدة العالية وأملاح الصفراء في الأمعاء الدقيقة . فعند استعمالها يبقى منها 15 % حيا بعد عبور المعدة ويبقى 1 % عندما تصل الى الأمعاء الغليظة ، وهناك يفشل المتبقي منها في استعمار الامعاء ، ولكنها تبقى مؤثرة نتيجة احتوائها على الإنزيمات إضافة الى مواد الايض والبيبتيدات الناتجة من تخميرها للحليب . لذلك فان إطعامها يساعد العصيات اللبنية الاخرى والبكتريا المنشطرة على النمو في الأمعاء ، أي انها تؤثر على الفلورا الميكروبية وتزيد من امتصاص الأغذية . ويؤثر تناولها على عدد من المؤشرات الحيوية في الجسم مثل كلوكوز البلازما ، والأنسولين والكليسيريدات الثلاثية والكوليسترول والحوامض الدهنية والحوامض الدهنية قصيرة السلسلة . كما انها تساعد في تخمير المواد غير القابلة للهضم مثل النشا المقاوم والسيليلوز والبكتات والصمغ ، كما ان تناولها يحفز عددا كبيرا من الجينات لإنتاج بروتينات تساعد في امتصاص الأغذية وتايضها .

وتحور الاحياء العلاجية من قبط المستضدات اضافة الى تحويلها مستضدية بعض المواد مثل الكازين وغيرها من البيبتيدات الى مواد ذات صفات مستضدية اقل .

وتلعب GALT دورا مهما في خفض الاستجابة للمستضدات الشائعة مثل الأغذية وكذلك البكتريا المتعايشة في الأمعاء لذلك تكون لها استجابة عابرة في بداية الأمر ثم تستبدل الى حالة تحمل ، اضافة الى كونها احد خطوط الدفاع كما ذكر سابقا . ان استجابة الخلايا التائية تتحد بطبيعة وجرعة ووقت وطريقة دخول المستضد ، وبالتالي ستكون الاستجابة اما واطئة او تؤدي الى تحسس مفرط ، والعامل الأساس في توجيه الاستجابة المناعية بعد التحفيز بالمستضد يعتمد على الساييتوكاينات المنتجة من قبل الخلايا التائية .

الحساسية

تحدث أمراض وأعراض الحساسية نتيجة لتوجيه الاستجابة المناعية من قبل المحسس Alergen للخلايا التائية المساعدة Th2 التي تقوم بإنتاج كميات مفرطة من IL - 4 من قبل الخلايا Th2 ويكون ذلك مرافقا لانخفاض في إنتاج γ - IFN ، ووجود كميات كبيرة من IL - 4 يحفز الخلايا البائية لإنتاج IgE و IgG2 ويثبط استجابة Th1 ويمنعها من إنتاج γ - IFN . والأخير عند زيادته ونشاطه يثبط تكاثر Th2 ويمنع إنتاج IgE و IgG2 وبدلا عنه يحث إفراز IgG2a , IgG3 .

ويعد إنتاج IL - 12 من المحفزات القوية لحث إنتاج γ - IFN من الخلايا القاتلة الطبيعية والخلايا Th1 ويثبط تطور استجابة الخلايا Th2 مباشرة أي دون الاعتماد على γ - IFN . وقد ازدادت أمراض الحساسية في الدول المتقدمة نتيجة الإجراءات الصحية المفرطة ، اذ ان عدم وجود الميكروبات وتحفيزاتها يؤدي الى حدوث حالة عدم توازن بين الاستجابات المناعية للخلايا Th1 , Th2 مؤديا الى تطور الحساسية التي يتوسطها IgE . وقد افترض ان الإصابة بفيروسات الحصبة وغيرها من الاصابات الفيروسية تلعب دورا اساسيا في الحماية من Atopic diseases . لذلك فان تعرض الجسم للمستضدات الميكروبية الذي يحصل في الأيام الأولى او بالأحرى الساعات الأولى بعد الولادة يلعب دورا مهما في توفير اكبر المحفزات في توجيه الاستجابات المناعية وذلك بالابتعاد عن نمط Th2 وتوجيهه للاستجابات الى النمط الذي تشارك فيه Th1 والتي تكون شائعة في الأشخاص غير المؤهلين للإصابة بأمراض الحساسية (Non - atopic) فالفلورا الداخلية في امعاء المتحسسين لا تشبه الفلورا للأطفال غير المتحسسين او بدون أمراض الحساسية ، ففي المجموعة الأولى أي في الأطفال الحساسين تكثر عندهم البكتريا الهوائية مثل Coliform و *Staph. aureus* وبعمر سنتين تكثر عندهم Clostridia وقليل من البكتريا المنشطرة ، في حين ان الأطفال اللذين لا يشكون من امراض الحساسية تكثر عندهم العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة ، وبذلك تختلف المواد الايضية التي توجد في الغائط والتي تستعمل كمؤشرات لتقييم حالة الطفل ، اذ تختلف الحوامض الدهنية ، فالأطفال المتحسسين يكثر عندهم L- caproic acid مما يشير الى كثرة *Cl. difficile* عندهم .

تأثير بكتريا حامض اللاكتيك على الاستجابات المناعية في الأمعاء

وجود بكتريا حامض اللاكتيك في الامعاء يوفر مصادر جديدة من الحوافز لحفظ الاستجابة الدائمة للخلايا Th1 . كما انها تحفز استجابة مناعية متخصصة وغير متخصصة وذلك لاختلاف مواقع تأثيرها في الأمعاء مما يؤدي الى حصول استجابات مختلفة . فهي يمكن ان تتداخل مع جيوب باير بواسطة الخلايا M cells او الخلايا الطلائية الخاصة (FAE associated - Follicle

(epithelium) او بواسطة الخلايا الطلائية العاملة في الامعاء الدقيقة والغليظة وهذا ما يفسر تنوع الاستجابة المناعية للطبقة المخاطية Mucosa .

فالتداخل مع خلايا M cells يحفز بشكل أساسي استجابة مناعية متخصصة ، اما التداخل مع FAE فيؤدي الى استجابة غير متخصصة او استجابة الالتهابية وان كانت هذه الاستجابة تتحول الى استجابة متخصصة في مراحل متأخرة . اما التداخلات مع الخلايا الطلائية فانه يؤدي الى تحسين المناعة الوضعية او التحمل بواسطة التخلص من المستضدات Antigen clearance .

الأغذية المتخمرة والساييتوكينات : تؤثر الأغذية المتخمرة عند تناولها على انتاج الساييتوكينات فالعديد من الاحياء مثل *St. thermophilus* , *Lb. bulgaricus* والبكتريا المنشطرة تؤثر داخل الانظمة الحية في انتاج الساييتوكينات كما موضح في الجدول (29) .

جدول 29 : تأثير بكتريا حامض اللاكتيك والبكتريا المنشطرة الحية المحفز في انتاج الساييتوكينات داخل الانظمة الحية

البكتريا	الخلايا المحفزة	TNF- α	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-12	IFN- γ
<i>Lb. bulgaricus</i> E585	PMN* C	+	+			+	+	+	
<i>Lb. bulgaricus</i> *	PMNC	+	+						+
<i>Lb. acidophilus</i> **	PBMC	+	+			+		+	+
<i>Lb. acidophilus</i> E507	PMNC	+				+	+		
<i>Lb. acidophilus</i>	الخلايا الطلائية				+			+	+
<i>Lb. casei</i> *	PMNC		+	+	+	+	+	+	+
<i>Lb. rhamnosus</i>		+	+			+	+	+	+
<i>Lb. sakei</i>								+	+
<i>Bifidobacterium</i>		+	+	+		+			+
<i>St. thermophilus</i>	PMNC	+	+			+			+

* PMNC (خلايا متعددة اشكال النوى Polymorphonuclear cells)
** سلالات مختلفة

اما الخلايا المقتولة بالحرارة فتؤدي الى تحفيز إنتاج عددا من الساييتوكينات في الانظمة الحية كما موضح في الجدول (30) .

جدول 30 : تأثير بكتريا حامض اللاكتيك والبكتريا المنشطرة المقتولة بالحرارة في انتاج السايٹوكاينات خارج الانظمة الحية

البكتريا	TNF- α	IL-1 β	IL-2	IL-6	IL-10	IL-12	IFN- γ
<i>Lb. acidophilus</i> La1	+			+			
<i>Lb. bulgaricus</i> 1489	+			+			
<i>Lb. bulgaricus</i>	+		+	+			
<i>Lb. casei</i>						+	+
<i>Lb. casei</i> B ATCC 11578	+	+			+		
<i>Bifidobacterium</i>	+		+	+			
<i>St. thermophilus</i> St-133	+			+			
<i>St. thermophilus</i> سلالات مختلفة	+		+	+			

علاقة الاحياء العلاجية بالسرطان

يعد السرطان من الأمراض ذات العلاقة المباشرة بهبوط المناعة . وتلعب الخلايا القاتلة الطبيعية NK دورا مهما في منع توليد السرطانات ، ويعد IL-12 من الحاثات القوية للخلايا ، وهناك عددا من الاحياء التي تحفز إنتاجه ومنها *Lb. casei* Shirota وتؤدي الى زيادة عدد وفعالية الخلايا القاتلة الطبيعية المسماة للخلايا السرطانية وبذا يقل حدوث الأورام . وتزداد فعالية الخلايا بازدياد تناول اللبن الرائب . وقد تكون الفعالية التنشيطية للسرطانات ناتجة عن تنظيم الاستجابات الالتهابية التي تحدث بواسطة المسرطنات والتي تكون عن طريق :

- زيادة عدد الخلايا المنتجة للـ IgA وزيادة عدد الخلايا التائية CD4⁺ .
 - تقليل عدد الخلايا CD8⁺ وتقليل فعاليتها السامة .
 - زيادة استماتة الخلايا الهاربة من الجهاز المناعي والتي تكون نتيجة زيادة مستويات TNF الذي يستحث بالمنتجات اللبنية .
 - حث وإطلاق IL-10 الذي يلعب دورا مهما في تقليل الاستجابة (التنظيم السلبي) .
- وهذا يشير الى وجود عدة آليات تعمل في التحفيز المناعي بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك وبذلك يكون من الصعوبة إيجاد سلالة كفؤة ولها قابلية عالية على التحفيز المناعي بكافة جوانبه . والعديد من البكتريا لا تؤدي الى حالات الالتهابات اذ لا تقوم بتحفيز TNF- α و IL-1 β الا في حالات نادرة وتتم بواسطة *Lb. bulgaricus* وهي ليست من الأحياء العلاجية ذات الأصل

البشري ، وهذه السايبتوكاينات تحصل زيادتها عند أمراض معينة مثل الحساسية والربو وأمراض أخرى من أمراض المناعة الذاتية . ففي الأطفال المصابين بالأكزيما Atopic eczema والحساسية لحليب البقر فإن إعطائهم خلطات معدة من الشرش Whey الحاوي على *Lactobacillus rhamnosus* GG يؤدي الى نقصان α - TNF في الغائط .

ومن جهة ثانية فإن الأحياء العلاجية مثل العصيات اللبنية وبكتريا *Enterococcus faecalis* لها القابلية على منع حالات التطفير بشكل يعتمد على الجرعة لبعض المواد الكيماوية المسرطنة وكذلك بعض العوامل الفيزيائية كما تم تاييده باستعمال سلالات ايمس (*Sal. typhimurium*) فعند استعمال السلالة TA97 كان الانخفاض في قابلية التطفير بنسبة 72 % وعند استعمال السلالة TA100 كان الانخفاض بنسبة 55 % مقارنة باستعمال مواد كيماوية مطفرة موثقة .

ومما يعقد توضيح تفاصيل العلاقة بين الجهاز المناعي والأحياء العلاجية يعود الى تعقيد الجهاز المناعي وتعقيد فسلجة الأحياء المستعملة خاصة داخل الانظمة الحية التي لا يمكن محاكاتها لاستخلاص النتائج .

الأحياء العلاجية والكولسترول

يعد الكولسترول من أهم أسباب الأمراض التاجية ومنها تصلب الشرايين التي تؤدي الى الوفيات في جميع انحاء العالم كسبب اول . وتكون تراكيز الكولسترول الكلي ومتعلقاته من الدهون بتركيز مثلي تصل الى 200 ملغم / 100 مللتر من الدم . والدهون واطنة الكثافة LDL 100 ملغم / 100 مليلتر والدهون عالية الكثافة HLD 40 ملغم / 100 مليلتر ، اما الكليسيريدات الثلاثية تكون بتركيز تصل الى حوالي 150 ملغم / 100 مليلتر . ولكن هذه النسب تضطرب خاصة عند وجود عوامل الخطر مثل زيادة الوزن وارتفاع ضغط الدم او السكري وكذلك الحياة قليلة الحركة والتدخين والضغط النفسية .

وتعد الألبان وما تحويه من احياء علاجية من العوامل المخفضة للكولسترول ، وتناول المنتجات يؤدي الى تغيير كل المتعلقات بالكولسترول مثل الدهون قليلة الكثافة والعالية الكثافة والكليسيريدات الثلاثية . ومن أهم مواصفات السلالات المستعملة لتخفيض الكولسترول هو تحملها لألاح الصفراء ، وتعمل السلالات باليات مختلفة منها :

- تفاعلات فك الاقتران Deconjugation لألاح الصفراء بانزيمات التحلل المائي ، اذ تعمل على فك اقتران املاح الصفراء والذي يكون طريقا غير مباشر لسحب الكولسترول ، وذلك فان قلة حوامض الصفراء ودورها المعوية الكبدية يؤدي الى سحب الكولسترول من الدم الى الكبد لتخليق حوامض الصفراء في الكبد .
- تمثيل الكولسترول من قبل بعض السلالات .

• التأثير الفسلجي لمنتجات الايض الموجودة في المنتجات المخمرة مثل تأثير الحوامض الدهنية قصيرة السلسلة على تخليق الكولسترول في الكبد وإعادة توزيعه في الجسم .
ومن الاحياء المؤثرة في خفض الكولسترول بكتريا *Ent. faecium* التي تستعمل مع *St. thermophilus* لإنتاج المنتج (Causido) Gaio المستعمل لخفض الكولسترول .
والبكتريا *Ent. faecium* بكتريا موجبة لصبغة كرام مكورة تعيش في مدى واسع من الحرارة والأرقام الهيدروجينية وتنمو في المحاليل الملحية ، توجد في امعاء الانسان ولها القابلية على مقاومة عدد من المضادات الحيوية ومنها التتراسايكلينات والارثرومايسين ، والكلورومفينيكول و ،
Sulfonamides ، Clindamycin . ويصل مستواها في أمعاء الانسان الى 10^{-4} - 10^{-5} وحدة تكوين المستعمرات / غم من محتويات الامعاء ، اما البكتريا الاخرى القريبة منها *Ent. faecalis* فتصل الى 10^{-5} - 10^{-7} لكل غرام من محتويات الامعاء ويتأثر تعدادها باختلاف الأشخاص والأغذية وغيرها من الأسباب .

ويمكن ان تسبب الإصابة في المستشفيات والاهم من هذا ان بعض سلالاتها تقاوم المضاد Vancomycin أي انها من مجموعة (VRE) ، وتشير التجارب الى ان تناول منتج Gaio الحاوي عليها يؤدي الى عدم حصول الإصابة لذلك حثت الجهات المختصة مثل Industrial platform LAB على عدم استعمالها الا في حالات الضرورة القصوى .

وخفض الكولسترول بنسبة 10 % يقلل من خطر الوفيات بنسبة 10 % وتقل نسبة الإصابات القلبية بنسبة 15 % ، ولذلك فان زيادة تعداد الخلايا العلاجية في الامعاء الى 10^4 خلية / غم من محتواها إضافة الى وجود مساعدات العلاج Prebiotics يعد من العوامل المساعدة في خفض الكولسترول اضافة الى تأثيراتها الايجابية الاخرى على صحة الانسان . وهذه الحالات تؤثر بشكل كبير على دهون مصل الدم والبروتينات الدهنية مؤدية الى ايجاد نسق متوازن لمكوناتها ، وذلك لان البكتريا تبدأ بتنشيط خلايا العدلات من الجهاز المناعي التي تقوم بإنتاج مركبات الأوكسجين الوسطية النشطة التي تقوم بأكسدة البروتينات الدهنية التي تساهم في عملية تصلب الشرايين Atherosclerosis ، وهذه تشير الى ان البكتريا تؤثر على عمليات أكسدة الدهون وبالتالي تقلل من الكولسترول . كما ان استعمال اللبن الرائب المخمر بالبادئ التقليدي يقلل من الكولسترول و LDL في حين انها لا تؤثر على الكليسيريدات الثلاثية ، والتأثير يعزى للعصيات ، اما *St. thermophilus* فلها تأثير التآزر والذي تظهره مع البكتريا الاخرى *Lb. casei* لخفض الكولسترول .

توازن فلورا المهبل

قلة العصيات اللبنية في المهبل يهيئ للإصابات الخطيرة منها التهاب المهبل ، وتعرض النساء عند قلة العصيات الى سهولة الإصابة بالايذز وداء المشعرات Trichomonas وإصابة القناة

البولية - التناسلية مثل الإصابة بـ *C. albicans* وهناك مستحضرات علاجية كثيرة تحوي على *Lb. acidophilus* , *Lb. casei* تسوق وتستعمل لاستعادة توازن الفلورا والقضاء على دواعي الأمراض المذكورة وغيرها .

وتستعمل الاحياء العلاجية لمعالجات اخرى ، فمثلا تناول الحليب المتخمر يحسن من امتصاص الكالسيوم ويساعد في منع مرض هشاشة العظام Osteoporosis ، ويساعد ايضا في منع إعتام عدسات العيون وغيرها من التأثيرات الايجابية . وتستعمل الاحياء العلاجية في عالم الحيوان والنبات .

الببتييدات العلاجية

للاحياء العلاجية وخاصة بكتريا حامض اللاكتيك تأثيرات متعددة – كما ذكر في مستهل الموضوع – فالبكتريا عندما تخمر الحليب والأغذية الاخرى تقوم بتحليل البروتينات لإنتاج الببتييدات والحوامض الامينية لاستعمالها في النمو . وهناك حوالي 25 % من الببتييدات الناتجة هي التي تنتقل الى داخل البكتريا وتستعمل في النمو اما الباقي فتبقى في الحليب لانها لا تنتقل من قبل الخلايا . وبصورة عامة تنتقل الخلايا الببتييدات بطول اقل من 11 حامض أميني وان كانت هناك بعض الاستثناءات لسلاسل تنتقل ببتييدات بطول 18 حامض أميني . وعليه فان الببتييدات التي تبقى في وسط التخمر هي التي تشكل الببتييدات ذات الأهمية الحيوية .

وهذه الببتييدات توجد في بروتينات الحليب وتنطلق بعمليات التخمر التي تجري عليه ولهذه الببتييدات تأثيرات مختلفة منها ما له فعالية مخدرة (Opiate peptides او Morphinomimetic peptides) ، والاخرى مضادة للتخثر ، وببتييدات خافضة لضغط الدم كما ان البعض له تأثير قاتل للميكروبات واخرى محورة للمناعة والبعض تكون حاملة للمعادن .

ولذلك فان الحليب والببتييدات الفعالة حيويًا ومواد الايض الاخرى الناتجة أثناء التخمر تلعب الدور الأهم في تحسين الصحة وتقليل الإصابة بالعديد من الامراض وهذه الببتييدات هي التي تشارك في العلاج الحيوي Probiotics فالبعض منها له فعالية مشابهة للهرمونات . وتوجد الببتييدات في حليب اللبائن والبعض منها تتشابه في تواليات الحوامض الامينية وتوجد بعض هذه الببتييدات في النباتات وفي الحيوانات تعمل كببتييدات محورة للمناعة كما في فول الصويا وفي ألبومين الرز .

وتوجد في الحليب المتخمر العديد من الببتييدات المشتقة من بروتينات الحليب التي لها تأثيرات عصبية وفلسجية وفعاليات تنظيم جهاز الدوران ، والجدول (31) يوضح اهم الببتييدات الموجودة في حليب الأبقار وفعاليتها الوظيفية .

جدول 31 : الببتيديات ذات الفعالية الحيوية المشتقة من بروتينات الحليب

الببتيدي	المصدر البروتيني	الفعالية
Casomorphins	كازين - ألفا ، كازين - بيتا	مخدرة
α - Lactorphin	α - Lactalbumin	مخدرة
β - Lactorphin	β - Lactoglobulin	مخدرة
Lactoferrodoxins	Lactoferrin	مضادة للتخدير
Casxins	كازين - كابتا	مضادة للتخدير
Casokinins	كازين - ألفا ، كازين - بيتا	مخفضة لضغط الدم
Lactokinins	β -Lactalbumin , β -Lactoglobulin , اليومين المصل	مخفضة لضغط الدم
بيبتيديات مخفضة لضغط الدم	كازين - بيتا	مخفضة لضغط الدم
بيبتيديات مؤثرة على المناعة	كازين - ألفا ، كازين - بيتا	محورة للمناعة
Lactoferricin	Lactoferrin	مضادة للميكروبات
Casocidin	كازين α s2	مضادة للميكروبات
Isracidin	كازين α s1	مضادة للميكروبات
Casoplatelins	كازين - بيتا	مضادة للتخثر
بيبتيديات فوسفاتية	كازين - ألفا ، كازين - بيتا	رابطة للمعادن

إطلاق الببتيديات أثناء التخمير

تكون الحوامض الأمينية الحرة في الحليب محدودة ولا تساعد في نمو بكتريا حامض اللاكتيك ، لذلك تعتمد الخلايا على أنظمة معقدة في تحليل البروتينات لضمان نموها الأمثل في الحليب . وتتكون الانظمة من انزيمات محللة للبروتينات Proteinases واخرى محللة للببتيديات Peptidases إضافة الى أنظمة نقل الببتيديات ومنها :

- الانزيمات المحللة للبروتينات الموجودة عند الحدود الخارجية للخلايا أي في أغلفة الخلايا وتقوم بتحليل البروتينات وبشكل خاص كازينات الحليب الى الببتيديات .
- انظمة نقل الببتيديات وتقوم بنقل الببتيديات الناتجة الى داخل الخلايا .
- الانزيمات المحللة للببتيديات وهذه توجد في الغالب داخل الخلايا وتقوم بتحليل الببتيديات الداخلة الى ببتيديات اصغر وحوامض امينية لاستعمالها من قبل الخلايا . وهي تضم مدى واسعا من الانزيمات منها ما يحلل الببتيديات الثنائية Dipeptidases والثلاثية Tripeptidases . والبعض منها Aminopeptidases او Endopeptidases .

Endopeptidases : ومعظمها داخل الخلايا . ومن امثلتها PepO الذي له فعالية قطع البيبتيدات من الداخل وهو من الانزيمات الحاوية على المعادن ، والإنزيم PepX يختص بتفكيك البيبتيدات القصيرة ويطلق البيبتيدات الثنائية الحاوية على الحامض الاميني البرولين .

Aminopeptidases : انزيمات تفصل حامض أميني واحد من الطرف الاميني للبروتين ومنها PepC , PepN والتي تكون ذات تخصصا واسعا تجاه الأواصر البيبتيدية . اما PepA فهو يطلق الكلوتمات من الطرف الاميني .

ويمكن للبيبتيدات ان تنفلق بعدد من الإنزيمات الا ان البيبتيدات الحاوية على البرولين تحتاج الى انزيمات خاصة بها وهذا يعد مهما بالنسبة لنمو البكتريا بشكل أفضل ، فالانزيمات Proline aminopeptidases مثل PIP و PepI تكون متخصصة للبيبتيدات الثنائية PIP والثلاثية PepI وتقوم بفصل ثمالة البرولين من النهاية الامينية للبيبتيد .

البيبتيدات الحيوية في منتجات الحليب

إنزيمات الخلايا البكتيرية المستعملة في التخمر تكون ذات تخصصا عاليا وهي التي تطلق البيبتيدات الحيوية ذات الفعالية القوية . وعند تناول المنتجات يستمر تأثير الانزيمات الميكروبية قبل ان تتعرض البروتينات للانزيمات الهاضمة في الأمعاء والتي تزيد من اطلاق البيبتيدات الصغيرة لذلك كان تحلل البروتينات وهضمها في الامعاء افضل بتناول اللبن (الحليب الرائب) مقارنة بتناول الحليب غير المتخمر . اضافة الى ان التحليل الميكروبي للحليب يعرض الأجزاء الداخلية من بروتيناته للإنزيمات الهاضمة في الجهاز الهضمي لإنتاج بيبتيدات حيوية أكثر .

ومن بروتينات الحليب المهمة α_{s1} - casein و β - casein التي توجد بكميات كبيرة وتكون حساسة جدا للتحلل البروتيني ويمكن لهذه البروتينات إطلاق أكثر من 20000 من البيبتيدات المختلفة . وتعد البكتريا *Lb. helveticus* R389 الأقوى من ناحية قابليتها على تحليل البروتينات من بين بكتريا حامض اللاكتيك المعروفة وتظهر قابلية قوية ضد عمليات التطفير . وهناك سلالات تطلق بيبتيدات تساعد في خفض ضغط الدم .

واضافة الى الكازينات هناك بروتينات الشرش التي يمكن ان تطلق البيبتيدات الفعالة عند تخميرها بـ *Lactobacillus* GG وكذلك عند استعمال الخميرة *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* (سابقا *Kluyveromyces fragilis*) .

ويمكن ان تطلق بعض البيبتيدات الفعالة من هضم بروتينات الكازينات بانزيمات التربين والبيسين .

واضافة الى الحليب فان الجبن المنضج يعد مصدرا مهما للبيبتيدات الفعالة المختلفة والتي تنتج بعد مدة قصيرة او متوسطة من بدء عمليات الإنضاج ، ويكثر فيه البيبتيد المثبط للإنزيم

Angiotensin- I converting enzyme (ACE) مما يؤدي الى خفض ضغط الدم . وهذه تكون في المراحل الاولى من عمليات الانضاج نظرا لتفككها في المراحل الإنتاجية المتأخرة ، وتؤثر البيبتيدات الفعالة المنتجة على الانزيمات الحالة للبروتينات في البكتريا عند زيادتها .

تأثير البيبتيدات الحيوية على المناعة

ذكر سابقا ان تناول الحليب المخمر ببكتريا حامض اللاكتيك او استخدام البكتريا مباشرة يؤثر على الاستجابة المناعية بشكل ايجابي مثل زيادة sIgA وزيادة فعالية الخلايا الملتزمة و انتاج الاجسام المضادة خاصة عند الاستجابة للاصابات . والخلايا كي تكون فعالة لابد لها من الالتصاق بالطبقة المخاطية ولكن هناك مكونات أخرى تساعد في الاستجابات الايجابية ومنها :

1- نواضح اللبن الرائب من الميز الغشائي Dialysates والاجزاء الناتجة من عمليات التبادل الايونات من اللبن لها تأثير كبير في تثبيط الأورام في الفئران .

- المركبات الذائبة الناتجة من تخمر الحليب يمكن ان تمنع اضطرابات القناة الهضمية والسرطانات .
- طافي Supernatant الحليب المخمر بالبكتريا *Lb. casei* , *Lb. acidophilus* يزيد من الاستجابة المناعية دون وجود العصيات نفسها .

- راشح اللبن الرائب يزيد من إنتاج γ - IFN وزيادة فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية من لمفاويات الدم المحيطي البشري خارج الجسم الحي .

- المواد الذائبة من منتجات تخمر بكتريا حامض اللاكتيك تؤثر في فعالية الخلايا الابتلاعية الكبيرة وهذا يعني ان الجزء الخالي من الخلايا يساعد في إنتاج السايبتوكاينات مثل IL - 6 .

ووجد ان البيبتيدات الناتجة من تحلل كازين - كاسا (casein - κ) بتأثير السلالة *Lactobacillus GG* يزيد من استجابة اللمفاويات البشرية للمشطرات Mitogens في مزارع الخلايا ، وكذلك تؤثر نواضح تحلل الكازين - بتا والبيبتيدات الناتجة من تأثير البكتريا *Lb. helveticus* اذ تزيد من قابلية تكاثر لمفاويات الدم المحيطي البشري .

بيبتيدات الكازين المحورة للمناعة

توجد بعض البيبتيدات في بروتينات الحليب لها القدرة على تحويل الاستجابة المناعية منها ما هو مشتق من الكازينات وأخرى من بروتينات الشرش وكذلك بروتين Lactoferrin . فمن امثلة بيبتيدات الكازين κ - caseinoglycopeptide (CGP) التي تنتج من هضم كازين - كاسا بانزيم الكايموسين (Chymosine) تؤدي الى إخماد عمليات التكاثر خلايا الطحال الفار المحفز بـ LPS او Phytohemagglutinin . والبيبتيد المكون من Try-Gly المنتج من الكازين نفسه يزيد من تكاثر الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي البشري المنشطة باستعمال Concanavalin A ، ومثل هذه البيبتيدات

الصغيرة يمكن ان تعبر الامعاء بكميات كبيرة نسبيا وتصل الى الخلايا الموضعية . اضافة الى ذلك فان نواتج هضم كازين - كابا بالتربسين والبيبسين تساعد في زيادة انتاج $IL-4$ - γ IFN . وعند هضم الكازين من الحليب البشري تنتج منه عدة بيبتيديات منها البيبتيد السداسي Val-Glu-Pro-Ile-Pro-Try الناتج من الهضم بالتربسين يساعد في حماية الفئران من الاصابة بـ *K. pneumoniae* عند حقنه بالوريد ، اما خارج الأنظمة الحية فيؤدي البيبتيد السداسي الى تحفيز عمليات ابتلاع كريات دم الأغنام بواسطة الخلايا الالتهابية الكبيرة المأخوذة من غشاء خلب الفئران . وتحصل مثل هذه الفعاليات بواسطة البيبتيدات الناتجة ايضا من هضم α_s1 - casein بالإنزيمات . وكذلك الحال بالنسبة للبيبتيديات الناتجة من الكازين - بتا ، اذ تكون تأثيراته اما محفزة او مثبطة اعتمادا على التركيز ودرجة التحلل .

اضافة الى بروتينات الكازين وبيبتيدياتها فهناك بروتينات اخرى في الحليب مثل بروتينات الشرش و α - lactalbumin , Lactoferrin يمكن ان تنتج بيبتيديات ذات تأثيرات فسلجية مهمة . فتحليل اللاكتوفيرين والالبومين بواسطة التربسين او الببسين تكون البيبتيدات الناتجة محورة لفعاليات كل من الخلايا التائية والبائية ، فالمستحضرات التجارية الحاوية على متحلات α - lactalbumin تحفز الخلايا البائية عند غياب الخلايا التائية التي تتعاون معها ، أي يكون تحفيزها غير معتمد على الخلايا التائية .

ومن البيبتيدات المهمة الاخرى Lactoferricin B الذي ينطلق من اللاكتوفيرين ويعمل على اخماد عملية انتاج IL-6 من الخلايا وحيدات النواة المحفزة بالـ LPS ويمكن ان يحفز انتاج IL-8 من الخلايا متعددة النوى البشرية (PMN) Human polymorphonuclear leucocytes .

تأثير الحليب على نمو الاورام

مثلما تبين اعلاه تأثير البيبتيدات على الجهاز المناعي ، وزيادة IgA يمكن ان تستغل لمنع الاصابات وتطور الاورام ، اذ ان IgA يعد من الحواجز المناعية ضد أورام القولون ولذلك فان تحوير الاستجابة المناعية يمكن ان يؤثر في منع توليد الاورام . فالبيبتيد الناتج من استعمال *Lb. helveticus* يمنع توليد ورم Fibrosarcoma في الفئران وهو من الأورام المعتمدة على المناعة .

البيبتيديات المخفضة لضغط الدم

العوامل المخفضة لضغط الدم تقسم وفق تأثيرها الى :

- مدرات البول Diuretics .
- Sympatholytic agents .
- مثبطات ACE (Angiotensin - I conversation enzyme) .

- غالقات قنوات الكالسيوم .
 - ممدات الشرايين Arterial vasodilators .
- يخفض ضغط الدم بتنشيط الانزيم ACE الموجود في الرئات والأوعية الدموية وجدران الطبقة المخاطية ، ويكون احد المكونات الأساسية لنظام Renin – angiotensin system (RAS) الذي ينظم الضغط الشرياني وحجم الدم وموازنة الالكتروليتات .
- ويقوم الرنن Renin والذي هو من البروتيازات (Aspartic proteinase) واحد مكونات RAS بتحليل البروتين Angiotensinogen مؤديا الى انتاج بيببتيد مكون من 10 حوامض امينية يسمى Angiotensin I ثم يقوم الإنزيم ACE بتحليل الببتيد الأخير ليعطي Angiotensin II وهو بيببتيد مكون من 8 حوامض امينية بعد ازالة ثمالتى الهستيدين – الليوسين من النهاية الكربوكسيلية . والبيببتيد Angiotensin II يكون مقلص للأوعية الدموية ولذلك فان أي مثبط للإنزيم يعد خافضا للضغط . وتوجد العديد من البيببتيدات المثبطة للإنزيم ACE التي عزلت من كازينات الحليب وبروتينات الشرش وكذلك من بروتينات الصويا والأسماك ومن بروتينات الحبوب ، ولكن تعد كازينات الحليب المصدر الأساسي لها ويوضح الجدول (32) بعضا منها .
- وتوجد بعض البيببتيدات ذات الفعالية العالية غير المسجلة في الجدول اذ تكون IC_{50} لها (كمية البيببتيد اللازمة لتنشيط 50 % من فعالية الإنزيم ACE) واطئة جدا عزلت من المنتج Calpis وهو حليب حامضي مخمر باستعمال *Lb. helveticus* وخميرة الخبز *S. cerevisiae* وهي بيببتيدات ثلاثية بالتوالي Ile-Pro-Pro او Val-Pro-Pro أي حاوية على البرولين في النهاية الكربوكسيلية . وتوجد العديد من البيببتيدات الناتجة من الجبن المنضج او الشرش المخمر بانواع من بكتريا حامض اللاكتيك والخميرة *K. marxianus* التي لها تأثير مشابه . وتختلف البيببتيدات في التأثير مما يشير الى وجود آليات او مسارات قد تكون غير مباشرة تؤثر على خفض ضغط الدم .
- وتعريض البيببتيدات الطويلة نسبيا الى تحليل أكثر يزيد من قوتها التنشيطية للإنزيم ACE بعد إزالة حوامض امينية أكثر من الطرف الكربوكسيلي مما يؤدي الى زيادة قابليتها في خفض ضغط الدم . وقد جربت البيببتيدات في الإنسان فكانت نتائجها جيدة في خفض الضغط ودون أعراض جانبية مثل تلك التي ترافق استعمال المخفضات التقليدية مثل Captopril الذي يؤدي الى اضطراب ايض الدهون والسعال وغيرها من الأعراض والتأثيرات الجانبية .

جدول 32 : الببتيدات المخفضة لضغط الدم المنتجة من كازينات الحليب

المصدر البروتيني ورقم التوالي	توالي الحوامض الامينية
β : 169-175	Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln
β : 140-143	Leu-Gln-Ser-Trp
β : 1-6	Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu
α s2: 198 - 202	Thr-Lys-Val-Ile-Pro
α s2 : 189 -192	Ala-Met-Lys-Pro-Trp
α s1:104 – 109	Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu
α s2 :190- 197	Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro
β : 191 - 197	Leu-Leu-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val
α s1 : 143 - 147	Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro
α s2 :189-197	Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro -Lys

وبصورة عامة تتصف الببتيدات المثبطة للـ ACE بأنها بببتيدات قصيرة تحوي على البرولين في الطرف الكربوكسيلي ، والبعض منها تحوي على حوامض امينية حلقية عند الطرف الكربوكسيلي ، اذ ان كل من التربتوفان والتايروسين والفنيل - الالنين و Imino acid proline تكون ذات الفة عالية للارتباط بالموقع الفعال للانزيم ACE ، وأفضل الببتيدات هي المشتقة من الكازينات ويشكل الجزء الكاره للماء أكثر من 60 % منها .

الببتيدات المخدرة :

ببتيدات توجد في بروتينات الحليب وكذلك في منتجاته المتخمرة والجبن ، يمكن ان ترتبط بالمستلمات الخاصة بارتباط المواد المخدرة على سطوح الأعصاب مثل μ , δ , κ وكذلك ترتبط الى مكونات Endocrine والجهاز المناعي والامعاء . والببتيدات يمكن ان تطلق من بروتينات الحليب مثل الكازين بواسطة التحلل البروتيني الذي يتم بواسطة البروتيازات البكتيرية مثل بوادي بكتريا

حامض اللاكتيك وكذلك البكتريا المحللة للبروتينات مثل *Ps. aeruginosa* *B. cereus* كما يمكن تصنيعها من ربط الحوامض الامينية بتسلسل معين .

ويطلق على البيبتيدات المخدرة Opioid agonists وأهمها المشتقة من الكازين - بتا وتسمى المورفينات الكازينية β -casomorphins والاخرى مورفينات الكازين - الفا α - casomorphins وتوجد بيبتيدات اخرى منها α - lactorphins , β - lactorphins . وبالمقابل توجد بعض البيبتيدات التي تعاكس تأثيرها Opioid antagonist peptides والجدول (33) يوضح بعض هذه البيبتيدات .

جدول 33 : البيبتيدات المخدرة البيبتيدات المضادة للتخدير

القطعة المسؤولة	المصدر البروتيني	اسم البيبتيد
f 90-95 f 90-96 f 91-96	Bovine α s1-CN	α s1-Casein exorphins
f 158 -164	Human α s1-CN	Casoxin D
f 51-54 f 51-55	Human β -CN	β -Casomorphin (4,5)
f 25-34 f 35-41 f 57-60	Bovine and human κ -CN	Casoxin A, B, & C
f 50-53	Bovine and human α -LA	α -Lactorphin
f 102-105	Bovine β -LG	β -Lactorphin
f 318-323 F 536-540 f 673-679	Lactotransferrin	Lactoferroxins A B C
f 399-404	BSA	Serophin

Bovine serum albumin = BSA

تتصف البيبتيدات المخدرة بتركيبها الخاص الذي يسمح لها بالتداخل مع المستلمات خاصة النوع μ على سطوح الخلايا ، ويوجد التايروسين في النهاية الامينية تليها ثمانية برولين ثم حامض اميني حلقي اخر وعادة يكون التايروسين او الفنيل- النين في الموقع الثالث او الرابع . وإزالة ثمانية التايروسين تؤدي الى إفقاد البيبتيد فعاليته ، اما وجود البرولين فيعد مهما للمحافظة على الترتيب الملائم للحوامض الامينية الحلقية . وتتأزر فعالية البيبتيدات فيما بينها وكذلك مع المواد غير البيبتيدية مثل الدهون والدهون السكرية والسكريات قليلة التعدد . ولذلك يفضل استعمالها بشكل خليط كما في

المنتجات المتخمرة التي تكون بروتيناتها محللة بشكل كبير . اما الجرعة الزائدة منها فيمكن ان تكون مضرّة بالجسم .

فعاليات البيبتيدات المخدرة : للبيبتيدات تأثيرات متعددة ، فهي يمكن ان تستعمل كمادة مخدرة ويتضح ذلك من استعمال العقار Naloxone الذي هو مضاد قوي لمستلزمات المخدر على سطوح الخلايا ويوقف عملها ، للبيبتيدات فعالية مسكنة للألام Analgesic activity وكذلك تحفز استجابة الغدد الصم Endocrine response .

ونظرا لاحتواء الأغشية المعوية Brush border membrane في الامعاء على مستلزمات للمورفينات الكازينية – بتا فان ذلك يؤدي بشكل مباشر في التأثير على نقل الالكتروليتات . ونقل الاخيرة يعمل تحت تنظيم خلايا مختلفة تشمل Enteroendocrine وكذلك تحت تأثير الجهاز العصبي المناعي . وعليه يمكن استعمالها في علاج الإسهال كبديل للإرواء الفموي الذي يعد الاختيار الأول ، ولكن استعمال البيبتيدات يكون اقل كلفة ويكون مفيدا للأطفال الذين يتعرضون لسوء التغذية في البلدان الفقيرة .

ان تأثير البيبتيدات المضاد للإسهال يكون نتيجة فعاليتها المضادة للإفراز في الطبقة المخاطية للامعاء وكذلك تثبيطها لحركة الأمعاء الدودية (Peristalsis) وبذا تزيد من بقاء المواد الغذائية المهضومة في القناة . والمورفينات ونتيجة تركيبها الخاص وصفاتها الفيزيوكيماوية فانها تستطيع التداخل مع مواقع سيطرة مختلفة في الأمعاء مؤدية الى تغيير نقل السوائل و الالكتروليتات وهذا لا يكون بالضرورة من خلال ارتباطها الى مستلزمات المخدرات .

ويمكن هندسة الاحياء العلاجية لزيادة انتاج البيبتيدات لاغناء الغذاء ولكن يجب الأخذ بنظر الاعتبار وجود البيبتيدات المخدرة والاخرى المعاكسة لها (المذكورة أعلاه) لان التوازن يكون مهما من الناحية الفلسجية .

عمليات التصنيع

تحتاج الاحياء العلاجية الى تحضيرها بشكل خاص للحفاظ على عيوشيتها الى حين الاستهلاك ، ولذلك كان من شروط اختيار السلالات ان تكون متحملة للعمليات التصنيعية . وتعد الاحياء العلاجية بأشكال وتركيبات لا تشبه الأغذية ، إضافة الى ان البوادي تحتاج الى طرق إعداد خاصة لاستعمالها في تحضير الأغذية العلاجية ، ومن أهم الطرق المستعملة :

التجفيد

وتستعمل الطريقة لتسهيل عمليات تداول الاحياء اضافة الى الحفاظ عليها لمدة طويلة ، والأشكال المجفدة يمكن ان تستعمل كمدعمات للأغذية او استهلاكها على شكل أقراص او كبسولات . وتعد طريقة التجفيد Lyophilization من الطرق الملائمة لبعض الحالات ، وفيها يتم تجفيف الماء من

النماذج بعد تحويلها الى شكل صلب بالتجميد ، ويزال الماء عن طريق التسامي ونزع الماء المرتبط بالجزئيات وتكون العملية على عدة مراحل :

- المرحلة الاولى وهي التجميد وفيها يتحول الماء المتحرك الى ماء غير متحرك .
 - التجفيف الاول ويتم تزويد النماذج بالحرارة لغرض تسامي الماء المتجمد تحت التفريغ .
 - التجفيف الثانوي وفيه تزداد الحرارة تحت التفريغ لسحب الماء المرتبط مثل ماء التبلور الى ان ينخفض المحتوى المائي الى الحد الذي يحافظ فقط على ثباتية النماذج .
- وخلايا العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة المحضرة بالتجفيد تفقد فعاليتها بعد عدة أسابيع من الخزن بحرارة الغرفة . وفقدان الخلايا لحيويتها يعود الى التغيرات بالحرارة والطور المائي والتجفيف والتي تؤدي بمجموعها الى تدمير الأغشية الخلوية والبروتينات ، ولذلك تستعمل المواد الحامية من البرودة Cryoprotectants مثل الكليسول او السستئين او السكروز او أي مادة ملائمة اخرى .

وعملية التجفيد بالإضافة الى ما ذكر من مساوئها تكون مكلفة وتأخذ وقت طويل وتحتاج الى عناية خاصة نوعا ما أثناء النقل والتخزين والتسويق .

التجفيف بالرذاذ Spray drying

وتعني نقل المواد من الحالة السائلة الى حبيبات جافة بعملية تكوين الرذاذ في جو ساخن وهي من أهم الطرق المستعملة في صناعات الألبان لأنها تسهل انتاج كميات كبيرة من المواد . وكلفتها قليلة نوعا ما اذ تبلغ سدس كلفة التجفيد ، والطريقة يمكن توسيعها والاجهزة الخاص بها متوفرة .

وقد استعملت الطريقة لتجفيف أنواع محددة من العصيات اللبنية ليصل تعداد الخلايا بعد التجفيف الى 10^{10} - 10^9 وحدة تكوين المستعمرات / غم . ولكن الطريقة تواجه عددا من المشاكل فليس كل السلالات تستطيع تحمل عمليات الإعداد ، كما ان إعادة الترطيب يشكل إحدى المشاكل المهمة ، اضافة الى ضعف ثبات المنتجات عند الخزن .

وموت الخلايا عند استعمال الطريقة يعود الى ارتفاع درجة الحرارة وإجهاد التجفيف خاصة عند سحب الماء المرتبط على سطوح الخلايا ولذلك تصبح الخلايا حساسة لتأثير إنزيم اللايسوزايم وكلوريد الصوديوم وهذا دليل على تأثر كل من الجدران والاعشية الخلوية . ويتأثر كل من DNA والرايبوزومات نتيجة لفقدان ايون المغنيسيوم الذي يتسرب من الاغشية المدمرة بالحرارة ولذلك تم تحويل الطريقة بعدد من الوسائل للحفاظ على الخلايا ومنها :

- استعمال عصائر الفواكه والخضر والسكريات في تحضير نماذج الخلايا .
- استعمال الدكسترين .

• تعديل الرقم الهيدروجيني للنماذج قبل التجفيف .

وكذلك استعملت مواد أخرى ولكنها لم تؤد الى نتائج مشجعة جدا ، ولكن تطبيع الخلايا يمكن ان يساعد كثيرا في تحسين المنتجات . فتتمية الخلايا تحت درجات حرارية عالية نوعا ما ، أي استعمال صدمة حرارية غير مميتة ، لان العديد من السلالات يمكن ان تتحمل درجات حرارية تصل الى 60° م ويساعدها في ذلك تخليق بروتينات الصدمة الحرارية وأدى ذلك الى زيادة عدد الخلايا الحية الى حوالي 18 مرة . ويمكن تطبيع الخلايا لظروف أخرى غير ملائمة أي بإجراء معاملات أولية قبل التجفيف مثل تعريضها لأرقام هيدروجينية واطئة وتنafذية معينة وكذلك تعريض الخلايا لبيروكسيد الهيدروجين والأخذ بنظر الاعتبار ان تعرض الخلايا لإجهاد ما يمكن ان يساعد في جعل الخلايا مقاومة لاجهادات أخرى ضمن شبكة فعاليات الخلايا (يراجع الفصل السادس) ، فمثلا تطبيع الخلايا *Lb. paracasei* لضغوط تنafذية عالية (0.3 مول كلوريد الصوديوم) لمدة 30 دقيقة يؤدي الى زيادة تحملها للحرارة وبالتالي امكانية تجفيفها بالرداذ حيث يزداد عدد الخلايا الحية بعد التجفيف بالرداذ بمعدل 16 مرة عما هو الحال في الخلايا التي لم تتطبع لتراكيز عالية .

ويمكن استعمال التغليف Encapsulation التي تشكل إحدى وسائل حماية الخلايا ، فخلط الخلايا مع حبيبات الجينات الكالسيوم يزيد من تحمل الحرارة . وقد استعملت بنجاح في تجفيف البكتريا المنشطرة ، ويمكن استعمال مواد مختلفة لإحاطة الخلايا مثل Gum acacia ، او الجيلاتين او النشا الذائب . وفي كافة الأحوال تكون كفاءة الطريقة معتمدة على السلالة المستعملة .

أهم الأغذية العلاجية المتخمرة : يوضح الجدول (34) بعض الأغذية المنتجة لأغراض علاجية

جدول 34 : بعض الاغذية المستعملة لحمل الاحياء العلاجية

البكتريا	السلالة	المنتج
<i>Lb. acidophilus</i>	2409	لبن
<i>Lb. acidophilus</i>	2401	لبن
<i>Lb. acidophilus</i>	LA1	لبن
<i>Lb. casei</i>	GG	لبن
<i>Bif. bifidum</i>	BB1	لبن
<i>Bif. lactis</i>	B94	لبن
<i>Bif. longum</i>	B6 , ATCC15708	لبن
<i>Bif. infantis</i>	1912	لبن
<i>Lb. acidophilus</i>	Ki	انواع من الجبن *
<i>Lb. acidophilus</i>	A1 , A2	انواع من الجبن
<i>Lb. acidophilus</i>	La-5	انواع من الجبن
<i>Lb. acidophilus</i>	La-5	انواع من الجبن
<i>Lb. casei</i>	C1 ,C2	انواع من الجبن

انواع من الجبن	I	<i>Lb. helveticus</i>
انواع من الجبن	NFBC 338	<i>Lb. paracasei</i>
انواع من الجبن	M3	<i>Lb. paracasei</i>
انواع من الجبن	ATCC 15696	<i>Bif. bifidum</i>
انواع من الجبن	bo	<i>Bif. bifidum</i>
انواع من الجبن	B3 , B4	<i>Bif. bifidum</i>
انواع من الجبن	Bb02	<i>Bif. bifidum</i>
انواع من الجبن	Bb12	<i>Bif. bifidum</i>
انواع من الجبن	Bb12	<i>Bif. lactis</i>
انواع من الجبن	B1 , B2	<i>Bif. longum</i>
مثلجات لبنية	La-5	<i>Lb. acidophilus</i>
مثلجات لبنية	ATCC 53103	<i>Lb. rhamnosus</i> GG
مثلجات لبنية	10LF	<i>Bif. bifidum</i>
مثلجات لبنية	Bb12	<i>Bif. bifidum</i>
خلطة الشوفان	299V	<i>Lb. plantarum</i>

* يعتمد نوع الجبن على الحليب المستعمل والطريقة ولها تسميات مختلفة وفق مناطق الانتاج .

واضافة الى ما مذكور في الجدول هناك بعض المنتجات تنتج بملايين الأطنان وتستعمل بشكل

كبير ومنها

اللبن Yoghurt

منتج مخمر ينتج من الحليب بالاعتماد على علاقة تعايشية بين سلالات بادئه ، والبادئ التقليدي المستعمل *St. thermophilus* , *Lb. bulgaricus* . وفي العلاقة التعايشية تقوم العصيات بتحليل بروتينات الحليب لان لها قابلية اكبر على هذه الفعالية وتحرير الحوامض الامينية والبيبتيدات الصغيرة وفي هذه الحالة يتحلل حوالي 1 – 2 % من بروتينات الحليب ويكون المستوى كافيا لنمو البكتريا . فيحفز هذا نمو المكورات وتبدأ بإنتاج حامض الفورميك Formic acid الذي يحفز بدوره نمو العصيات ، وهذا التعاون يؤدي الى تقصير وقت التخمر الى 3 – 4 ساعات عند حرارة مرتفعة نوعا ما 43° م ويكون الناتج مختلفا عن استعمال كل بكتريا على حدة .

والجنسان البكتيرية تحوي انزيمات تحلل البيبتيدات الكبيرة الى بيبتيدات صغيرة لتدخل الخلايا ، واهم بروتينات الحليب المتحللة هو الكازين وتحلل ايضا كمية قليلة من بروتينات الشرش ، وبالنتيجة يكون اللبن الناتج حاويا على مستويات عالية من البيبتيدات والحوامض الامينية مثل الفالين والهستيدين والسيرين والبرولين ، وبالرغم من ان عملية تحليل البروتين تكون جزئية الا ان القيمة الغذائية للمنتج تكون أعلى من الحليب الذي صنع منه ويكون أسهل هضما .

اما السكريات وأهمها اللاكتوز فيتخمر منه 20-30 % ، والبوادئ أعلاه هي متجانسة التخمر لذا تنتج حامض اللاكتيك بشكل رئيس والذي يصل تركيزه الى 0.7 – 1.2 % . والحامض الناتج يكون

خليطا من النظيرين (+) L , (-) D وتعتمد نسب النظائر على السلالات المستعملة وفي العموم يكون تركيز النظير اليساري (+) L بحدود 50 – 75 % من حامض اللاكتيك الكلي . وحامض اللاكتيك من الحوامض العضوية التي تساعد في حركة الأمعاء الدودية لكل أجزاء القناة الهضمية ما عدا المعدة والمستقيم ، اما حامض الخليك الذي يمكن ان ينتج بكميات قليلة فيساعد في حركة الاثنى عشري والقولون ان قلة اللاكتوز ووجود عدد كبير من الخلايا الحاوية على انزيم β - galactosidase يتيح الفرصة أمام الأشخاص الذين يعانون من حالة عدم تحمل اللاكتوز استعمال اللبن كبديل للحليب ، اذ تقوم الخلايا بحماية الانزيم عند مرورها في وسط المعدة أحامضي مما يوفر فرصة لوصوله الى الامعاء لذا لا يمكن استعمال اللبن المسخن لهؤلاء الأشخاص .

وأثناء التخمر تحصل تغييرات في فيتامينات وأملاح الحليب ولكن ليس بشكل كبير ما عدا بعض فيتامينات المجموعة B ، فتسخين الحليب قبل تخميره او بسترته للتخلص من الاحياء الملوثة وكذلك لتنشيط المواد المضادة للميكروبات الطبيعية في الحليب والتي تعيق وتمنع نمو البادئ ، وهذا التسخين يؤدي الى إتلاف الفيتامينات B6 . B12 وحامض الفوليك في حين تبقى الأخرى الثابتة بالحرارة مثل النياسين و Pantothenic acid دون تغيير . وبعض السلالات تزيد من الفيتامينات مثل زيادة الفولات . و *St. thermophilus* تنتج حامض الفوليك والذي تستهلكه *Lb. bulgaricus* . اما تسخين الحليب بعد اكتمال تخمره فيؤدي الى القضاء على الفيتامينات الحساسة وتقضي على الانزيمات وخلايا البادئ ، ويمكن إجمال فوائد اللبن بالاتي :

- يفيد الأشخاص الذين عندهم حالة عدم تحمل اللاكتوز او اللذين يعانون من مشاكل هضم اللاكتوز .
- يمكن ان يؤدي الى تقليل حدوث وتكرار الإسهال وخاصة الاسهالات التي تعقب استعمال المضادات الحيوية والتي ينتج اغلبها عن بكتريا *Cl. difficile*
- علاج إسهال المسافرين .

ويمكن ان تضاف الى بوائد اللبن احياء اخرى لأهداف متعددة مثل تحسين النسجة او الموصفات الاخرى مثل اضافة *Lactococcus lactis subsp cremoris* او احد اجناس *Leuconostoc* لإعطاء النكهة او لزيادة لزوجة المنتج ، او تضاف الاحياء العلاجية مثل اضافة *Lb. rhamnosus GG* لغرض علاج التهابات والإسهال الفيروسي *Rotavirus enteritis* .

منتج اليوكالت Yakult

منتج يحوي على السلالة *Lb. casei* Shirota ، ينتج على سعة تجارية ويستهلك في مختلف مناطق العالم وخاصة الشرقية منها . والسلالة معزولة من انسان سليم من قبل Dr. Minoru Shirota عام 1930 في اليابان ، والسلالة مقاومة لحموضة المعدة واملاح الصفراء لذلك يمكن ان تصل الى الجزء السفلي من الامعاء ، وقد أنتج Yakult عام 1935 ويستعمل بشكل واسع لمنع العديد من الأمراض .

والسلالة المستعملة متجانسة التخمر ولها العديد من الفوائد التي أثبتت بالتجارب المختبرية على الحيوانات وكذلك على الإنسان ويمكن إدراجها بالاتي :

- التأثير على الجهاز المناعي : تؤثر على إنتاج السايوتوكاينات ، وتقوم بتنشيط عددا من خلايا الجهاز المناعي مثل العدلات والخلايا الابتلاعية الكبيرة والخلايا القاتلة الطبيعية وتزداد أعدادها وتقلل من الخلايا التائية الممخدة Suppressor T – cells .
- وتؤثر على امراض المناعة الذاتية ، ففي الفئران تمنع حدوث السكري المعتمد على الأنسولين عند إعطائها بنسبة 0.05 % من الوزن ، اذ تساعد على سلامة خلايا β المفرزة للانسولين في جزر لانكرهانس في البنكرياس والتي تدمر بالأجسام المضادة الذاتية .

كما انها تحسن من حالة الفئران التي توضع في حالة مشابه لوجود Systemic lupus erythematosus وكذلك في الفئران التي حث فيها (CIA Type II collagen induced) arthritis وهو التهاب المفاصل المستحث وعند إعطاء الفئران البكتريا *Lb. casei* Shirota قللت من حدوث الالتهابات وقللت من الاجسام المضادة للكولاجين الخاصة C II – specific IgG2a و C II – specific IgG2b ، وهذا يعني ان للسلالة القابلية في التأثير على أمراض المناعة الذاتية من خلال تحويل الاستجابة الخلوية والخلطية .

ونظرا لتأثيراتها على المناعة لذا يتوقع ان تكون مؤثرة على حدوث السرطانات والدراسات التي أجريت باستعمالها حدث بشكل كبير عودة سرطانات المثانة بعد إزالتها .

- وجد انها تحمي من الإصابة بعدد من الممرضات مثل *Ps. Listeria monocytogenes* , *Ps. aeruginosa* , *E. coli* , *Sal. typhimurium* , *Mb. fortunum* , بكتريا التعفن ، وكذلك الإصابات بالفيروسات مثل فيروس الهربس Herpes simplex و Cytomegalovirus .

- تساعد السلالة في الحد من تفاعلات الحساسية اذ تمنع إنتاج IgE ، ومن دراسة شبكة الانترلوكينات وسيطرتها وجد ان البكتريا تحفز Th1 وتنشط Th2 وبذا تعمل على الموازنة ومنع انتاج IgE .

- تؤثر في خفض ضغط الدم عند إعطائها عن طريق الفم ووجد أنها تنتج مركب ذائب في الماء أطلق عليه العامل LEX مكون من 20 % سكريات و 45 % بروتينات و 10 % حوامض أمينية و 10 % رماد ويستعمل في العلاجات الطويلة الأمد بنسبة 1 ملغم / كغم من وزن الجسم وفي الحالات السريعة يستعمل بنسبة 10 ملغم / كغم وزن الجسم .

الاجبان العلاجية :

تعد عملية تخميض الحليب المعد لصناعة الجبن ضرورية لذلك تضاف البودائ لإنتاج الحموضة بسرعة ، وفي الاجبان العادية تستعمل الاحياء المحبة لحرارة متوسطة مثل *Leuconostoc spp* ، *Lactobacillus spp* ، *Streptococcus spp* ، *Lc. lactis subspp cremoris* ، *Lc. lactis spp lactis* . اما الاجبان التي تسمط بحرارة عالية فتستعمل لها احياء محبة للحرارة مثل *Lb. delbrueckii subspp bulgaricus* ، *Lb. helveticus* ، *St. thermophilus* . وفي حالة الاجبان الحاوية على الثقوب والعيون مثل الجبن السويسري فتضاف البكتريا المولدة للغازات مثل *Lc. lactis subspp diacetylactis* ، *Ent. faecium* ، *Propionibacterium shermanii* ، *Leuconostoc mesenteroides* وهذه الاضافات تؤدي الى انتاج انواع كثيرة من الجبن .

وميزة صناعة الجبن ان الحليب يعرض الى معاملة حرارة معتدلة لذلك يبقى الحليب حاويا على أعداد من الاحياء المجهرية والبكتريا بعد المعاملة الحرارية . ومن الاحياء المتبقية بعض من بكتريا حامض اللاكتيك وهي من غير البودائ (NSLAB) Nonstarter LAB ويأتي بعضها كملوثات بعد البسترة وتكون متباينة فالبعض محبة للحرارة واخرى محبة للبرودة ، وقد تكون متباينة او متجانسة التخمر . وتحتوي الاجبان على فلورا ثانوية مثل الخمائر والفطريات وبعضها يضاف عمدا لإنتاج أنواع معينة من الجبن مثل اضافة *Penicillium camemberti* ، *Pen. roqueforti* ، *Brevibacterium linens* ، *Corynebacterium spp* ، *Arthrobacter spp* وغيرها حسب المنتج .

ولإنتاج الجبن العلاجي يجب ان تحور طريقة التصنيع لغرض إيصال الاحياء العلاجية الى المستهلك بأعداد كبيرة ، وقد تضاف مع البادئ او بعد التخمر او أي مرحلة من مراحل التصنيع حيث تكون ملائمة وتضاف عادة بنسبة 0.1 % من البادئ المستعمل .

ويعد الجبن الطري الأفضل لحمل الاحياء العلاجية وذلك لانه لا ينضج وبذا لا تتأثر الاحياء العلاجية بالبكتريا الاخرى ، كما انه يحفظ بدرجات حرارية واطئة تحافظ على الخلايا ، اضافة الى ان مدة صلاحيته قصيرة ويستهلك بسرعة . وقد تم البدء بتسويق انواع من الجبن العلاجي في دول اوربا في نهاية تسعينيات القرن الماضي .

أفضلية منتج الجبن

يعد الجبن هو المنتج الأفضل لحمل الاحياء العلاجية وذلك لان الخلايا تكون داخل شبكة من البروتينات والدهون المكونة للجبن ، وحموضته قليلة وبذلك لا تتعرض الخلايا الى إجهاد الحموضة ، اضافة الى ان بروتينات الجبن لها سعة دائرية عالية لذلك تحافظ على الحموضة وتحمي الخلايا وتساعد على البقاء حية عند مرورها في المناطق المختلفة من القناة الهضمية المتغيرة الحموضة الى ان تصل الى الجزء الأسفل من الامعاء لتمارس فعاليتها . ونظرا لطبيعة منتج الجبن وتركيز البروتينات فيه فان الاحياء ستكون مركزة بنسبة 4 – 5 مرات بقدر تركيزها في المنتجات اللبنية المتخمرة وان كان هذا لا ينطبق بشكل كبير على الجبن الطري ، وعليه فان الكميات الموصى بتناولها تكون قليلة . ويكون الجبن ملائما في الأقطار التي لم تتعود تناول اللبن وكذلك يفيد الاشخاص اللذين يعانون من عدم تحمل اللاكتوز وللذين يتحسسون من اللبن . كما ان عمليات نقل وتداول الاجبان تكون أسهل من تداول المنتجات الاخرى والسائلة على وجه الخصوص . والجدول التالي يوضح بعض انواع الجبن وفوائدها (جدول 35) .

الاغذية الشرقية المتخمرة :

هناك أعداد كبيرة جدا من الأغذية المتخمرة التي تشارك فيها بكتريا حامض اللاكتيك وبكتريا اخرى وكذلك الفطريات ، وتعتمد على المواد الأولية المتوفرة في البلد ولها طرقها الخاصة في التصنيع ، والعديد من الدراسات تشير الى فوائدها الصحية بداية من التأثير على الجهاز المناعي والسرطان اضافة الى جوانب كثيرة اخرى . ولا مجال لذكرها ولكن هناك بعض المنتجات تكون ذات أهمية خاصة مثل المنتج Miso الذي ينتج في اليابان من فول الصويا وبعض الحبوب ويستعمل كحساء وقد زاد استيراده الى دول أوربا بعد حادثة المفاعل النووي في تشرنوبيل عام 1986 للاعتقاد ان تناوله يحمي من الإشعاع اعتمادا على الملاحظة القديمة عند إلقاء القنابل النووية على هيروشيما ونكازاكي في نهاية الحرب العالمية الثانية وهي ان عمال مصانع الميزو كانوا اقل الناس تأثرا بالإشعاع والسبب غير معروف ولكن التجارب التي أجريت على الفئران أشارت الى قابلية المنتج في تخليص الحيوانات من الاشعاع . وهناك مقولة لدى الدول التي تصنعه هي " الميزو شوربة او حساء المدخنين " اذ يستعمل لفتح غليونات التدخين المغلقة ، ونظرا لاحتوائه على مجموعة من الفيتامينات منها مجموعة B وكذلك المركبات المهمة في فول الصويا فهو يحمي حنجرة المدخن وذلك بمعادلته للمواد الضارة في التبغ .

جدول 35 : الاحياء العلاجية المستعملة في بعض انواع الجبن والفوائد المسجلة لها

السلالة	نوع الجبن	الخلايا حية (خلية \ غرام) مدة البقاء	الفوائد المسجلة
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	جبن الایدام		معالجة الاسهال الفيروسي معالجة اسهال المسافرين معالجة الاسهال المرافق للمضادات الحيوية معالجة امراض الحساسية الوقاية من اصابات الجهاز التنفسي والهضمي تقليل الانزيمات المحرصة على السرطان
<i>Lb. acidophilus</i> LA5 + <i>Bif. animalis</i> BB12	الجبن الطري		معالجة الاسهال المرافق لاستعمال المضادات الحيوية معالجة الاسهال الفيروسي تحويل المناعة معالجة السرطان تخفيض الكولسترول
<i>Bif. animalis</i> BB12	جبن الشدر	⁸ 10- ⁷ 10 2 - 6 اشهر	معالجة الاسهال المرافق لاستعمال المضادات الحيوية
<i>Bif. animalis</i> BB536	جبن الشدر	⁵ 10 6 اشهر	معالجة الاسهال المرافق لاستعمال المضادات الحيوية
<i>Lb. paracasei</i> NFBC 338	جبن الشدر	⁸ 10 6 اشهر	تحمل املاح الصفراء
<i>Ent. faecium</i> pB88	جبن الشدر	⁸ 10 15 شهر	تحمل املاح الصفراء تقليل من اعراض Irritable bowel syndrom
<i>Bif. lactis</i> Bo + <i>Lb. acidophilus</i> Ki	جبن الشدر	⁸ 10 - ⁶ 10 9 اسابيع	تحمل املاح الصفراء تحسين بيئة الامعاء السيطرة على الكولسترول تأثير القاتل لبكتريا <i>Cl. difficile</i> , <i>Sal.</i> <i>typhimurium</i>
<i>Bif. longum</i> <i>Bif. Bifidus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i>	جبن ارجنطيني	اقل من ¹ 10 اقل من شهر	
<i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i> \ <i>acidpropinici</i>	جبن منضج		مقاومة املاح الصفراء

مستقبل الاغذية العلاجية

ازداد الاهتمام بالأغذية العلاجية وفوائدها وأصبحت هناك شركات تقوم بإنتاجها على مختلف أشكالها وتقيم البحوث والدراسات للحصول على سلالات كفوة جدا او إيجاد طرق وأساليب تحسن بها الغذاء . ولذلك رصدت الأموال واغلب التوجهات تحاول استثمار المعلومات الجزيئية والفسلجية للاحياء المجهرية وخاصة البكتريا لمحاولة هندستها .

وبما ان الاحياء العلاجية ستقيم في الامعاء لغرض اداء فعاليتها وهذا يعني انها لن تقيم بشكل عالق انما يجب ان تلتصق ببطانة الامعاء . لذلك انصبت الدراسات على فهم كيفية التواصل بين الخلايا (يراجع الفصل الخامس) ، فالخلايا المجهرية بالاضافة الى تواصلها مع بعضها فهي تحتاج الى التواصل مع خلايا الامعاء ، ويبدو ان هناك أكثر من وسيلة لتواصل الاحياء العلاجية مع الامعاء والخطوة الاولى منها هي الالتصاق ، ثم البقاء معها لمحاولة تغيير فعاليتها الايضية. وهذه النقطة مهمة جدا وذلك لان الاحياء العلاجية لا تستطيع الإحلال محل البكتريا المقيمة لذلك يتم إعطائها بكميات كبيرة على مدد متواصلة . ومن فهم الآليات يمكن هندسة احياء حسب الطلب والأفضل انتقاء السلالات الطبيعية التي تظهر الصفات المطلوبة .

والاهتمام الأكبر في إنتاج الأغذية العلاجية لا يزال ينصب على الألبان المتخمرة بالدرجة الاولى ولكن هناك عددا من البكتريا خاصة البكتريا المنشطرة لا تستطيع النمو في الحليب لذلك تضاف بأعداد كبيرة للتعويض عن عملية النمو او يمكن استعمال مواد بديلة . ولا زالت اهتمامات الاغذية العلاجية تنصب على العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة وقليل من الاغذية تشذ عن هذه القاعدة وبعض المنتجات موضحة في الجدول (36) .

جدول 36 : بعض منتجات الحليب الحاوية على البكتريا العلاجية *Lb. acidophilus*

السلالة المستعملة	المنتج
<i>Lb. acidophilus</i>	حليب اسيدوفيلي
<i>Lb. acidophilus</i>	Acidophilus paste
<i>Lb. acidophilus</i> مع بادئ محب للحرارة متوسطة	حليب الخض الحامضي
<i>Lb. acidophilus</i> مع بادئ محب للحرارة متوسطة	حليب الخض الحامضي الصحي
<i>Lb. acidophilus</i> + <i>St. thermophilus</i> spp + <i>Lb. delbrueckii</i> spp + <i>Lb. bulgaricus</i>	اللبن الاسيدوفيلي
<i>Lb. acidophilus</i> + <i>St. thermophilus</i>	Biogurt
<i>Lb. acidophilus</i> + خمائر مخمرة لسكر اللاكتوز	حليب اسيدوفيلي حاوي على الخمائر

<i>Lactococcus + Lb. acidophilus lactis</i>	Acidophilin
<i>Lb. acidophilus</i> La 1	LC 1
<i>Lb. acidophilus, Bifidobacterium, Lb. casei</i>	ABS ferment
<i>Lb. acidophilus, Bif. bifidum</i>	LA-7 plus
<i>Lb. acidophilus</i> LA-H3, <i>Bif. bifidum</i> LB-H1, <i>Lb. casei</i> LC-H2	Vita

وهناك اهتمامات بأحياء أخرى مثل خميرة *S. boulardii* التي تسوق بتشكيلات صيدلانية متعددة لمكافحة الإسهال خاصة الذي يعقب استعمال المضادات الحيوية لقابليتها على انتاج بروتين يفلق سم *Cl.difficile* (الوحدة A) المسببة للإسهال . والخميرة متعددة الفوائد لانها تتداخل مع شبكة الجهاز المناعي .

ويزداد الاهتمام بالفطريات على الاقل في عالم الحيوان مثل استعمال *Aspergillus oryzae* لما له من تأثير ايجابي كبير في أداء حيوانات الحقل .

وبعض الجهات تجيز استعمال البكتريا *Ent. faecium* للحالات الضرورية وعندما لا يكون هناك بديل ، اذ تمنع منظمة الصحة العالمية استعمالها لما تسببه من إصابات في المستشفيات ولمقاومتها عدد من المضادات الحيوية المستعملة في العلاج (كما نر ذكره) .

وتهتم الشركات بإنتاج اغذية لذوي الاحتياجات الخاصة اللذين يقعون ضمن احد المجاميع الاتية :
• النباتيون
ويحتاج هؤلاء الى منتجات فيها B12 لانه يقل في غذائهم لذلك فالاغذية المصممة لهم تحوي على بكتريا حامض البروبيونيك المنتجة للفيتامين .

• اغذية الرضع
المعروف ان المواليد يلحقون بالبكتريا الموجودة في مهبل الأم عند الولادة مثل *E. coli* والمكورات المعوية وهذه تهيأ الظروف لنمو البكتريا المنشطرة بعد مدة قصيرة من الولادة فيما اذا كانت الرضاعة طبيعية ، في حين ان الرضاعة الصناعية تسمح لبكتريا اخرى باستعمار الامعاء منها المكورات المسبحية و *Peptococci* , *Bacteriodes* لذلك تحضر لهم خلطات غذائية تحوي على أعداد كبيرة من البكتريا المنشطرة تعطى في الايام الأولى بعد الولادة لتنتج مجتمعات تشبه تلك الموجودة عند الرضاعة الطبيعية وعند استيطانها يكون من الصعوبة إزالتها ، أي ان الايام الاولى تكون فرصة لتثبيت البكتريا المنشطرة بشكل خاص ومنها *Bif. infantis* , *Bif. breve* .

• اغذية لكبار السن

تمثل الشيخوخة احد الأسباب في تغير فلورا الامعاء ، اذ تتغير من الطفولة المبكرة والمذكورة انواعها أعلاه لتصبح البكتريا عند البالغين *Bif. longum* , *Bif. adolescentis* وتصبح في حالة الشيخوخة مكونة بشكل رئيس من *Bif. adolescentis* . والتغيرات تنشأ من ضعف الجهاز المناعي ونوعية الاغذية واستعمال الأدوية والمضادات الحيوية ، اضافة الى التغيرات الفسلجية للجسم ، لذلك تصنع لهم اغذية حاوية على العصيات اللبنية والبكتريا المنشطرة اضافة الى استعمال مساعدات العلاج الحيوي Prebiotic وهي كاربوهيدرات غير قابلة للهضم من قبل الانسان تساعد في التصاق البكتريا الى الطبقة المخاطية للأمعاء كما انها تسمح بتكاثر الاحياء العلاجية لتصبح هي السائدة أي استعمال حالة العلاج الحيوي المشترك Synbiotics والذي يعني استعمال الاحياء العلاجية مع مساعدات العلاج المستعمل لكبار السن .

• اغذية رواد الفضاء

تعاني هذه الفئة من مشاكل في التغذية وتحتاج الى حلول خاصة وفق المخططات لزيادة الرحلات الفضائية . وتحدث المشاكل نتيجة لانعدام الوزن وطريقة نوعية الغذاء اضافة الى الإجهاد الذي يتعرضون له ، والمشاكل التي يعانون منها اضطراب في القناة الهضمية بشكل رئيس ، اذ تحدث الاسهالات حتى وان اتخذت الإجراءات الصارمة لمنع الإصابة بواسطة الأغذية ، والاسهالات وان كانت بطيئة فهي تشكل حالة مزعجة لمن هو في وضعهم ، اضافة الى حدوث حالة الإمساك والذي يكون ناتجا عن عدم انتظام تناول الماء لعدة أسباب منها نقصان الجاذبية التي يمكن ان تصل الصفر . والمشاكل الاخرى فقدان الكالسيوم والتدمير الحاصل بالإشعاع الذي يتعرضون إليه وكذلك تغير الاستجابة المناعية لديهم ، وتتفاقم المشاكل عندما تطول الرحلات وتزداد مدة العيش بعيدا عن الأرض .

ولذلك فان الاغذية العلاجية يمكن ان تمنع الاسهالات وتساعد في حركة الامعاء التي تقلل من حالات الإمساك .

اما مشكلة ابيض الكالسيوم الذي يتغير أثناء الرحلات الفضائية فيفقد من العظام ويزداد في المصل وتحصل موازنة سالبة تؤثر على العظام . ويعود قبط الكالسيوم الى العظام ويرجع مستواه الطبيعي في المصل عند العودة الى الأرض ، لذلك فالأغذية العلاجية وخاصة الألبان التي يكثر فيها الكالسيوم يمكن ان تعوض الفقد ، كما ان الاحياء العلاجية تقوم بتخفيض الرقم الهيدروجيني في الامعاء مما يساعد في زيادة امتصاص الكالسيوم .

وتعد مسألة الإشعاع من المشاكل المهمة اذ يتعرض الرواد الى الإشعاع بعد الخروج من مجال الارض ويؤدي الى السرطانات وإعتماد عدسات العيون والتي تستمر حتى بعد العودة الى الارض ،

وعندما تكون الاشعاعات قوية مثل التعرض الى 10000 راد فيؤدي هذا الى الموت نتيجة الضرر الحاصل للجهاز العصبي . ولكن عندما تكون الجرعة اقل من 1000 راد فانها تؤدي إلى تغيير مجاميع البكتيريا في الامعاء وتؤدي الى الموت على مدى أسابيع . ووجد بالتجارب ان الفئران التي أعطيت بكتريا *Lactobacillus GG* قبل تعريضها لجرعة 1400 راد لم تحصل تغييرات كبيرة في فلورا أمعائها وطالت مدة بقائها ، لذلك يكون إعطاء الحليب المتخمّر ربما وسيلة لمنع السرطانات والأورام الناتجة من التعرض للاشعاع أثناء الرحلات الطويلة .

ويعاني الفضائيون من مشاكل في المناعة ولتلافي هذه المشكلة يتم اختيار شباب أصحاء وتسجل استجاباتهم المناعية بعد التعرض الى تجارب قبل بدء الرحلات . والرحلات الفضائية تحبط الاستجابة المناعية الخلوية ، ولذلك فان اعطائهم الاغذية العلاجية يمكن ان ينشط من وظائف الخلايا مثل الخلايا الالتهابية الكبيرة ويزيد من فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية والخلايا التائية ويمكن ان تشكل الاغذية العلاجية وسيلة حماية من الأمراض .

Oxalobacter

من الاحياء العلاجية الاخرى خارج نطاق بكتريا حامض اللاكتيك وهي بكتريا *Oxalobacter* وهي بكتريا لاهوائية لها القابلية على استهلاك الاوكزالات مصدرا وحيدا للكربون ، ومن جهة ثانية يعاني العديد من الاشخاص من تكون حصى الكلى المكونة من اوكزالات الكالسيوم لذلك يمكن استعمالها لعلاج هذه الحالات . فالأوكزالات لا يمكن تجنبها فهي تكثر في الخضر والفواكه والمشروبات كالشاي والقهوة وغيرها ، كما انها تتكون في الجسم من هدم الحوامض الامينية ، وتفرغ الاوكزالات في البول ولكن في حالات خاصة تتجمع مكونة الحصى الكلوية .

تنتشر بكتريا *Oxalobacter* في الإنسان وعدد من الحيوانات وتكثر أعدادها في الحيوانات عند إطعامها أغذية غنية بالأوكزالات وتصل أعدادها الى 10^8 / غم من الوزن الجاف لمحتويات الاعور (Cecal) وتوجد سلالات متخصصة بالنسبة للحياء التي تستعمرها والنوع *Ox. formigenes* توجد في أمعاء الإنسان تستهلك الاوكزالات وتساعد في منع *Hyperoxaluria* .

وتوجد احياء اخرى تستهلك الاوكزالات مثل *Ent. faecalis* و *Eubacterium lentum* ولكن هذه تستهلك انواعا اخرى من المواد كمصادر كاربون لذا تعد اقل أهمية من بكتريا

Oxalobacter .

والمشكلة مع البكتريا *Ox. formigenes* انها تفقد من الانسان لانها حساسة جدا للمضادات الحيوية وغيرها من الادوية ، بعض سلالاتها يمكن التعامل معها لانها متحملة للهواء مثل السلالة HC 1 ومقاومة للحموضة وتحتاج الى عدد قليل للوصول الى القولون واستعمارها ويصعب دراسة تأثيرها

لانه ينذر وجود غذاء بدون اوكزالات ، ولكن عند استعمالها في اشخاص متبرعين اعطت نتائج جيدة ، ولذلك فان البكتريا تعد من الاحياء العلاجية التي يمكن ان تساعد في التخلص من حالة مرضية .

السرطانات

تعد من المشاكل والتحديات التي تحتاج الى تضافر جهود العاملين في الطب والتقنية الحيوية والهندسة الوراثية وحقول أخرى لمواجهة الخطر الداهم بعد ان حصل التلوث بالعديد من المواد المسرطنة ، لذلك تتضافر الجهود في شتى المجالات لمحاربة المرض الذي يعد مرضا بيئيا بالدرجة الأولى وأصبح يحتل رأس قائمة الأمراض التي تحصد الملايين ، وبداية لابد من اخذ فكرة مبسطة عن الحالات المرضية وبقدر تعلق الموضوع بالاحياء المجهرية .

جينات السرطان الخلوية Cellular oncogenes

Oncogenes جينات السرطان التي تكون على أنواع كما يتضح من اختلاف أنواع السرطان . وتوجد في الخلايا بشكل طبيعي او اولي او ما تسمى بالجينات الحميدة Proto-oncogenes وتتحول الى جينات خبيثة نظرا للطفرات او الاضطرابات التي تؤدي الى اضطراب دورة الخلية وعبور حواجز نقاط السيطرة (يراجع الفصل الثاني) ويمكن استهدافها بالأدوية والتشخيص الذي يعتمد على ما تولده من واسمات الورم Tumor markers للاستدلال على الخلايا المتحولة للتعامل معها .

وجينات الورم الطبيعية تنتج مكونات خاصة تعمل في مسارات معقدة مسؤولة عن تنظيم تكاثر الخلايا وانقسامها وتمايزها وأي تشويش او اضطراب في التعبير عن هذه المكونات يؤدي الى النمو غير المسيطر عليه وتوليد السرطان . والآليات الجزيئية المسؤولة عن تحفيز الجينات الحميدة او الأولية وتحولها الى جينات ورمية تختلف ولكن اغلبها يشير الى حدوث خلل وراثي ، فيصبح التعبير عن الجينات مستمرا أي يعبر عنه في الوقت غير المناسب أثناء دورة الخلية او في الأنسجة غير الملائمة . تؤدي الطفرات ايضا الى اضطراب التداخل المنظم بشكل دقيق بين بروتينات الجينات الحميدة مع بروتينات اخرى او مع الحوامض النووية .

وتسبب الفيروسات (فيروسات الورم) أنواعا من السرطانات خاصة مجموعة الفيروسات القهقرية او الارتدادية ، فعند وجود ممهد الفيروس أمام جينات السرطان الخلوية الحميدة فانه قد يزيد من التعبير عنها .

ومن جهة ثانية تحوي الخلايا على جينات كابحة للأورام Tumor suppressor genes التي لها علاقة بتطور الأورام اذ تنظم عمليات نمو الورم بشكل سلبي . واكتشفت بتكوينها معقدات بروتينية مع الحوامض النووية لبعض الفيروسات . وعند تعطيل هذه الجينات او فقدان وظيفتها الطبيعية يكون

هذا حادثا لتكوين الأورام . والنسخة الطبيعية لهذه الجينات هو جين *Rb gene* (Retinoblastoma) ينتج البروتين Rb الذي يمنع دخول الخلايا الى طور التخليق S phase وذلك بالارتباط الى عوامل الانتساخ الرئيسية التي تنظم انتساخ والتعبير عن الجينات المسؤولة عن طور التخليق (S phase) . وتنظيم فعالية البروتين Rb بواسطة الفسفرة وفقدان الجين لوظيفته يؤدي الى تطور ورم خبيث في العين Retinoblastoma يصيب الأطفال وهو نادر الحدوث ويمكن ان يؤدي الى أورام خبيثة في البالغين . ومن الجينات الكابحة هو الجين الذي ينتج البروتين الكابح P_{53} الذي يؤدي الى غلق تطور دورة الخلية . ويعمل P_{53} كعامل انتساخ ينظم تخليق البروتين الخاص بتنشيط بعض كاييزات دورة الخلية . ويساعد في استماتة الخلايا عند حصول ضرر للـ DNA ، ولذلك فان جين P_{53} يكون غير طبيعيا وحاويا على الطفرات في اكثر من نصف حالات السرطان في الإنسان .

فيروسات السرطان

تسبب الفيروسات عددا من السرطانات في الانسان وتصل نسبتها الى 15 % من الحالات وتنتشر في أنحاء العالم منها سرطان عنق الرحم Cervical cancer وسرطان الكبد وأهمها المدرجة في الجدول (37) .

جدول 37 : الفيروسات المسببة لسرطانات الإنسان

السرطان	الفيروس	العائلة الفيروسية
سرطانات الاجهزة التناسلية والبلعوم	Human papilloma virus	Papillomaviridae
اورام الخلايا اللمفاوية و Nasopharyngeal carcinoma , African Burkitts lymphoma	EB virus	Herpesviridae
سرطان الكبد	Hepatitis B virus	Hepadnaviridae
ابيضاض الدم في البالغين ، الاورام الخبيثة المرافقة لللايدز	HTL virus HIV	Retroviridae
سرطان الكبد	Hepatitis C virus	Flaviviridae

وتسبب الفيروسات السرطانات في الحيوانات بعد الإصابة الطبيعية او بعد الحقن التجريبي اذ ان معلومات قليلة مثل جين واحد او عدد قليل من الجينات يمكن ان يؤثر على تصرف الخلايا في النمو وبالتالي تحول الخلايا الطبيعية الى خلايا ورمية Neoplastic ويكون ذلك نتيجة اضطراب أنظمة السيطرة وتحول الخلايا الطبيعية الى خلايا محولة Transformed cells . ودراسة فيروسات الورم من نوع RNA أظهرت مشاركة جينات السرطان الخلوية في تكوين الأورام . اما فيروسات DNA

فأشارت دراستها الى دور الجينات الكابحة او المحبطة للورم الخلوية . وكل هذه الدراسات تستهدف الكشف عن البيولوجية الجزيئية للسرطان والشبكة الجزيئية لعملية التسرطن .

الصفات العامة للتسرطن الفيروسي

هناك عدة مظاهر لهذه العملية :

- الفيروسات يمكن ان تولد السرطانات في الانسان والحيوان .
 - فيروسات الورم من النوع الذي يولد اصابة مزمنة وتبقى في المضيف الطبيعي لها .
 - تؤثر العوامل الخاصة بالمضيف بشكل مهم في عملية توليد السرطانات المسببة عن الفيروسات .
 - نادرا ما تكون الفيروسات مؤدية للسرطان لوحدها .
 - وجود طور كمنون Latent طويل بين الإصابة الفيروسية الأولى وظهور الورم .
 - تختلف السلالات الفيروسية في قابليتها على توليد الاورام .
 - الفيروسات المولدة للأورام تحور عمليات او مسارات السيطرة على نمو الخلايا .
 - يمكن ان تعمل الفيروسات كعوامل مسرطنة بشكل مباشر او غير مباشر .
 - تظهر الواسمات الفيروسية على سطوح الخلايا الورمية .
 - الفيروس الواحد يمكن ان يولد أكثر من نوع من الأورام .
- ويتبين من المظاهر أعلاه ان فيروسات الأورام تمثل أكثر من نوع ويمكن ان تقسم الى مجاميع اعتمادا على :

- الحوامض النووية المكونة لجينوماتها .
- الصفات الفيزيوكيماوية لجزيئاتها .

والفيروسات التي جينوماتها مكونة من DNA تولد DNA provirus بعد الإصابة . والذي يبدأ بالتفسير للبروتينات الورمية الفيروسية Viral oncogenic proteins التي تكون ضرورية لعملية تضاعف الفيروس ولكنها تؤثر على مسارات السيطرة على نمو الخلية المضيفة .

اما الأنواع الأخرى والمكونة جينوماتها من RNA والتي تعود بشكل رئيس الى مجموعة الفيروسات القهقرية او الارتدادية Reteroviruses تكون حاملة لإنزيم النسخ العكسي Reverse transcriptase الذي يتخذ من RNA قالباً لتخليق DNA وإنتاج ما يسمى Provirus لأنه يندمج مع DNA الخلية المصابة ومن هذه النسخة يتم ترجمة وإنتاج بروتينات الفيروس . وتقسم الفيروسات الى نوعين اعتمادا على حثها للورم :

● الفيروسات المسرطنة القوية والتي تعمل تحول مباشر للخلايا وهي التي تحمل جينات سرطان ذات أصل خلوي .

● الفيروسات المسرطنة الضعيفة وتعمل تحول بطيء جدا للخلايا وهي لا تحمل جينات السرطان ولكنها تقوم بحث أنواع منه مثل Leukemias بعد مدة طويلة من الحضان باليات غير مباشرة

خطوات عملية التسرطن

عملية التسرطن عملية متعددة الخطوات تحتاج الى حدوث تغييرات وراثية لتنفيذها وتحويل الخلايا الطبيعية الى خبيثة . وأعطيت العملية عدة تسميات منها Immortalization و Preneoplastic و Hyperplasia وغيرها من التسميات . والمثبت ان الورم يتطور على مدى مدة طويلة . وهذا ما يثبت ان العملية متعددة الخطوات وقد تشمل الانتخاب المتكرر للخلايا النادرة التي لها صفات تساعد في التفوق على غيرها . وقد وجد ان العملية يمكن ان تتم بحدوث 3 - 5 طفرات او أكثر . وتكون العملية مرافقة لعمليات تنشيط لجينات الورم الخلوية وتعطيل لجينات كبح الورم الخلوية لغرض تطور الورم سواء كانت الفيروسات مشاركة ام لا .

ويمكن ان تعمل فيروسات الورم كعوامل مساعدة Cofactors تساهم في بعض الخطوات اللازمة لتوليد الخلايا الخبيثة ، ولذلك كانت الفيروسات (في حالة الأورام الفيروسية) ضرورية ولكن ليست كافية لتطوير الورم ذات الأصل الفيروسي او الناتجة عن الفيروسات ، اذ ان الأخيرة غالبا ما تعمل كنقاط بدء Initiators لعملية التورم والتي يمكن ان تحدث بعدة آليات .

تداخلات الفيروسات مع المضايغ

- هناك العديد من أنواع التداخلات التي تحصل بين الفيروسات والخلايا المضيفة منها :
 - الاصابات المزمنة ووجود الفيروسات لمدة طويلة في المضيف يمكن ان يعطي فرصة اكبر لحصول احداث نادرة تسمح للخلايا بالبقاء حية ولكن في الاخير تؤثر على آلية السيطرة على نمو الخلايا .
 - الفيروسات داخل المضيف تواجه الجهاز المناعي لذلك فالمقيمة منها يجب ان تتجنبه وقد طورت الفيروسات العديد من الآليات للتواري عن الجهاز المناعي منها :
 - التعبير عن الجينات الفيروسية ولكن بشكل محدود جدا وتكون الخلايا الحاوية عليها لا يمكن تمييزها من قبل دفاعات المضيف .

● جعل مواقع الإصابة من غير الممكن الوصول إليها من قبل مكونات الجهاز المناعي .

● إحداث طفرات في المستضدات الفيروسية بحيث لا يمكن تمييزها من قبل الأجسام

المضادة والخلايا التائية (كما في فيروس الايدز HIV المتقلب) .

• تحويل جزيئات MHC I على سطوح الخلايا المصابة .

• تثبيط عمليات معالجة المستضدات .

• إصابة وإحباط الخلايا المناعية كما في فيروس HIV .

ومهمة الجهاز المناعي القيام بمراقبة مناعية في الجسم على الخلايا الورمية النادرة والقضاء عليها في الأشخاص الطبيعيين ، ولكن في الأشخاص محبطين المناعة Immunosuppressed فان الخلايا السرطانية تتكاثر وتقلت من سيطرة الجهاز المناعي . ولذلك فالاختلاف في الاستجابات المناعية للأشخاص يمكن ان تساهم في مدى حساسية الإصابة بالفيروسات المولدة للمرض او الورم في المضاييف الطبيعية .

آليات التسرطن بالفيروسات

هناك آليات عامة يتم فيها حث السرطانات وتحول الخلايا الذي يمكن ان يعرف على انه تغيرات ثابتة تستورث في الخلايا الناتجة ويمكن ان تتم بكميات قليلة من المعلومات الوراثية كما ذكر انفا . فالفيروسات تدخل جينات جديدة الى الخلايا تؤدي الى تحول الخلايا وهذه آليات مباشرة . او تؤدي الى تغيير التعبير عن الجينات الخلوية ويكون التأثير غير مباشرا وفي الحالتين تفقد الخلايا السيطرة على التنظيم الطبيعي لنموها وانقسامها . فالفيروسات لا تتصرف كمسرطن كامل وإنما التغيرات الناتجة تكون ضرورية للتعطيل وعدم تمكين المسارات التنظيمية ونقاط السيطرة من العمل في السيطرة وبذا تصبح الخلايا محولة ، وعليه لا يوجد نموذج مفرد للتحول والتسرطن الفيروسي وتكون الآليات مختلفة على المستوى الجزيئي .

حساسية الخلايا للإصابة الفيروسية

تكون خلايا المضيف اما متاحة او غير متاحة لتضاعف الفيروسات فيها . فالمتاحة تدعم تضاعف الفيروسات ونموها وإنتاج أفراد جديدة ، اما غير المتاحة فهي التي لا تسمح بذلك . وفيروسات DNA في الخلايا المتاحة لا تحول الخلايا الا اذا توقفت دورة الفيروس المميتة للخلايا ، اما الخلايا غير المتاحة فيمكنها التحول ، وفيروسات RNA تكون غير مميتة للخلايا التي تتضاعف فيها .

والخلايا ممكن ان تكون متاحة لفيروس وغير متاحة لفيروس اخر وعليه فان ليست كل الخلايا او كل انواع المضاييف تكون قابلة للإصابة وتضاعف الفيروسات فيها او قابلة للتحول بالفيروسات او الاثنين معا . فأكثر فيروسات الورم تظهر تخصصا للأنسجة التي تصيبها وذلك يدل على وجود اختلاف في المستلمات . وتكون قابلية الفيروس لتوليد اصابة منتشرة او موضعية معتمدة على التعبير

عن الجينات الفيروسية ، فبعض الفيروسات متخصصة بتوليد ورم معين واخرى يمكن ان تولد اورام مختلفة الانواع وهذا يمكن ان يعكس انتحاء الأنسجة Tissue tropism للفيروسات .

بقاء الحوامض النووية لفيروسات الورم في الخلايا المضيفة

ان التغيرات الثابتة تؤدي الى تغيير الخلايا الطبيعية الى خلايا ورمية وتحتاج عادة الى اكتساب بعض الجينات الفيروسية من قبل الخلايا . وفي بعض الاحيان يتم هذا باندماج بعض الجينات الفيروسية المعنية في جينوم الخلية المضيفة وخاصة من جينومات الفيروسات المكونة من DNA ، وبعض الاحيان تبقى قطع او نسخ Episomal copies من جينوم الفيروس في الخلية المضيفة ، اما فيروسات RNA فان Proviral DNA الذي يمثل نسخة من RNA الفيروسي تندمج مع DNA الخلية المضيفة ، او تبقى نسخ RNA في خلايا الورم دون اندماج كما في التهاب الكبد الفيروسي نوع C .

وفي بعض الأنظمة الفيروسية فان الخلايا المحولة بالفيروس يمكن ان تطلق بعض عوامل النمو التي تؤثر على النمط المظهري للخلايا المجاورة غير المصابة لتشارك في تكوين الورم . ومن المحتمل ان الخلايا الورمية تجمع الطفرات الوراثية أثناء نمو الورم نتيجة لعدم وجود السيطرة ، وعند ذاك تكون الحاجة الى جينات الفيروس لبدء الورم غير ضرورية وبعض الاحيان تفقد من الخلايا .

العلاجات المقترحة لمعالجة الأورام

توجد علاجات للأورام منها الكيماوية او الفيزيائية والآخرى مثل استعمال الأشعة لقتل الخلايا السرطانية ولكن ما يتمشى مع منهج الكتاب هو العلاجات الحيوية ومنها :

● استعمال Antisense RNA : عند وجود mRNA المقابل في الخلية فانه سيقوم بالازدواج معه ويمنع ترجمته ، لذلك تستعمل هذه الجزيئات في الخلايا لغرض تنظيم بعض العمليات . او تجرى لأغراض خاصة اذ يعد وسيلة فعالة في تحويل نشاط الجينات وهي خطوة مساعدة في مجال الهندسة الوراثية .

ان عملية الازدواج وغلط الشفرات الوراثية يحفز الخلايا للقضاء على هذه المزدوجات غير الطبيعية بواسطة الإنزيم RNase H الذي يتعرف على أشرطة RNA المزدوجة ويحللها ويعتقد انه وسيلة دفاعية في الخلايا ضد الفيروسات ثنائية الأشرطة من RNA .

وقد اقترح استعمال Antisense RNA كوسيلة لعلاج السرطان وذلك لقدرته على تعطيل جين معين دون آخر وبذا يمكن استهداف جينات الورم ، وكذلك يمكن استعماله لتقييد تأثير الإصابات الوراثية ولكن المشكلة في هذه الأدوية هو عدم الثباتية وتعرضها لمهاجمة RNases والتي تكثر في

الأنسجة . ولكن يمكن تحويل Antisense RNA باستعمال Phosphorothioate واستبدال إحدى ذرات الأوكسجين في الفوسفات بذرة الكبريت وبذلك يصبح مقاوما للإنزيمات . كما يمكن استعمال جزيئات صغيرة من Antisense RNA بطول 7 – 15 نيوكلوئيد تكون قادرة على أداء عملها لأن هذه القطعة لا تكون مطوية وبالتالي يمكنها تجنب بعض الإنزيمات .

• ومن العلاجات الأخرى المقترحة استعمال Ribozymes وهي جزيئات تساعد على التفاعلات الكيميائية لتفكيك جزيئات أو أشرطة RNA لذلك يقترح استعمالها ضد الفيروسات التي يكون جينومها من RNA وتستطيع هذه مهاجمة mRNA الناتجة من جينات السرطان لذا يقترح استعمالها لمكافحة السرطان على غرار استعمال Antisense RNA ، ويمكن إدخالها في أجسام دهنية للوصول الى أهدافها ولكن قد تكون له تأثيرات غير متوقعة وهي لا زالت في طور الدراسة .

استعمال الفيروسات المحللة للخلايا السرطانية

فكرة العلاج الفيروسي Virotherapy للتخلص من الأورام ليست بالفكرة الجديدة وإنما استعملت في أربعينات وخمسينات القرن الماضي للقضاء على الأورام في الحيوانات التي كانت تشكل نماذجاً دراسية لتقييم المعالجة بالفيروسات . وجرت أول محاولة على الإنسان عام 1956 لمعالجة حالات متقدمة من سرطان عنق الرحم وكانت النتائج مشجعة جداً ، ولكن تأخر العمل بها نظراً لنقص التقنيات اللازمة لتنقية الفيروسات وعدم إمكانية تحديد سلامة المعاملة بالفيروسات . وعادت المحاولة في بداية تسعينات القرن الماضي ونشرت دراسات حول استعمال فيروس الهريس Herpes simplex لمعالجة أورام في الدماغ ، لذا استجد الأمل باستعمالها كوسيلة فعالة وليست لها تأثيرات جانبية .

والفيروسات المحللة للسرطانات Oncolytic viruses هي فيروسات بشرية تصيب الخلايا الورمية وتتكاثر فيها وتدمرها وتترك الخلايا الطبيعية . ومثل الفيروسات الأخرى فإن فيروسات تحلل السرطان تبحث عن الخلايا التي تعد متاحة لها لتدخلها وتوجهها لتكوين فيروسات جديدة بإعداد كثيرة تؤدي إلى انفجار الخلية المضيفة . وهذه الفيروسات تبحث فقط عن الخلايا السرطانية . والعلاج الفيروسي يتضمن البحث عن مثل هذه الفيروسات ودراسة صفاتها الطبيعية والتغيرات الجزيئية وربما إجراء التعديلات الوراثية عليها للقضاء على السرطانات . وقد بدأت الدراسات في مختلف أنحاء العالم لدراسة السلالات الطبيعية والمهندسة .

والفيروسات الطبيعية موجودة بشكل طبيعي وتصيب أهدافها وتتضاعف في أنواع معينة من الخلايا الورمية ومنها سلالات Newcastle disease viruses وسلالات Reoviruses وغيرها من المجاميع . وهذه تكون مفضلة على الفيروسات المهندسة التي لا تصيب الخلايا بشكل

طبيعي وتتضاعف بمساعدة العديد من الوسائل ، اضافة الى الحاجة الماسة جدا عند هندسة الفيروسات الى تحديد أهدافها بشكل دقيق من الخلايا السرطانية لتضاعف فيها . وتوجد عدة توجهات مختلفة في هندسة الفيروسات تتوحد في هدف واحد هو القضاء على الخلايا السرطانية ومن هذه التوجهات :

- تحويل بروتينات القفيصة الفيروسية التي تمثل الغلاف الخارجي بحيث يستهدف الفيروس الخلايا الورمية ويترك الطبيعية تماما وبعد الدخول يمكن ان يتضاعف ويقضي على الخلية الورمية .
- هندسة الفيروسات بحيث تتضاعف فقط (تضاعف انتخابي) عند غياب الجينات التي تثبط الورم مثل P_{53} وبذلك فعند دخوله الى الخلايا الطبيعية الحاوية على جينات مضادة للورم يتركها ، وهذا سيؤدي الى القضاء على الخلايا السرطانية فقط .

- تحويل الفيروس وخاصة عملية تضاعفه بحيث يتضاعف فقط في الخلايا التي تظهر مستضدات خاصة بخلايا الورم ويتخطى الخلايا الطبيعية ويبدأ بالتضاعف في الخلايا الورمية الحاملة للصفة المميزة .

وهناك بعض الفيروسات التي هندست لتأدية هذه الأغراض منها فيروسات غدية Adenovirus وفيروسات الأنفلونزا وفيروس Herpes simplex – 1 وكذلك فيروسات Vaccinia viruses . ويتوقع ان تستجد آليات ووسائل انتخاب ما دامت الحاجة ماسة .

تدمير الخلايا السرطانية

تستعمل Oncolytic viruses عدة آليات لتدمير وقتل الخلايا السرطانية وتحليلها او دفعها الى طريق الاستماتة او طريق نخر الخلايا .

فعند دخول الفيروس الى الخلية فانه يبدأ بتدمير وسائلها الدفاعية وتكون هذه المدة وقتا إضافيا في صالح الفيروس وبعدها يبدأ بالتضاعف والتكاثر ويستمر الى حد لا تستطيع الخلايا استيعاب أعداد أكثر فتتفجر نتيجة لتحلل أغشيتها ، والافراد الجديدة تنتشر وتصيب خلايا سرطانية جديدة في المناطق المجاورة لإعادة الدورة دون التأثير على الخلايا الطبيعية . وعندما تنتهي الخلايا السرطانية ولا يستطيع الفيروس إيجاد خلايا يتضاعف فيها يقوم الجهاز المناعي بالتعامل معه والتخلص منه .

فوائد العلاج الفيروسي

المعلومات السريرية توضح ان هذه الفيروسات لها مزايا حسنة مقارنة بالعلاجات السريرية الأخرى للسرطان التي هي قيد الاستعمال مثل العلاج الكيماوي والعلاج بالإشعاع ومنها :

- لها معامل علاجي Therapeutic index عالي مقارنة بالعلاجات الأخرى فقد يصل معامل بعض الأحيان الى 1 : 100000 أي ان لكل مئة ألف خلية سرطانية تدمر ، تقتل مقابلها خلية طبيعية واحدة وهي نسبة مشجعة مقارنة بالعلاج الكيماوي الذي له معامل علاجي 1 : 6 أي لكل ست خلايا سرطانية تدمر ، تقتل معها خلية طبيعية واحدة اضافة الى تأثيرات العلاج الكيماوي الجانبية السلبية

- تكون كفاءته عالية ضد الأورام نظرا لتضاعف الفيروسات أي ان الجرعة ستزداد بينما الأدوية يتم إزالتها من الجسم بعد مدة وتحتاج الى جرعة جديدة ، اما الفيروسات الطبيعية او الاخرى المهندسة لتبقى في الجسم الى ان تدمر كل الخلايا السرطانية .
- تظهر الفيروسات تآزرا مع الأدوية المستعملة ، فبعضها يظهر تآزرا مع العلاجات التقليدية مثل العلاج الكيماوي او الإشعاع ولذلك فان عملية العلاج المركب يمكن ان تؤدي الى نتائج أفضل .

الحالة الحالية للعلاج الفيروسي

الدراسات مستمرة في العديد من المراكز البحثية والجامعات لإيجاد الفيروسات الملائمة وأيضا لتقييم هذه الطرق في العلاج . وأكثر الطرق المستعملة في الوقت الحالي هي إيصال الفيروس الى داخل الورم Intratumoral بحيث تكون الفرصة سانحة لإصابة خلايا الورم وبدا الفعاليات العلاجية ، اذ ان هذه الطريقة تسمح للفيروس بالوصول الى الهدف مباشرة بعيدا عن الجهاز المناعي ودفاعات الجسم . وبعض الأحيان تحقق الفيروسات داخل الأوردة (وهي حالات قليلة) لمحاربة الخلايا الورمية التي انتشرت من أماكنها الأصلية أي بعد حصول عملية الانبثاث Metastasis او في حالة سرطانات الخلايا الدموية الدائرة ، ولكن هذه تواجه مشاكل من قبل الجهاز المناعي الذي يعمل على التخلص وطرده الفيروسات وعلى الأخيرة التغلب على مقومات الجهاز المناعي مثل الأجسام المضادة والوصول الى أهدافها ، لذلك الدراسات جادة في محاولة تغيير الاستجابة المناعية او تحويل الفيروسات بحيث لا تميز من قبل الجهاز المناعي وضمان وصولها الى اهدافها خاصة الخلايا الورمية المنتشرة في الجسم او خلايا سرطان الدم التي تكون دائرة في الجسم .

استعمال السموم في العلاج

تقوم السموم الكيماوية والميكروبية بالتأثير على الفعاليات الحيوية للخلايا مؤدية الى تدميرها وقتلها ، ولكن اذا استعملت بتركيزات ملائمة (واظنة مثلا) وفي الوقت المناسب يمكن ان تكون دواء بدلا من سما زعافا وهذا الأساس التي اتخذته الصناعات الصيدلانية شعارا لها الذي يمثل أفعى ملتفة على كأس للشراب . وهذا ينطبق على احد الأمثلة (وهو نزر من فيض) وهو السم الوشيقي الذي يسبب التسمم Botulism .

ينتج السم من البكتريا اللاهوائية المكونة للابواغ *Cl. botulinum* وهو من السموم العصبية القوية . وتوجد 4 مجاميع من البكتريا تصنف اعتمادا على الصفات الفسلجية وتنتج 7 أنواع من السموم وهي :

المجموعة الأولى I وتنتج السموم A , B , E .

المجموعة الثانية II وتنتج السموم B , E , F .

المجموعة الثالثة III وتنتج السموم C , D .
المجموعة الرابعة IV وتنتج السم G .
والسموم متقاربة من ناحية الوزن الجزيئي وتظهر صفات مستضدية مختلفة ولكنها تمتلك منطقة ثابتة من تواليات للحوامض الامينية المتشابهة . والجزئية الفعالة من السم تتكون من سلسلتين ، احدهما خفيفة والاخرى ثقيلة وتمتلك الجزئية ثلاثة أجزاء فعالة وهي :
جزء للارتباط عند النهاية الكاربوكسيلية للسلسلة الثقيلة .
جزء للانتقال في النهاية الامينية للسلسلة الثقيلة .
جزء التفاعل عند النهاية الكاربوكسيلية للسلسلة الخفيفة وهي بمثابة إنزيم بروتين معدني Zn – metalloprotease . ويؤدي السم الى حالة الشلل بثلاث خطوات :
♦ يرتبط السم بشكل غير قابل للرجوع مع منطقة الاشتباك Presynaptic النهائية لمنطقة الاشتباك العصبي مع المنطقة المحركة للعضلات .
♦ يدخل السم الى المحور العصبي Axon بطريقة الاحتساء الخلوي .
♦ يقوم بفلق البروتينات العاملة في نقل الايعازات العصبية (SNARE) مؤديا الى اضطرابها ومنع نقل الايعازات بواسطة Neurotransmitters .
وبروتينات SNARE بروتينات تسهل إرساء حويصلات Neurotransmitters على أغشية الاشتباك الأولي ومنها Synaptobrevin الذي يندمج مع غشاء حويصلات الناقلات العصبية ، وبروتين Syntaxin يندمج مع Post synaptic membrane . والبروتين الآخر SNAP – 25 يكون معقدًا مع Syntaxin وعند وصول المعقد الى المنطقة الأولية من موقع التشابك يرتبط بالبروتين الأول (Synaptobrevin) وعند تجمع البروتينات الثلاثة في معقد واحد فإنها تستقر على نهاية Axon لنقل الايعازات .
تتأثر بروتينات SNARE بسم البكتريا فالأول (Synaptobrevin) ينفلق بالسموم E , G , B , D اما البروتين SNAP – 25 فينفلق بالسموم A , C , E , والأخير Syntaxin فينفلق بالسم C . ان وجود أي من السموم يكون كافيا لمنع وصول الحويصلات وإرسائها وبالتالي تلاشي نقل الإيعاز العصبي عند منطقة الاشتباك Synapse العصبي العضلي وهذا يؤدي الى شلل الليف العضلي المعني . ويحصل الشلل عند حقن السم بعد مرور 24 - 48 ساعة وتعود الوظيفة الطبيعية للليف العضلي بعد حوالي 90 يوما .
ويختلف تثبيط نقل الايعازات العصبية باختلاف السم المستعمل وأكثرها تأثيرا من حيث مدة التأثير هو النوع A ويقاربه في التأثير النوع C ولكن الاخير لم يستعمل في التطبيقات السريرية .
اما تأثير النوع B فيكون معتدلا من ناحية المدة ، وتكون المدة قصيرة بالنسبة لكل من الأنواع F ,

E . وقد تم في البداية تجربتها في الفئران ثم على الإنسان . والجرعة القاتلة النصفية LD_{50} 2500 – 3500 وحدة . وتستعمل السموم لعلاج الحالات المتعلقة باضطراب الحركات مثل اضطراب حركة العضلات الملساء في مواقع مختلفة من الجسم ، وتتسم المعالجات بكونها وقتية ويزول تأثيرها بعد مدة ويمكن ان تحقن السموم في العضلات القريبة من موقع العلة ومنها :

- معالجة الاضطرابات التي تصيب الحنجرة والتغيرات التي تحصل في الكلام مثل التأتنة والارتجاف وخروج الصوت غير المنتظم والتشنجات واضطراب الكلام .
- معالجات القناة الهضمية وأكثرها Achalasia و Anal fissur وقد اصبحت المعالجة بالسم الخيار الاول في معالجة الحالة الاخيرة . ويستعمل العلاج في معالجة السمنة بواسطة التأثير على العضلات المعدية .
- يستعمل السم في تعديل وظائف عضلات العين مثل حول العين . ويعتقد ان مجالات استعمال السم سيشهد توسعا كبيرا لعلاج حالات كثيرة .

بعض تطبيقات الهندسة الوراثية في مجالات الطب

التطبيقات كثيرة وكثيرة جدا ، البعض منها طبق بدون مشاكل والبعض الآخر ينتظر حل المشاكل التي تواجهه . وقد ذكر في بداية الفصل ان أكثر التطورات في الهندسة الوراثية لها علاقة وثيقة بالجوانب الطبية . وقد ساهمت الميكروبات في تطوير العديد من العمليات التي تتم او تستعمل مزارع خلايا الاحياء مثل الانسان والحيوان . وقد أحدثت تقنيات DNA المتأشب ثورة في إنتاج المواد الحيوية مثل الهرمونات والأنترفيرونات واللقاحات الوقائية والبروتينات العلاجية ، واصبح حتى من الممكن تشخيص الأمراض الوراثية قبل الولادة ، وكذلك توصيف جينات السرطان وأدوارها ، وكذلك أمكن باستعمال التقنيات تشخيص الإصابات الكامنة للفيروسات في الأنسجة عند غياب الفعاليات الفيروسية . وقد قدمت تقنية PCR مع ما يعترئها من تلو في بعض الحالات خدمات كبيرة في مجال الدراسات الوراثية الجزيئية .

وفيما يلي ذكر لبعض الجوانب التي تخص الاحياء المجهرية وعلاقتها بالجوانب الطبية :

اللقاحات الفيروسية

تميل التوجهات الحديثة في إنتاج اللقاحات الابتعاد عن إدخال الفيروسات او الحوامض النووية الى الجسم في المنتج النهائي وذلك لان حتى اللقاحات المضعفة يمكن ان تحصل فيها طفرات في الجينوم تؤدي الى زيادة ضراوة الفيروس وتواريه عن الجهاز المناعي . وقد تمت محاولة زيادة كفاءة اللقاح بأساليب متعددة منها :

- استعمال بروتينات (مستضدات) منقاة منتجة من جينات مكلونة في مضافات ملائمة مثل انتاج بعض بروتينات فيروس التهاب الكبد الفيروسي النوع B في الخمائر .
- استعمال تقنيات DNA المتأشب لإدخال الجينات المشفرة للبروتينات المهمة في جينومات فيروسات غير ضارية او مؤذية والتي يمكن ان تعطى كلقاحات .
- جعل اللقاح حاويا على مكونات الفيروس اللازمة لتحفيز إنتاج الأجسام المضادة فقط مثل استعمال بروتينات الققيصة بعد تنقيتها .
- استعمال بيبتيديات مصنعة تشابه المحددات المستضدية الموجودة على البروتين الفيروسي ، وذلك يضمن عدم عودة الضراوة لأنه لا توجد حوامض نووية فيروسية ، ولو ان الاستجابة المناعية للبيبتيديات الصناعية اقل كفاءة من البروتين الكامل الطبيعي الا انها مضمونة من حيث النقاوة .
- تطوير لقاحات مأكولة وذلك بتحويل النباتات لتخليق مستضدات من فيروسات مرضية وتكون الطريق غير مكلفة من ناحية إيصالها .
- إعداد لقاحات للاستعمالات الموضعية لتحفيز إنتاج الأجسام المضادة في موضع التطبيق مثل استعمال Aerosol vaccines لمعالجة الأمراض التنفسية الفيروسية .
- ويمكن تحميل النواقل الفيروسية او مشتقاتها بعض المعلومات المسؤولة عن البيبتيديات المضادة للميكروبات وإدخالها في بكتريا الفلورا الطبيعية للجسم مثل ادخال الجينات المسؤولة عن انتاج Salivary histatin على الفاجميد p1.pBHR-T في البكتريا التي تستوطن الفم لمعالجة داء المبيضات الذي يصيب الطبقة المخاطية في الفم .
- استعمال الفيروسات لنقل قطع من الجينات الى خلايا اللبائن لتصبح مقيمة هناك . فمثلا مرض Galactosemia يمكن ان يصحح بإدخال الجين المسؤول عن تخليق الانزيم Galactosidase في خلايا المريض .
- وهناك محاولات للتلاعب بخلايا مرضى الايدز لجعلها مقاومة للإصابة بفيروس HIV اي منع تضخيم الضرر .
- محاولات تستهدف تصحيح بعض الجينات البشرية ضمن ما يسمى بالعلاج الجيني Gene therapy واستعمال الفيروسات القهقرية القادرة على إدماج جينومها مع جينوم المضيف ، لذلك تحمل بنسخ مصححة من الجينات لإحلالها محل الجينات المعطوبة .
- محاولات للعلاج الجيني الذي يستهدف السرطانات .
- ومن محاولات العلاج الجيني استعمال الفيروسات الناقصة (غير القادرة على التضاعف) لحمل الجينات السليمة لإحلالها محل الجينات المعطوبة وان كانت هذه المحاولات لها الكثير من المحاذير

مثل احتمال انتقال جينات غير مرغوب فيها مع الجينات المطلوبة ، او حدوث تأثيرات جانبية مضرّة نتيجة لموقع اندماج الناقل غير الصحيحة والذي يمكن ان يؤدي الى تغيير عمليات تنظيم التعبير عن الجينات ويمكن ان تنقلب الى أحداث مدمرة .

المجسات الحيوية

تم التحدث عن بعض جوانبها في فصول سابقة . وهي وسائل فعالة جدا في الكشف عن المواد بتركيز قليلة جدا وتشخيصها سواء في البيئة او المنتجات الصناعية . وتستعمل المجسات في مجال التشخيص الطبي Biomedical diagnosis . ويتم تصميمها من مواد حساسة والاستفادة من حساسية المواد وتخصصها مثل تهجين جزئية DNA مع جزئية مماثلة او مع RNA وربطتها مع وسائل بصرية حساسة جدا تعتمد على أشعة الليزر لتسجيلها وجزء مظهر للإشارة . وتختلف المجسات الحيوية من ناحية المواد الحيوية المستعملة ومنها :

- المجسات المعتمدة على الأجسام المضادة (FISs) Antibody – fluoroimmunosensors وتستعمل فيها الأجسام المضادة وحيدة النسيلة او الخليطة Polyclonal antibodies ويمكن الكشف بها عن المواد المسرطنة ، وتستعمل داخل وخارج الأنظمة الحية . ومن ميزات الكشف عن المواد التي هي بتركيز قليلة جدا في أرضية معقدة من المواد الأخرى . وتوجد مجسات تحوي على الأجسام المضادة الخاصة ببروتين P₅₃ للكشف عن حالات السرطانات . وطريقة القياس سريعة لا تتعدى دقائق ويمكن ان تستعمل لعدد كبير من المواد شرط توفر أجسام مضادة لها .

- الرقائق الحيوية Biochips : تحضر باستعمال مجسات او مسابر من DNA او رقائق DNA biochips . ويعتمد عملها على عملية التهجين الذي يشمل ارتباط شريط DNA من النموذج مع الشريط المفرد الموجود في المجس . ويتم تحضيرها باستعمال DNA فعال حيويًا يقيد على ناقل ضوئي يقوم بنقل الإشارات . تستعمل في تحديد الحوامض النووية وتشخيص الامراض الوراثية كما في تحديد الاصابات الفيروسية الكامنة في الأنسجة .

- مجسات تشخيص السرطان وتعتمد على اشعة الليزر داخل الانظمة الحية دون الحاجة الى خزع حيوية Biopsies وقد أمكن بواسطتها التمييز بين الأورام الحميدة او الطبيعية والأخرى الخبيثة .

- Nanosensors تتحسس المواد بمستوى النانوغرام ولها تطبيقات كثيرة وتستعمل لتحسس المواد داخل الخلية المفردة ، اذ ان إدخالها لا يؤثر على الأغشية الخلوية ولا على وظائف الخلية الطبيعية ، ويمكن ان تستعمل لتقصي مادة حيوية محددة ، وتساعد في فهم الكثير عن علم الحياة الخلوي .

وهذا النوع من المجسات صمم لجسر الهوة بين القياسات التي تتم خارج الانظمة الحية والقياسات داخل الخلايا ، والتعرف على التداخلات الحاصلة بين الجزيئات ونظرا لإمكانية عملها داخل الخلايا فهي يمكن ان تزود بمعلومات نوعية وكمية وشبه كمية .

و Nanotechnology يساعد في تسجيل تراكيز المواد الواطئة جدا وتسجيل وظائف الجزيئات التي تحصل في الخلية عند القيام بأي من الفعاليات مثل تداخل البروتينات مع الحوامض النووية او تداخل البروتينات مع بعضها كما في تسجيل أحداث الاستماتة . ولذلك تجد هذه الوسائل او المجسات أوسع المجالات في الطب والدراسات الجزيئية .

إنتاج مثبط تخثر الدم Hirudin

من مثبطات تخثر الدم القوية جدا فله صفات Anticoagulant , Antithrombic ينتج في العلق الطبي *Hirudo medicinalis* واستعمل العلق منذ بداية القرن الثامن عشر للأغراض الطبية ولكن تذبذب كمياته لا تجعله منتجا طبيا على النطاق التسويقي .

ولذلك اهتمت التقنية الحيوية بعد تطور عمليات الفصل والتنقية بإنتاجه ، كما ان المخثر استعمل نموذجا لتصميم مضادات التخثر بعد دراسة تركيبه بالطرق الجزيئية ومعرفة وظيفته التي بواسطتها عرفت آلية عملية التجلط . ادخل الجين المسؤول عنه في البكتريا والخمائر وحقيقيات النواة الاخرى لإنتاج rHirudins ليستعمل كدواء ضد التخثر ومعالجة أمراض التجلط في الأوردة والشرابين بدلا من العلاج التقليدي Heparin . وقد أجاز استعمال مانع التخثر المنتج بالهندسة الوراثية وسوق مع مركب اخر مشابه له مهندس وراثيا بعد حصوله على موافقات منظمة FDA ويستعمل الان في علاج حالات سريرية تجريبية أملأ في توسيع أسواقه .

وتستمر التقنية الحيوية بتوفير المزيد من الإمكانيات للجوانب الطبية ، ولعل أبرزها المحاولات الجارية في مجال الصناعات الصيدلانية الحيوية المدمجة Fusion biopharmaceuticals وهي محاولة إنتاج أدوية او بروتينات هجينة مكونة من بروتينين او اكثر لأداء مهمة معينة كما في إنتاج البروتين المدمج CD4 – IgG لاستعماله لمنع الإصابة بمرض الايدز وذلك بمنع ارتباط الفيروس الى CD4 على الخلايا التائية ، وكذلك دمج الساييتوكاين IL-13 و GM-CSF لتكوين المركب GM-CSF-IL-13 لتحفيز خلايا نخاع العظام لإنتاج خلايا الدم البيض . وغيرها من الامكانيات التي يصعب حصرها .

التقنية الحيوية الميكروبية والزراعة

الصفحة	الموضوع
490	استعمال البكتريا الزراعية <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
501	السيطرة الحيوية
502	المبيدات الكيماوية
502	المبيدات الحيوية والسيطرة الحيوية
505	الدواحر النباتية
508	المبيدات البكتيرية
510	بكتريا <i>Bacillus thuringiensis</i>
521	مقاومة الحشرات
526	المبيدات الفيروسية
529	المبيدات الفطرية
534	فطر <i>Trichoderma</i>
538	واقع المبيدات الحيوية
539	انتاج الجبريلينات

التقنية الحيوية الميكروبية والزراعة

تتبادل التقنية الحيوية الميكروبية والزراعة الأدوار كلها تقريبا ذات طابع ايجابي . فالزراعة تنتج العديد من المواد التي تستعمل في التخمرات الميكروبية لإنتاج العديد من المواد وتكون الأغذية في مقدمتها ، اضافة الى إنتاج المواد الدوائية مثل المضادات الحيوية والأدوية لحيوانات الحقل وإنتاج المبيدات ، وعمليات التحول الحيوي Biotransformation للمواد لإنتاج المواد الفعالة حيويًا أو الأدوية بواسطة مزارع الخلايا النباتية وغيرها من الإمكانيات .

ومن الجانب الثاني تقدم التقنية الحيوية وبسلاحها الفعال وهو الهندسة الوراثية الكثير للجوانب الزراعية منها هندسة النباتات لإنتاج محاصيل حبوب متكاملة القيمة الغذائية ، كما تحاول نقل جينات تثبيت النتروجين الى النبات نفسه وبذلك تحصل استقلالية للنباتات عن البكتريا المثبتة للنتروجين اضافة الى محاولة نقل هذه الفعاليات للنباتات التي لا تتعايش مع البكتريا المثبتة للنتروجين مثل نقل الجينات الى العائلة النجيلية التي تضم محاصيل الحبوب ، ودراسة إمكانيات أو بالأحرى إنتاج الأجسام المضادة النباتية Phytoantibodies وبذلك تكون سهلة الاستعمال والحصول على المناعة المنفعلة Passive immunity .

وتقدم التقنية الحيوية المبيدات الحيوية Biopesticides بتفرعاتها المختلفة لحماية النباتات من الإصابة ومعالجة المصاب منها والتي تكون على درجة عالية من الأهمية نظرا لتخصصها مثل مبيدات الحشرات ومبيدات الأدغال وغيرها من الآفات . وتسعى الجهود الى نقل الجينات المسؤولة عن إنتاج المبيدات الى النباتات نفسها لجعلها تقوم بمقاومة الآفات لوحدها والاستغناء عن عمليات الرش والمكافحة . وفي هذا المجال تخدم التقنية كل من الجوانب الزراعية والبيئية والتقليل من المقاومة التي تتطور باستمرار في الآفات الزراعية .

والحقيقة توجد مجالات واسعة جدا يمكن للحقلين ان يتداخلا وسيتم التطرق الى بعض جوانب هذه العلاقات .

استعمال البكتريا الزراعية *Agrobacterium tumefaciens*

تستعمل البكتريا لغرض هندسة النباتات وراثيا ، وذلك لصعوبة إجراء التغييرات على النباتات الكاملة لأنها تأخذ وقت طويل الى ان يحين ظهور تأثير التضريب والتهجين ، كما انه ليس من السهولة التعامل مع الخلايا النباتية ومزارعها . وهذه البكتريا يمكن ان تساعد في التغيير الوراثي لأنها تستطيع ان تنقل جزء من جينومها الى جينوم الخلايا النباتية وتعد هذه عملية طبيعية لتجاوز الحواجز بين الاحياء وتعد من اهم مظاهر الهندسة الوراثية وهي التي شجعت فيما بعد إجراء عمليات نقل الجينات بين الأحياء البعيدة .

والبكتريا تعد وسيلة فاعلة لنقل الجينات الى النباتات ويقسم جنس *Agrobacterium* الى عدة انواع اعتمادا على الاعراض التي تظهرها على النباتات المصابة وكذلك المضايغ التي تصيبها ومنها :

- *Ag. tumefaciens* تولد الورم التاجي Crown gall لعدد من النباتات .
- *Ag. rhizogenes* تسبب مرض الجذور الشعرية Hairy root disease لعدد من النباتات .
- *Ag. radiobacter* بكتريا لا تسبب الأمراض .
- *Ag. rubi* تسبب الورم في قصب السكر .
- *Ag. vitis* تسبب الورم في الأعناب .

والورم يحدث نتيجة وجود البلازميد الحاث للورم (Tumor induced plasmid) Ti (plasmid) ، واستبدال البلازميد يمكن ان يغير الاعراض ، كما ان إخراجها يجعل البكتريا غير ممرضة للنبات ، وإدخال البلازميد Ri المسئول عن مرض الجذور الشعرية الى الخلايا يؤدي الى توليد الورم ولكن بمظهر مختلف . وبهذا الوضع يصبح تصنيف الجنس الى انواع غير مجددا وذلك لان الأسس الموضوعية للتصنيف تعتمد على البلازميد ، وعليه اعتمدت مواصفات أخرى للتصنيف مثل صفات النمو والمسارات الايضية لتقسم الجنس الى biovar :

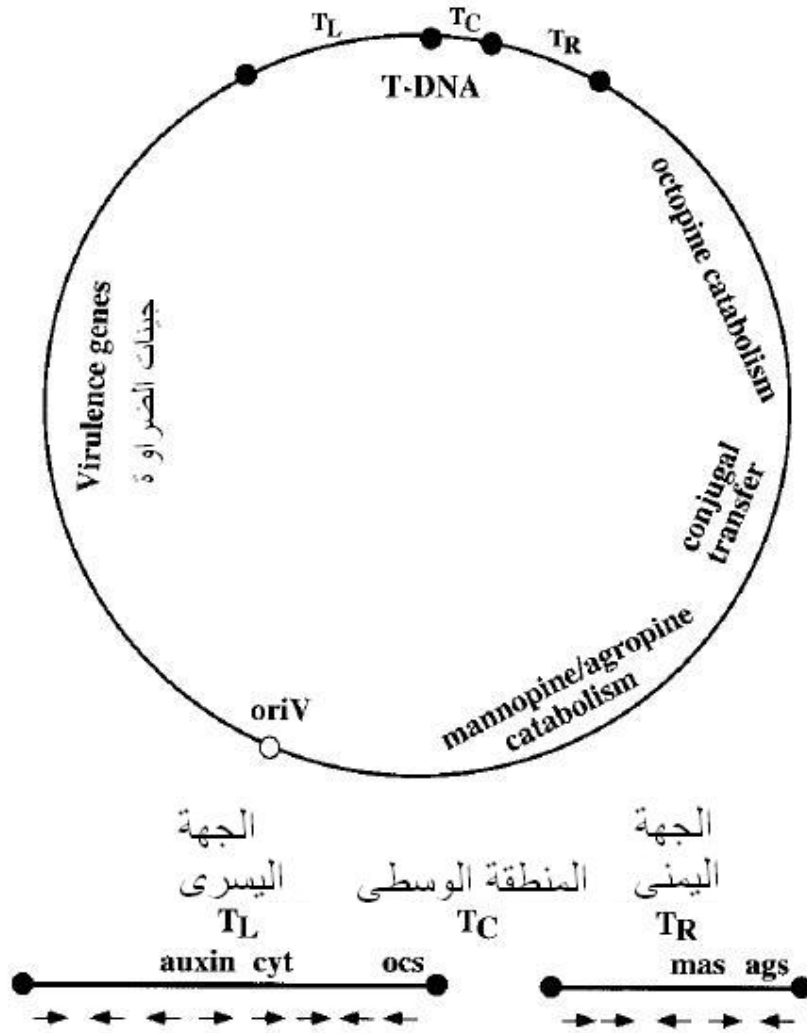
- biovar I يضم معظم سلالات *Ag. tumefaciens* و *Ag. rubi* .
- biovar II يضم بكتريا *Ag. rhizogenes* .
- biovar III يضم البكتريا *Ag. vitis* .

ونظرا لأهمية *Ag. tumefaciens* كوسيلة لهندسة النباتات وتحويلها ففي اقل من 20 سنة أصبح بالإمكان تحويل النباتات لمختلف الصفات بواسطة *Agrobacterium* . ولذا تمت دراستها بشكل مفصل وتم تحديد جينوم السلالة C58 *A. tumefaciens* وتحديد تواليات الجينوم . ويتكون جينوم البكتريا من كروموسوم حلقي وآخر مفتوح وبلازميد Ti وبلازميد آخر كبير . وربما تساعد هذه المعلومات في إعادة تصنيف الجنس مرة ثانية الى أنواع وسلالات .

وتستطيع البكتريا ان تنقل قطع DNA الى مدى واسع من الاحياء مثل النباتات وحيدة الفلقة وثنائية الفلقات ومغطاة البذور Angiosperms وعارية البذور Gymnosperms والفطريات والخمائر الكيسية والبازيدية (Basidiomycetes) وسجلت لها القابلية على نقل DNA الى خلايا الإنسان المزروعة .

تعود ضراوة البكتريا لوجود البلازميد الحاث للورم Ti وهو بلازميد يصل حجمه الى 200 – 800 كيلو قاعدة ، ويحمل قطعة T – DNA (Transfer DNA) وتوجد مثلها على Ri plasmid

والقطعة هي التي تنتقل الى الخلايا النباتية مؤدية الى تحولها الى خلايا ورمية . والشكل (65) يوضح تركيب البلازميد والقطعة T-DNA .



شكل 65 : تركيب بلازميد الورم Ti - plasmid في البكتريا الزراعية

تدخل البكتريا الى النبات من خلال الجروح التي تصيبها وتقوم النباتات المجروحة بإفراز مواد فينولية كوسيلة للحماية والمواد الفينولية مثل Acetosyringone ومواد اخرى مشابهة تعمل كمواد جاذبة للبكتريا .

وقبل الدخول في التفاصيل الجزيئية لابد من معرفة تأثير البكتريا على النبات وكيفية استغلالها لنقل الجينات ، فالبكتريا أصلا ضيقة المضاييف ولكن بالتلاعب بتركيبه البلازميد يمكن ان تزداد مضاييفها وسعا ، واختلاف المضاييف يعني عدم وجود مشكلة في انتقال القطعة T-DNA . والبكتريا عند إصابتها لبعض النباتات تسبب نخر Necrosis للأنسجة في المنطقة المصابة ، وتوجد سلالات تسبب نخر ينتشر ببطيء كما في نباتات الأعناب . وقد يكون النخر سريعا يؤدي الى جعل البكتريا

تحت الاستماتة في الخلايا كما في نبات الذرة . ووجد ان هذا النخر يمكن إيقافه باستعمال الجينات الكابحة لمسار الموت مثل الجين P_{35} من الفيروس العصوي Baculovirus ، ولذلك يمكن ان تخفف هذه الجينات من أعراض الإصابة وزيادة في عيوشية الخلايا النباتية .

تركيب البلازميد Ti :

يحتوي البلازميد على منطقة أصل التضاعف $ori V$ ويحتوي على القطعة T-DNA وجينات الضراوة ومنطقة تشفر لعمليات الانتقال بالاقتران كما موضح في الشكل أعلاه .

تركيب قطعة T-DNA :

حجمها بين 10 – 30 كيلو قاعدة أي حوالي اقل من 10 % من حجم البلازميد ، ويحتوي البلازميد على قطعة واحدة او مكررات منها T- regions ، وتتكون القطعة من مناطق رئيسية ، الوسطية T_C ومنطقة الى اليمين T_R وتحتوي جينات لتخليق Mannopine (mas) ومنطقة (ags) لتخليق Agropine . اما الجهة اليسرى T_L فتحتوي جينات الاوكسينات Auxins والسايوتوكينات Cytokinin (منظمات النمو) وocs لتخليق Octopine . وتحاط القطعة بتواليات يصل طولها الى 25 زوج قاعدة وتكون متشابهة تقريبا على الطرفين ، وتكون تواليات الجهة اليمنى هي الأهم لأنها تحوي على موقع الانفلاق بالإنزيمات القاطعة .

وتكون معالجة القطعة T-DNA من البلازميد ونقلها الى الخلايا النباتية تحت تأثير جينات الضراوة Vir genes التي يحملها البلازميد وتشمل A , B , C , D , E , F , G , H .

كيفية نقل قطعة T-DNA :

تعمل كل من بروتينات الضراوة virA , virG في التحسس للإشارات وتنظيم الاستجابة الوراثية ، virA احد بروتينات الضراوة يوجد في الفسحة المحيطة يتحسس المركبات الفينولية التي ينتجها النبات المجروح ، وله فعالية الفسفرة الذاتية وبمساعدة مكونات أخرى مثل انظمة نقل السكريات ChVE وبوجود المركبات الفينولية يقوم بفسفرة virG الذي يكون خاملا بحالته غير المفسفرة ، virG المفسفر يزيد من انتساخ جينات الضراوة الأخرى وذلك لاحتواء مهادتها على vir box ، اما في الانواع التي لا تستحث فان كل من virA , virG لا تحتاج للحث بالفينولات النباتية .

وتحتاج عملية النقل الى نظام نقل (النوع الرابع IV) المتكون من البروتين virD4 و 11 بروتين من مجموعة virB وعندما تنقل القطعة T-DNA تنتقل معها بعض بروتينات الضراوة وهي vir F , virE2 فالبروتين virD4 يعمل كقطعة واصلة لتداخل القطعة مع virD2 (الذي هو إنزيم قاطع يقطع القطعة T-DNA من البلازميد) والبروتينات 11 المذكورة تعمل كقنوات للنقل وكذلك تعمل كإنزيمات ATPases لتزويد الطاقة . فمن البروتينات 11 من مجموعة virB مثل virB2 , virB5 , virB7 تعمل تركيب T- pilus الذي يكون بمثابة ممر تمر منه T-DNA

وبروتينات الضراوة التي تمر وتنتقل معها ، وتكون T- pilus ضرورية لعملية التحول وتتفاعل مع بروتينات على الجدار والغشاء الخلوي للخلايا النباتية ، أي ان الشعيرة تعمل على زيادة التصاق الخلايا البكتيرية مع الخلايا النباتية لتسهيل نقل المواد الوراثية وهذه العملية تكون حساسة للحرارة وتزداد عند انخفاض الحرارة الى 18 – 20 °م لإنجاح عملية الانتقال وتحول الخلايا النباتية الى ورمية .

والحقيقة ان ما ينقل من القطعة هو شريط مفرد T- strand اذ يثلم الشريط بانزيم القطع virD2 والذي يحوي على تسلسل نووي (Nuclear localization sequence) NLS وينقل المعقد T- complex المكون من T- strand الشريط المفرد و virD2 الذي قام بقطعه وكذلك بروتين virE2 وهو من البروتينات التي ترتبط بأشرطة DNA المفردة (SSB protein) ويربط الأخير لحماية المعقد داخل الخلايا النباتية ، وهذا يعني ان قطعة T-DNA لا تنتقل لوحدها وإنما تنقل معها البروتينات المذكورة اضافة الى بروتينات اخرى . ثم ينقل المعقد من الخلية الى نواتها بتأثير NLS بعد ارتباطه بأحد بروتينات التوريد الى النواة α - importin الذي هو احد بروتينات نواة الخلية النباتية ويوجد في انوية الخلايا حقيقية النواة ، ويكون الدخول خلال الثقوب الموجودة في الغشاء النووي . ويمكن ان يحدد virD2 اندماج الشريط المفرد ويحدد الموقع المناسب له ، ولذلك يكون كل من virD2 و virE2 هي التي توجه المواد الوراثية نظرا لاحتوائها على التوالي NLS .

ويساعد في لف الشريط بروتينات ضراوة اخرى مثل virE2 الذي يتعاون مع البروتين الوصيف virE1 ويساهم البروتين virE2 في حماية قطعة DNA المفردة الشريط من الهضم داخل نواة الخلية النباتية ويقوم بالحماية للمعقد بتغطيته (كما ذكر اعلاه) .

وفي داخل نواة الخلية النباتية تنضم بروتينات أخرى لتكون T-complex . وتشارك في هذه العملية المعقدة بعض الجينات الكروموسومية مثل *ChvA* , *ChvB* المسؤولة عن تخليق السكريات المكوثرة وكذلك الجينات *att genes* المسؤولة عن الالتصاق بالخلايا وجينات اخرى تشارك في خطوات مختلفة من العملية .

اقحام T- DNA في جينوم الخلية النباتية

إقحام القطعة في جينوم الخلية النباتية يتأثر بشكل كبير بالهستونات الموجودة والمرتبطة مع الكروموسومات (الميزة الخاصة بالخلايا حقيقية النواة) وخاصة عائلة H2A التي تحوي على 13 جين ولكل منها دور في عملية التحول ، فالجين H2A-1 يعبر عنه في الجذور الجانبية والمنطقة المرستيمية ومنطقة الاستطالة ، وتعد المنطقة الأخيرة هي الأكثر حساسية للتحول بالـ *Agrobacterium* ووجد ان هناك علاقة قوية ايجابية بين التعبير عن H2A-1 والتحول بالبكتريا ، فزيادة H2A-1 يؤدي الى زيادة أهلية النبات للتحول لذلك يستعمل في تحويل النباتات العسوية .

نقل الجينات بواسطة T-DNA

ليس كل قطعة T-DNA على بلازميد الورم تحوي على مواقع فلق بالإنزيمات القاطعة لإدخال الجينات المطلوب نقلها ولذلك لا يمكن استعمالها مباشرة للنقل ، وللتغلب على هذه الحالة توجد طرق وتوجهات مختلفة لنقل الجينات المطلوبة الى النباتات ومنها :

- كلونة الجينات بشكل مباشر على البلازميد ووضعها أمام جينات الضراوة لأن بعض هذه الجينات يمكن ان تنتقل الى داخل نواة الخلية النباتية .

- استعمال نظام الناقل المنشطر Binary – vector system ويعني وجود اثنين من النواقل احدهما يحمل T-DNA والاخر جينات الضراوة . أي شطر بلازميد الورم وتحمل مكوناته المهمة كل على بلازميد صغير أي على متضاعف Replicon مختلف ، وهذه المتضاعفات ليس بالضرورة ان تكون بلازميدات فيمكن ان توضع T-DNA على كروموسوم *Agrobacterium* ويمكن ان تحرك بتأثير البلازميد الحاوي على جينات الضراوة ولكن الأفضل استعمال بلازميد واسع المضاييف وخاصة من Inc p α – based vector الذي يستطيع ان يتضاعف في *E. coli* التي يتم عادة تكثير البلازميدات فيها ويستطيع التضاعف في *Agrobacterium* .

ويستعمل نظام النقل المنشطر نظرا لصعوبة إدخال الجينات بشكل مباشر الى T- region من بلازميد الورم كما ذكر انفا وكذلك صعوبة التعامل مع بلازميد الورم الكبير الحجم ، لذلك تفصل جينات الضراوة وقطعة T-DNA . وعند وجود العناصر الوراثية في الخلية الواحدة فان منتجات جينات الضراوة تؤثر على T - region وتعالجها وتنقلها الى الخلية النباتية . والمتضاعف الذي يحمل قطعة T-DNA يسمى بالناقل المنشطر T-DNA binary vector ، اما الآخر الذي يحوي على جينات الضراوة فيسمى بالناقل المساعد Helper vector او vir vector الذي يجب ان يكون من المجموعة غير المتوافقة نفسها التي يعود إليها الناقل الآخر . vir vector لا يحدث الورم لأنه لا يحوي على T – region .

وتحضير النظام المنشطر زاد من استعمال *Agrobacterium* في نقل الجينات الى النباتات وإنتاج نباتات مهندسة وراثيا Transgenic plants . ذلك لان المتضاعفات او البلازميدات تكون صغيرة وتحوي على مواقع انفلاق بإنزيمات القطع كما يمكن زيادة أعدادها في *E. coli* . وقد طورت النواقل لتحوي على بعض الإمكانات التي تسهل استعمالها لأغراض خاصة منها :

- تحوي على مميزات ملائمة .
- تحوي على Poly (A) .
- ممكن إضافة إشارات Signals التي تسهل إدخال الجينات المرغوب فيها .
- إضافة مشجعات الترجمة Translation enhancers لزيادة التعبير عن الجينات المنقولة .

■ تحوي على إشارات لتوجيه البروتينات الناتجة من الجين المدخل في الخلية النباتية ، وتكون أعداد نسخها عالية تصل الى 5 – 10 مقارنة باستعمال نسخة واحدة من بلازميد الورم .

وقطعة T- DNA في بلازميد الورم الأصلي تكون كافية لحمل 10 جينات فحجمها في السلالة المهمة C58 تكون في بلازميد الورم pTiC58 حوالي 23 كيلو قاعدة . إضافة الى ان كل من بلازميدات Ti , Ri يمكن ان تحوي مكررات للقطعة لذلك تكون كافية لنقل جينات مسار تخليق كامل وقد أمكن نقل بلازميد الورم البالغ 200 كيلو قاعدة بواسطة عكس ترتيب الجهة اليمنى للقطعة T- DNA

ونقل قطعة كبيرة من DNA يحتاج الى زيادة مفرطة في التعبير عن البروتينات virE و virG بشكل مستمر وبدون حث لغرض حماية القطعة من التفكك داخل الخلايا النباتية ، وهذه الاحتياطات أي زيادة التعبير عن بروتينات الحماية مكنت نقل قطع من DNA بحجم 30 - 150 كيلو قاعدة . ويمكن معالجة الوضع باستعمال طفرات تعبر عن virG و virE بشكل مستمر وبدون حث . ومثل هذه الطفرات استعملت في تحويل نبات الرز وفول الصويا ، كما يمكن إضافة نسخ إضافية من virG لزيادة الكفاءة .

ومن جهة ثانية فان عملية نقل الجينات وإجراء عملية التحول لا تعتمد على إنتاج T- strand وزيادة التعبير عن جينات الضراوة فقط وانما يعتمد على الخلفية الوراثية للنباتات المراد تحويلها .

اندماج T- DNA والتعبير عن الجينات المنقولة :

ليس دائما يؤدي تحويل النباتات ونقل قطع T- DNA والجينات المحملة عليها الى التعبير عن الجينات المنقولة بكفاءة وذلك يعود الى عدة أسباب منها :

■ التأثير الموضعي وهو المكان الذي يدمج فيه الجين المرغوب في جينوم النبات فقد يرتبط في مكان بعيد عن المواقع المشجعة للانتساخ او بعيدا عن المشجعات Enhancers (الموجودة في خلايا حقيقية النواة)

■ الجين ممكن ان يندمج في مناطق مؤهلة للانتساخ وبذا يعبر عنه وعليه فان الجين المنقول بدون ممهد يمكن التعبير عنه ولكنه قد يدمج في مناطق صامتة من الجينوم وبذا يكون بدون تأثير .

■ استعمال صفة المقاومة للمضادات الحيوية في النباتات لا تساعد في الانتساخ الصحيح لذلك وجب وضعه في مكان نشط من ناحية الانتساخ بواسطة أنظمة إدماج موجه متخصصة – Site specific integration systems .

■ ان إسكات الجين المنقول وعدم حصول عملية التعبير عنه حتى عند استعمال الأنظمة المذكورة اعلاه ينتج من مثيلة DNA وعملية المثيلة مسجلة ومعروفة في إسكات Silencing عدد من جينات T- DNA . وقد وجد ان عملية الإسكات هذه يمكن ان تحصل في ممهد الجين المنقول وكذلك

تحصل بعد عملية الانتساخ أي ان DNA ينتسخ ولكن RNA الناتج يكون غير ثابتا وهذا يحصل بشكل كبير عند نقل عدة نسخ من الجينات داخل الخلية النباتية .

فالتقنيات المستعملة في تحويل الخلايا النباتية مثل التحول الذي يتم بواسطة Polyethylene glycol او التحول باستعمال الاجسام الدهنية وكذلك التنقيب الكهربائي تؤدي الى إدخال عدد كبير من نسخ الجين بشكل مترادف Tandem او بترتيب مقلوب مما يؤدي بالخلية الى إخمادها ولذلك تستعمل البكتيريا في نقل نسخة واحدة من الجين .

تحويل النباتات

بعد التعرف على بعض الجوانب الجزيئية لا تزال هناك العديد من النباتات المهمة عصية على عملية التحول ، فالحاجة لا تزال قائمة للحصول على أنظمة نواقل توصل T- DNA بكفاءة عالية الى انوية الخلايا النباتية والاندماج الصحيح وليس العشوائي والتعبير الجيد عن الجينات المنقولة . ومن جهة ثانية فهناك العديد من النباتات التي تعد معبرات جيدة عن الجينات المنقولة ولكنها تفقد هذه القابلية بعد عدة أجيال تحت ظروف الحقل وهذا يعني ان الحاجة الى معرفة الجوانب الأخرى ومنها :

- تأثير موقع الاندماج ونمط اندماج قطع T- DNA .
- تأثير الكروماتين والبيئة الكروموسومية التي يمكن ترفض الجين الجديد .
- عمليات الانتساخ وكفاءتها وتأثير الممهدات والعناصر المشجعة .
- عمليات إسكات الجينات Gene silencing

وتحديد تركيب الجينوم في احد اهم سلالات البكتريا C58 سهل وقلل الكثير من العقبات اذ تم التعرف على الجينات والبروتينات النباتية المشاركة في عملية التحول .

الجينات والبروتينات النباتية المشاركة في عملية التحول

اتضح مما ذكر اعلاه ان عمليات التحول لا يمكن ان تتم بالاعتماد على البكتريا لوحدها ، اذ يشارك الطرف الثاني وهو النبات في العملية ويمكن الكشف عن مشاركة النبات بعدة طرق منها :

- استعمال أنظمة التهجين في الخميرة للتعرف على البروتينات النباتية التي تتداخل مع بروتينات الضراوة للبكتريا .
- استعمال المسح الوراثي المباشر لتحديد الطفرات في النبات التي لا يمكن ان تجري فيها عملية التحول .
- استعمال المسح الوراثي المعكوس Reverse genetic screen لتحديد أي من الجينات النباتية يمكن ان تعمل في عمليات التحول .

- استعمال المعلومات الوراثية Genomics المختلفة لتحديد الجينات النباتية التي يمكن ان تحت او تكبت بعد الإصابة ببكتريا *Agrobacterium* مباشرة .

تداخل البروتينات النباتية والبكتيرية

من المتوقع ان العديد من البروتينات النباتية تتداخل مع بروتينات البكتريا وخاصة بروتينات الضراوة ومن هذه البروتينات :

- ◊ virB2 بروتين ضراوة في البكتريا وبعد اهم مكونات T- pilus اللازمة لعملية التحول .
- ◊ virD2 البروتين الذي يرتبط الى النهاية 5' للقطعة T- strand بعد ثلم احد الأشرطة وذلك لان ما ينقل من T- DNA هو شريط مفرد .

◊ virE2 البروتين الذي يرتبط بالشريط المفرد T- strand ويغطيه للحماية .

◊ virF بروتين ينتقل الى الخلايا النباتية مع قطع DNA .

اضافة الى وجود عدد آخر من البروتينات الموجودة على سطح الخلية البكتيرية مثل virB5 , virB7 التي توجد على T- pilus وتساعد في عملية الانتقال بتكوينها القنوات .

اما البروتينات النباتية التي تتداخل أهمها α – importins وهي مجموعة من البروتينات التي تساعد وتشارك في نقل عدد من البروتينات الى النواة الحاوية على NLS (Nuclear localization sequence) المذكور سابقا وبعضها يحوي على أكثر من نسخة من NLS . والبروتين virD2 يتفاعل مع importins النباتية بالإضافة الى 2 من البروتينات النباتية الاخرى ، وهناك بروتينات نباتية اخرى تتفاعل مع virE2 . والبروتين المهم الذي يتفاعل مع virD2 هو Cyclophilin وهو إنزيم Glutathione S – transferase الذي يثبط بالمركب Cyclosporine A ولذلك فان الأخير يمنع تحول النبات بالبكتريا . ويمكن للبروتين virD2 القيام بعمل الوصيف لتوجيه T- complex الى داخل الخلية النباتية ، ويتداخل virD2 مع بروتينات او إنزيمات Phosphatases للقيام بعمليات التنظيم من خلال فسفرة NLS فيه وزيادة فعالية Phosphatases تؤدي الى تقليل توجه المعقدات الى النواة .

اما البروتينات التي تتداخل مع virE2 هي VIP 1 الذي يساعد في توجيه المعقدات الى النواة ، وكذلك يتفاعل مع α – importins للمساهمة في توريد المعقدات الى النواة .

ويتداخل virF مع بروتين نباتي خاص (SKp1) الذي يوجه المدورات Cyclins النباتية الى مقرات الهضم 26S proteasomes لهضمها لجعل الخلايا عند مرحلة معينة من دورة الخلية تشجع عملية التحول .

وهناك العديد من الجينات النباتية المسؤولة عن تخليق مكونات على سطوح الخلايا مثلاً في الجذور التي تساعد على التصاق البكتريا عند الإصابة والتي يساعد بعضها في نقل T-DNA الى سايتوبلازم الخلية النباتية .

وعند استجابة النباتات للإصابة بالبكتريا فهناك حوالي 400 جين يتم إعادة تنظيمها على مدى مدد زمنية مختلفة من الإصابة ، البعض يحث والآخر يكبح وذلك تشكل أرضية جيدة للتحكم لزيادة كفاءة التحول في النباتات العسوية التحول .

وأكثر الجينات التي تتأثر هي جينات الهستونات والبروتينات الرايوزومية وكذلك الجينات العاملة في مجال الدفاع النباتي وبالتالي الجينات العاملة في الاستجابة للإجهاد ولكن بدرجات متفاوتة .

النباتات القابلة للتحول

من الواضح ان البحث عن نبات يحوي على صفة مرغوبة ومعينة يمكن ان يتم نقلها باستخدام قطعة واحدة من T-DNA وذلك لان الاعتماد على الاصابة والخطأ في اندماجه والتعبير عنه يكون أمراً غير مقبول لاستغراقه الوقت والجهد ، لذلك هندست النباتات المهمة بادخال الجينات المرغوبة باستعمال عدة نسخ من T-DNA ولكن مفصولة عن بعضها ويكون الجين المطلوب داخل القطعة محاط بتواليات محددة اطلق عليها (Matrix attachment regions) MARs وهي تواليات من DNA يمكن ان تربط خارج الأنظمة الحية ويمكن ان تكون من المنطقة التي يوجد فيها الجين واليها يعزى فصل الجينات عن بعضها داخل الكروماتين الملفوف ، وتفصله عن العناصر الاخرى الخاصة بعمليات الانتساخ او الإسكات ، وبعض MARs يمكن ان تحوي على المشجعات .

والطريق الأخرى للتخلص من إسكات التعبير عن الجينات هو استعمال العناصر المضادة لعملية الإسكات Antisilencing وهذه العناصر توجد جيناتها في بعض الفيروسات النباتية من نوع RNA او DNA وهي وسيلة دفاعية للفيروس لغزو النبات ، ويمكن ان تستعمل لزيادة التعبير عن الجينات المنقولة وتخليصها من عمليات الإسكات ، اذ يمكن ان تساعد في تنشيط الجينات المنقولة المسكنة من قبل النبات حيث أمكن بهذه الوسيلة زيادة التعبير عن الجينات بمعدل زيادة 50 مرة اكثر من معاملة السيطرة . ومن هذه الجينات P10 الموجود في فيروسات الطماطة Tomato bushy viruses اذ يؤدي الى تقليل الجزيئات الصغيرة من RNA (21 – 25 زوج قواعد) التي تعمل على الإسكات بعد عملية الانتساخ .

تحويل او هندسة النبات المؤقت

هناك بعض الجينات المراد التعبير عنها بشكل وقتي ثم التخلص منها ، وهذا يمكن باستعمال أنظمة لا تعمل على اندماج T-DNA في الجينوم ويكون ذلك ممكناً باستعمال نقل البروتينات وليس الجينات ، أي باستعمال طفرات من *Agrobacterium* كفؤة في نقل موادها الى النواة ولكن دون

الاندماج كما في استعمال طفرات *virD2* المسئول عن استهداف النواة أي ان ضرورتها قليلة واطلق على هذه الطفرات *virD2 ω* وهي تستطيع ان تحول او تغيير صفات النبات بشكل مؤقت . ويمكن استعمال بروتينات جينات الضراوة الأخرى لغرض التحويل المؤقت .

هندسة البلاستيدات

وهي من التطلعات التي يرام استعمال *Agrobacterium* فيها ولكن هناك بعض العقبات ولكن هذا لا يمنع من وجود المحاولات . فمن العقبات ان وجود NLS في *virD2* , *virE2* يقوم بتوجيه T-DNA الى انوية الخلايا النباتية وهذه مشكلة خاصة بالبكتريا ، ولكن كما ذكر اعلاه ان بعض البروتينات النباتية تشارك في توجيه T-DNA ومنها اكتين الهيكل الخلوي النباتي الذي يساهم في توجيه T-DNA وبالتالي في تحول الخلية النباتية ، فهذا يمكن ان يحور ويقوم بتوجيه T-DNA الى البلاستيدات بدلا من النواة .

مجمل عمليات الإصابة والتحول

شكلت بكتريا *Agrobacterium* وتداخلاتها مع النبات ونقلها للمواد الوراثية أهمية كبيرة ففيها كانت اول عمليات هندسة وراثية تتخطى ليس الأنواع والأجناس وإنما الممالك ، ومنها تعلم الإنسان الكثير ، كما ان الدراسات الجزيئية لعمليات انتقالها أوضحت العديد من الظواهر ، وبذلك فهي تشكل نموذجا دراسيا فعال للفهم ، وتشمل التداخلات بشكل مختصر :

عمليات التعرف والالتصاق : وتعد عملية تعرف البكتريا على الخلايا النباتية والالتصاق إليها الخطوة الأولى لعملية الإصابة ويتم ذلك بواسطة عدد من بروتينات البكتريا التي يشفر لها بالجينات مثل *att* , *ChvA* , *ChvB* وجينات الالتصاق *attD* , *attR* توجد على بلازميد خفي او صامت pAtC58 وهو اكبر من بلازميد الورم Ti ويكون غير ضروريا لعملية الإصابة ولكنه يزيد من ضراوة البكتريا وذلك لتأثيره في زيادة التعبير عن جينات الضراوة . وتشارك الخلايا النباتية في عملية الإصابة بالتعبير عن بعض الجينات في منطقة استطالة الجذر (وهي أكثر المناطق حساسية للإصابة بالبكتريا) .

نقل المعلومات الوراثية من البكتريا الى خلايا النبات : ان أشرطة T والبروتينات المرتبطة بها تصدر الى الخلايا باستعمال نظام إفراز خاص بها يسمى Type IV secretion system والذي يتكون في البكتريا من بعض البروتينات التي يشفر لها بـ *virB* , *virD4* الذي يحوي على 11 من OFRs والنظام يصدر بعض البروتينات إضافة الى المعقد T – complex مثل *virF* , *virE3* , *virE2* . و *virE2* يغلق الأشرطة المفردة في المعقد ولكن يعتقد ان عملية غلقه تحصل في سايتوبلازم الخلية النباتية بعد ان ينتقل كل من *virE2* مع الشريط المفرد T-strand ، والآخران لا يرتبطا في خلية *Agrobacterium* نظرا لوجود الوصيف *virE1* الذي يرتبط الى *virE2*

ويمنع ارتباطه بالشريط المفرد ، ولكن الوصيف virE1 يشارك في تصدير virE2 . وفي بعض السلالات يكون البروتين virE3 مسؤولا عن عملية النقل من البكتريا الى الخلية النباتية ، وهذا يشير الى ان *Agrobacterium* لا تنقل DNA فقط وإنما تنقل بعض بروتيناتها .

اندماج DNA والتعبير عنه

ان عمليات اندماج T-DNA هي تنويع لعملية نقل DNA من البكتريا الى النبات . وهذه العملية ليست عملية مباشرة وذلك لان T-DNA لا تحوي على الإنزيمات التي تسهل عملية الاندماج ، ولذلك تقوم بهذه المهمة مكونات أخرى مثل virD2 , virE2 وعوامل نووية من الخلايا المضيفة مثل AtKu80 وكذلك إنزيم DNA ligase النباتي الذي يربط النهاية 5' من DNA الآتي الى DNA العائد للخلية النباتية ، ثم يكون الشريط المكمل لشريط T – strand بواسطة الماكينة الخلوية النباتية ، وان كانت هناك بعض الشواهد التي تشير الى تحول الشريط المفرد الى شريط مزدوج ثم يربط بالجينوم النباتي . ويتم دس DNA في الجينوم النباتي بعد ان يقطع الاخير بأحد الإنزيمات القاطعة ICEu 1 الذي يخلق بشكل وقتي وترتبط القطع بعملية تأشب غير متجانس وهذا ما أشارت إليه التواليات الموجودة عند منطقة الاتصال إضافة الى ان العامل النووي AtKu80 يشارك في مثل هذه العمليات من التأشب . وبعد ان يندمج DNA يمكن ان يولد الورم او التعبير عن الجينات المنقولة ولكن قد لا تكون بأفضل حالاتها نظرا لتأثير عمليات الإسكات المذكورة أعلاه . ويمكن للجين الجديد ان يحبط الجينات المماثلة له في الخلية ضمن حالة الكبح المرافق Cosuppression .

وتتولد الأورام نتيجة الإصابة التي تؤدي الى اضطراب عملية التمايز للأنسجة الوعائية وتخريب الطبقات الخارجية من البشرة ، هذه الاضطرابات تؤدي الى الورم وتساعد بتزويده بالماء والسكرورز . ولذلك فان الأورام المستحثة بالبكتريا تمثل مغاطس تنتسب إليها كميات كبيرة من المحاليل الأساسية أي محاليل المواد الغذائية والمركبات اللاعضوية النباتية . وفي البداية يكون السكرورز هو السكر الرئيس ولكن بعد ذلك يحصل انحراف لسكريات سداسية أخرى ويحصل عدم توازن في السكريات نتيجة وجود إنزيم انقلاب السكر Invertase الموجود في الخلايا الورمية .

السيطرة الحيوية

Biocontrol

المجال الذي توظف التقنية الحيوية امكانياتها لمكافحة الآفات على مختلف أنواعها . وتتنافس في هذا المجال المبيدات الحيوية والمبيدات الكيماوية . ولكن في الوقت الحاضر يسود سوق الكيماويات وهي في تطور رهيب وتساندها في ذلك الإمكانيات .

المبيدات الكيماوية

تصل طلبات تسجيل طلبات تسجيل المبيدات الكيماوية الى 5000 – 20000 طلب سنويا لأنواع مختلفة من مبيدات الأدغال والحشرات والفطريات والديدان وغيرها ، وتساعد الجهات المختصة في الترويج لها ، ومما زاد في زيادة الطلبات في الآونة الأخيرة تطور طرق التحليل الدقيق وقلّة المواد المطلوبة للتقييم فتصنع المبيدات بكميات تصل الى 200 ملغم - 1 غم ويكتفى بهذه الكمية وزادت التسهيلات الى المطالبة فقط بـ 2 ملغم لفحصها بعدد كبير من الطرق والأحياء باستعمال صفائح التقدير الدقيقة (96 well microtiter plates) لذلك ارتفعت إمكانية بعض الشركات لفحص 10000 – 100000 نموذج سنويا وقد تصل الى 500000 نموذج كما حصل في عام 2003 على غرار المواد الصيدلانية التي تستعمل طرق المسح السريع High throughput screen . وهذا التوسع في تصنيع المبيدات الكيماوية يعتمد على Combinatorial chemistry والمكتبات الكيماوية والتي تسهل إنتاج كل ما يمكن من الجزيئات من وحدة التركيب الأساسية . وهذا الاتساع المخيف باستعمال المواد الكيماوية أدى الى زيادة التلوث البيئي ونشؤ سلالات مقاومة بشكل مخيف مما حدى بالعاملين بتطوير إمكانية استعمال المواد الحيوية لمكافحة الآفات المقاومة للمبيدات وان كانت هناك بعض المعوقات التي تجعل المنافسة شديدة بين سوق المبيدات الحيوية والمبيدات الكيماوية . وتعد المبيدات الحيوية من الوسائل المهمة في الدول النامية للحفاظ على المحاصيل المهمة مثل القطن والكاو والحبوب وغيرها . وقد سجل بحدود عام 1991 حوالي 500 نوع من الحشرات مقاومة للمبيدات الكيماوية المستعملة .

المبيدات الحيوية والسيطرة الحيوية

تعيش النباتات مع الاحياء المجهرية منذ زراعتها ، لذلك تهدف الدراسات معرفة العلاقة بين النبات والاحياء المجهرية المسببة للأمراض لاستغلالها في مكافحة الحيوية . وتتداخل الاحياء المجهرية المفيدة لكبح الامراض وزيادة النمو والاستفادة في تثبيت النتروجين وإذابة الفوسفات ومواد اخرى . وهناك العديد من الجينات النباتية التي تشجع العلاقة الايجابية مع الاحياء المجهرية ، ولكن يمكن ان تكون العلاقات ذات جوانب سلبية وهي التي استغلّت في فكرة استعمالها في السيطرة الحيوية الميكروبية Microbial biocontrol وتعني استعمال بعض الاحياء المجهرية المفيدة في كبح الامراض في النباتات من قبل الاحياء الممرضة .

ان عملية السيطرة الحيوية الميكروبية تنتج من تداخل عددا من العوامل منها المضيف النباتي ، الفلورا الطبيعية المفيدة ، والممرضات والبيئة والظروف الاخرى . والآليات التي تستعمل للسيطرة على الآفات يمكن ان تكون :

◊ التضاد الحيوي .

◇ التنافس على المواد الغذائية .

◇ التطفل .

◇ حث المقاومة في المضيف .

ويمكن ان تستغل هذه العلاقات وكذلك استعمال الهندسة الوراثية لإنتاج سلالات او تحويل النباتات لكبح زيادة توليد الأمراض . وعوامل السيطرة الحيوية الميكروبية يمكن ان تؤدي الى كبح الامراض ولكن بشكل متغاير ، مثل استعمار المضيف وطرد الباقي ، حث المقاومة وحث استجابة النمو في النبات ، وحصول هذه الحالات يشير الى حدوث تغيرات وراثية . ويلعب النمط الجيني للمضيف دورا أساسيا في إنجاح السيطرة الحيوية على الامراض والآفات وذلك بالتداخل مع عوامل السيطرة الميكروبية .

وقد وجد ان هناك بعض المناطق المتخصصة في جينومات النباتات يمكن ان تحدد إمكانية الإصابة بالامراض وأخرى تساهم في كبحها ، كما ان الحالة الفسلجية للنبات تكون مهمة ، اذ ان تغذية النبات الجيدة وصحة النبات تساهم في دفع الأخطار ، ويصل النبات الى الحالة الفسلجية الجيدة بواسطة تداخلات مهمة مثل العلاقات الجذرية *Mycorrhizae* والعلاقة مع البكتريا المثبتة للنتروجين *Rhizobium* والتدخلات الأخرى مع الميكروبات . ولذلك فالميكروبات الطبيعية المفيدة تترافق مع الأحياء المرضية على المكان والغذاء ، كما ان الفعاليات الايضية الجيدة في النبات تكبح إصابته بالأمراض ، ويمكن للأحياء المتعايشة مع النباتات السليمة ان تنتج عوامل كبح *Suppressive factors* تمنع الممرضات من التأثير على النبات فمثلا البكتريا *B. cereus* UW85 تنتج المضادات المعروفة جيدا في كبح الأمراض لذلك تستعمل في السيطرة الحيوية .

ان الجينات المشجعة لعلاقة النبات مع الاحياء المفيدة قد تكون موجودة في بعض النباتات غير المستعملة او ذات صفات غير مرغوب فيها ، لذلك فان التحليل الوراثي وتحديد التواليات يفيد في التعرف على الجينات الملائمة ودسها في النباتات الاقتصادية ، ولذا فالحاجة ماسة لوضع الخرائط الكروموسومية للنباتات الاقتصادية ودراستها من الناحية الوراثية وتأثيرها على الاحياء المفيدة ، كل هذا سيؤدي الى خلق وسائل ملائمة للبيئة ومكافحة الأمراض النباتية .

كل هذه الأسباب أدت الى التوجه الى المبيدات الحيوية *Biopesticides* التي تشتق من الاحياء الطبيعية مثل الحيوانات والنباتات والفطريات والفيروسات والبكتريا لاستعمالها في مكافحة الآفات . وقد سجل في نهاية عام 2001 حوالي 195 من المبيدات الحيوية . ويمكن ان تقسم المبيدات الحيوية الى عدة أقسام اعتمادا على عدد من المؤشرات ومنها :

◇ المبيدات الميكروبية وتتكون من الاحياء المجهرية مثل البكتريا ، الفطريات ، الفيروسات ، الابتدائيات وغيرها كمواد فعالة ، والمبيدات الميكروبية يمكن ان تسيطر على أنواع من الآفات فمثلا

توجد فطريات تقضي على أدغال معينة وأخرى تقضي على حشرات معينة وكذا الحال مع المبيدات المحضرة من البكتيريا مثل *Bacillus thuringiensis* (Bt) التي تقضي على أنواع مختلفة من الحشرات كما سيأتي ذكره لاحقا .

♦ المواد الموجودة في النبات Plant – incorporated protectants (PIP) وهي المواد التي تنتجها النباتات ، واطئة الوزن الجزيئي أدخلت إليها بعمليات الهندسة الوراثية .

♦ المبيدات الكيموحيوية Biochemical pesticides وهي مواد طبيعية تسيطر على الآفات بألية غير السمية وتشمل الفرمونات الجنسية للحشرات Insect sex pheromones التي تتداخل مع عمليات تزاوج الحشرات ، والعطور النباتية التي تجذب الحشرات الى المصائد ، وهي ضمن المجموعة التي يطلق عليها الكيمياء السليمة Green chemistry .

مزايا المبيدات الحيوية

للمبيدات الحيوية بعض المزايا التي ترجح كفتها على المبيدات الكيماوية ومنها :

- ♦ اقل سمية من المبيدات الكيماوية التقليدية .
- ♦ متخصصة في أهدافها فهي تستهدف آفة واحدة او آفات قريبة جدا من بعضها في حين ان المبيدات الكيماوية يمكن ان تضر العديد من الاحياء فتتمدد من الحشرات المستهدفة الى الطيور واللبائن وغيرها من الأحياء في السلسلة الغذائية .
- ♦ يصعب نشؤ المقاومة ضدها .
- ♦ تكون مؤثرة بتركيزات قليلة .
- ♦ قابلة للتحلل الحيوي بسرعة .

والميزتان الأخيرة تقلل من التلوث البيئي . ونظرا لهذه الميزات فان منظمات حماية البيئة تحتاج الى معلومات قليلة لتسجيل المبيد مقارنة بالمبيدات التقليدية ، وتسجله عادة في اقل من سنة في حين تحتاج المبيدات الكيماوية الى مدة على الأقل 3 سنوات او أكثر . ولكن هذا لا يعني عدم رجوع الجهات المسؤولة الى البحوث والمقالات التي تنشر حول المبيد لتقصي التأثيرات السلبية له على صحة الإنسان والبيئة .

مجاميع المبيدات الحيوية

تنتج المبيدات الحيوية من عدة مجاميع من الأحياء منها :

- النباتات وتمثل بالدواحر بشكل أساسي .
- المبيدات المنتجة من الفطريات Mycopensticides .
- المبيدات المنتجة من البكتيريا وأهمها Bt .

• مبيدات من Actinomycetes مثل Spinosod الذي له تأثير واسع على الحشرات وينتج من *Saccharopolyspora spinosa* الذي يعيش في التربة ، و Avermectins ينتج من *Streptomyces avermitilis* كائن يعيش في التربة ويكون فعالا ضد السوس Mites وبعض الحشرات .

• المبيدات الفيروسية .

وفيما يلي استعراض لبعض اهم المبيدات .

الدواحر النباتية Phytoalexins

تنتج النباتات عددا من المواد عند إصابتها بالحشرات او الفطريات او غيرها من الاحياء الممرضة ويمكن ان تنتج تحت ظروف الإجهاد او المعاملة ببعض المواد الكيميائية . وهذه يمكن ان تستغل في السيطرة الحيوية ومن أهمها الدواحر وهي مجموعة من المركبات المختلفة التركيب وبصورة عامة تكون محبة للدهون وذات وزن جزيئي واطئ وهي من مركبات الايض الثانوي للنباتات ولها تأثير مضاد للاحياء وخاصة الفطريات (كما مر ذكره ، يراجع الفصل الثامن) .

تأثيرها على الاحياء الممرضة يكون بحثها للاضطرابات في الأغشية الخلوية للفطريات فضلا عن وجود آليات اخرى . المواد لا تكون موجودة في النبات السليمة ولكنها تخلق من طلائع موجودة في النبات استجابة لحصول الإجهاد او إصابة . والانزيمات التي تخلفها يتم تخليقها بعد الإصابة . وتتراكم المواد في بعض النباتات في الحالة الطبيعية وتعد من أساليب المقاومة ، وتستطيع بعض الفطريات القيام بتأييدها مما يجعلها مرضية ويمكن ان تغزو النبات ومنها :

♦ دواحر العنب مثل Stilbenes مركبات فينولية توجد في أوراق وثمار الأعناب عند اصابتها بالفطريات وبعض المعاملات اللاحيوية ، وتوجد في نباتات اخرى وتقاوم الإصابات الفطرية

♦ Resveratol مركب ينتج عند الإصابة بالفطريات اضافة الى مركبات اخرى مضادة للفطريات الممرضة . وتزيد المركبات من مقاومة الأعناب للإصابة بالفطريات ، والأخيرة يمكن ان تغزو الأعناب اذا كانت لها القابلية على تفكيك هذه المركبات بواسطة بعض الإنزيمات مثل Laccases وهي من الإنزيمات المؤكسدة للفينولات Phenol oxidases التي تؤثر على العديد من المواد الفينولية ولها أدوارا متعددة في الفعاليات الحيوية .

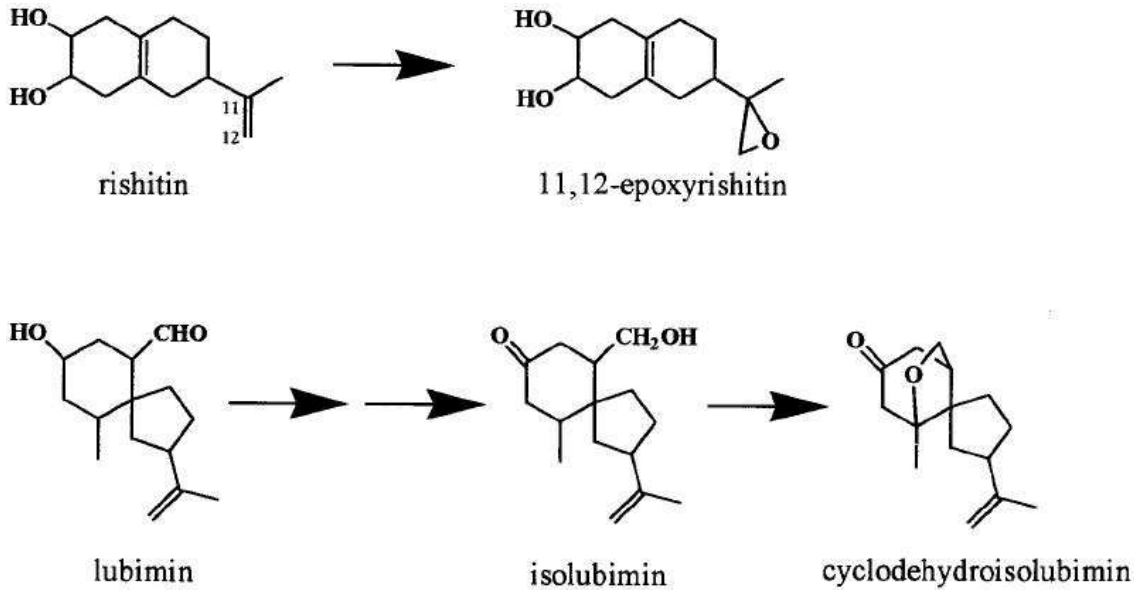
♦ دواحر البطاطا : تنتج البطاطا عددا من الدواحر للحماية مثل Solavtivone , Lubimin , Rishitin التي تتجمع عند إصابة الدرنات بالفطريات ، والفطريات المسببة للإصابة تكون متحملة لتراكيز عالية من Lubimin و Rishitin اذ تقوم بتفكيكها الذي يمكن ان يمثل احد آليات التحمل ، وعملية التفكيك موضحة في الشكل (66) .

ويلاحظ من الشكل ان نواتج التفكك لا تزال سامة لذلك تستمر الفطريات المتحملة باستمرار تفكيكها

♦ دواحر العائلة الصليبية

ينتج عدد من أفراد العائلة مركبات مثبطة للفطريات الممرضة منها المركب - Thiazoyl substituted indole camalexin وهو المشابه للمبيد الفطري Thiabendazole المستعمل لمكافحة الإصابات الفطرية . وتوجد المركبات بتركيز محدودة في أوراق النباتات السليمة ولكنها تزداد عند الإصابة ، والفطريات الممرضة يمكن ان تفكك هذه المركبات .

وتنتج النباتات المزروعة مثل *Brassica rapa* , *B. napus* دواحر اخرى تحوي على الكبريت تنتمي الى عائلة Brassinin بعد الإصابة بالمرضات ومنها Cyclobassinin , Brassilexin , Brassicanal ويمكن للفطريات الممرضة التغلب على هذه المركبات .

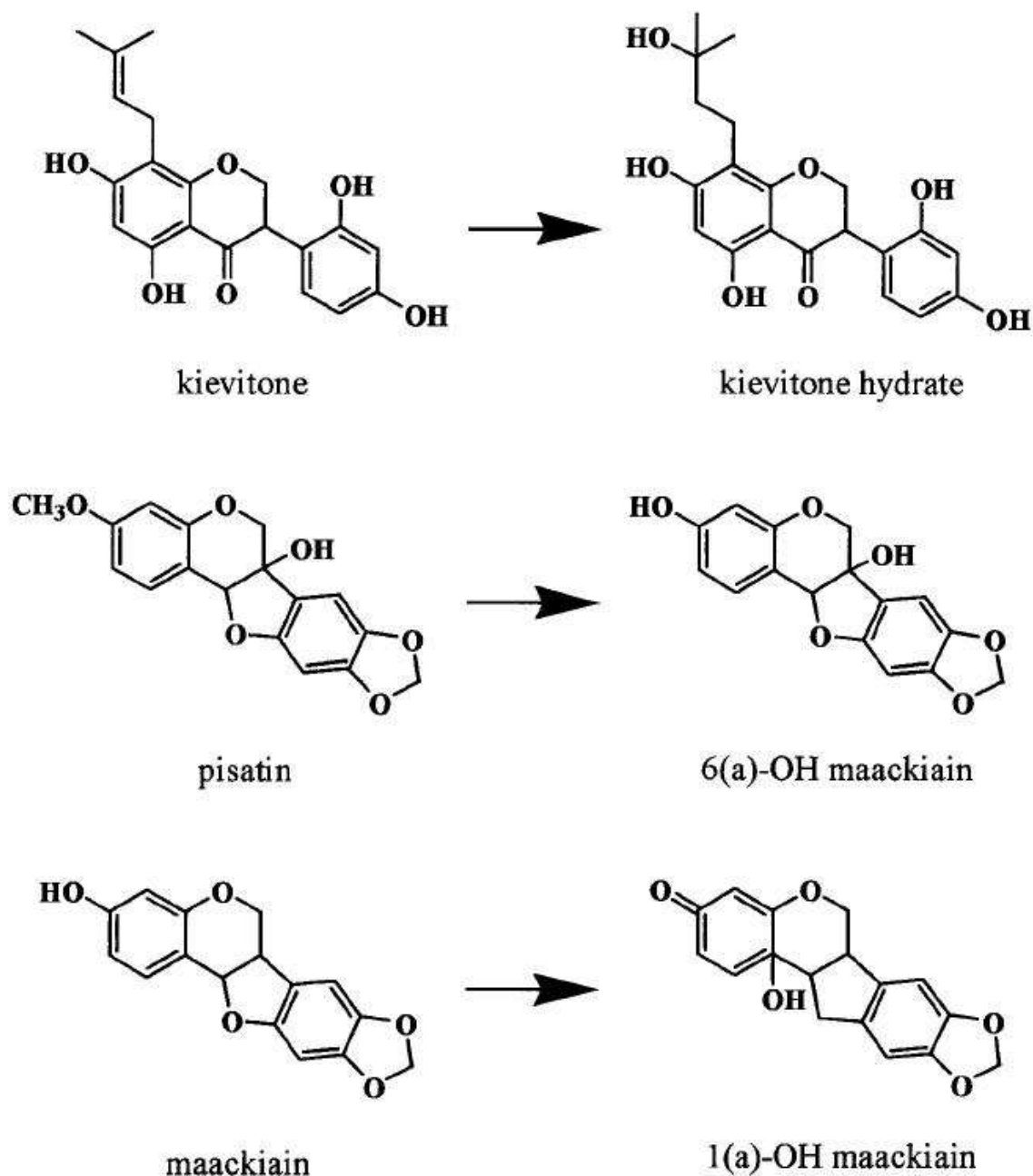


شكل 66 : بعض دواحر البطاطا وتفكيكها من قبل الفطريات المقاومة

♦ دواحر البقول

تنتج البقوليات عددا من المواد التي تقاوم الفطريات ومنها Phaseollidin , Kievitone وهي دواحر من مجموعة المركبات Isoflavonoids التي تنتج من الفاصوليا ، ويمكن ان تفكك وتزال سميتها بواسطة الفطر *Fusarium solani* باستعمال إنزيمات Hydratases مما يشير الى علاقة هذه الدواحر بمنع الأمراض .

ومن دواحر البقوليات المهمة Pistatin في البازاليا و Maackiain , Medicago وهي ايضا من Isoflavonoids . والفطريات المقاومة يمكن ان تدمر هذه الدواحر بعمليات ايضية مختلفة كما موضح في الشكل (67) .



شكل 67: بعض دواحر البقوليات وتأثير الفطريات الممرضة في تفكيكها

آليات مقاومة الفطريات

الدواحر النباتية التي ذكرت اعلاه والتي يمكن ان تستعمل كمبيدات حيوية يمكن للفطريات التي تهاجم النباتات مقاومتها بعدة آليات ذكر بعضها اعلاه ولكن توجد الآليات اخرى منها :

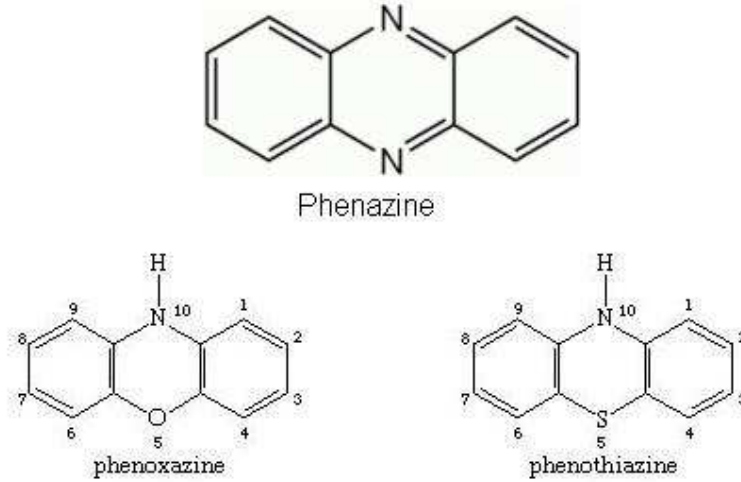
◆ تستعمل الفطريات الدفع الى خارج المايسليوم بالاعتماد على الطاقة ووجود مضخات كما هو الحال في مقاومة البكتريا ومنها ناقلات ABC التي توجد في العديد من الفطريات الممرضة للنباتات . وهي بذلك تشابه آلية المقاومة المتعددة للأدوية .

◆ قد تكون الأهداف غير موجودة في الفطريات الممرضة وبالتالي تظهر المقاومة .
ويمكن للفطريات ان تستعمل آليات المقاومة المختلفة التي نوقشت سابقا .

وعمليا تنتج بعض من المبيدات الحشرية النباتية التي تستخرج من نبات Neem (*Azadirachta indica*) او ما يسمى بنات الزهر السام الذي يستعمل لصيد السمك ، اضافة الى انتاج مبيدات Pyrethroids من نباتات الداودي او الأقحوان في أفريقيا .

المبيدات البكتيرية

وهذه المبيدات تكون مؤلفة من الخلايا البكتيرية كمادة فعالة او منتجاتها مثل السموم . ومن الأجناس المنتجة والمستعملة جنس *Pseudomonas* ، تنتج عددا من المبيدات او المضادات للفطريات . والسلالات المنتجة هي التي تستعمر جذور النباتات من جنس *Pseudomonas* و *Burkholderia* وهذه الاحياء لها علاقة بالسيطرة الحيوية وتنتج بعض المواد مثل الموضحة في الشكل (68) .



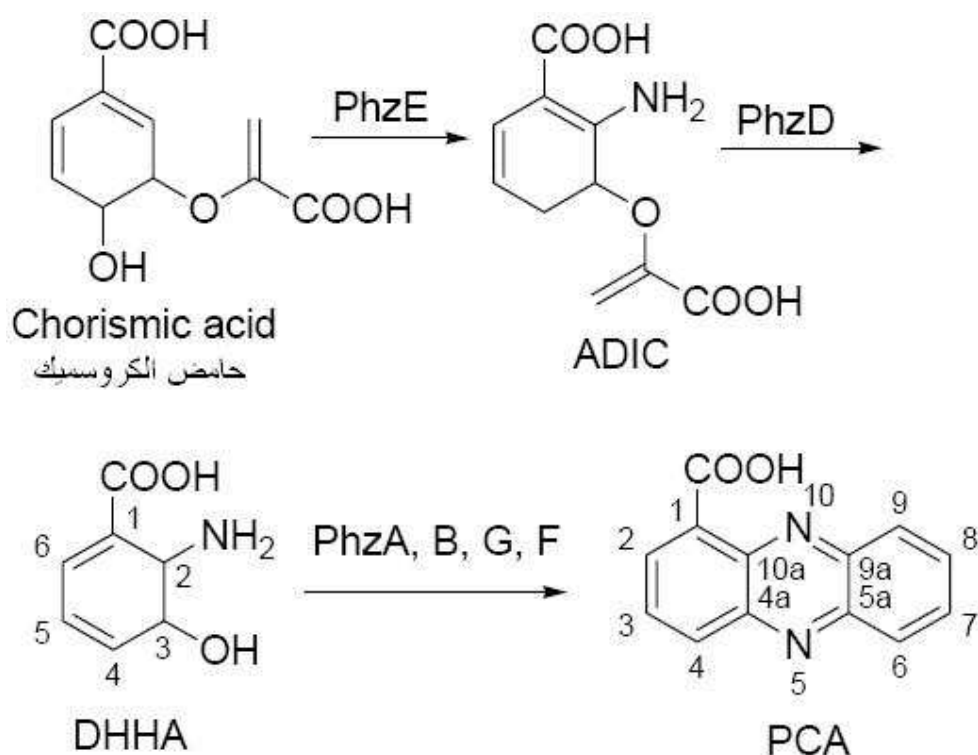
شكل 68 : بعض مشتقات Phenazine المنتجة من بكتريا *Pseudomonas*

وهذه المواد تساعد البكتريا في التنافس مع الاحياء الأخرى في المنطقة المحيطة بالجذر والغنية بالإفرازات المغذية . والمواد المنتجة ذات أوزان جزيئية واطئة واغلبها مضادة للفطريات . وهذه الاجناس تعد مصادرا غنية لإنتاج بعض المواد الكيميائية المستعملة في مجال السيطرة الحيوية ، والبكتريا تحوي على Phenazine operon الذي يساهم في انتاج العديد من المركبات التي يمكن ان تستعمل كمبيدات كما موضح في الشكل (69) .

وتم التعرف على الجينات المسؤولة عن تخليق Phenazine ومشتقاته (الموضحة في الشكل 69) وكذلك مسارات تخليقها ويعمل في المسارات نوع من إنزيمات الهدرجة Hydrogenases .

واستعملت عمليات التطهير لإنتاج طفرات تنتج كميات كبيرة للسيطرة الحيوية ، اذ تم الحصول على طفرات من البكتريا *Myxococcus fulvus* , *Burkholderia spp* , *Ps. pyrocinia* لاننتاج المبيد الحيوي Pyrrolnitrin (PRN) بكميات كافية للاحتياج التجاري .

ويؤثر PRN على مدى واسع من الفطريات الممرضة التي تعود الى أصناف الفطريات الناقصة والفطريات الكيسية والبازيدية . وقد طور المركب ليستعمل كمضاد فطري للإصابات في الإنسان ، اضافة الى استعماله كمادة أساسية لاشتقاق مضادات جديدة . ولكن المشكلة مع المضاد انه حساس بشكل كبير لضوء الشمس ولذلك أجريت عليه التحويلات الكيماوية لزيادة ثباته للضوء وكذلك زيادة فعاليته .



ADIC : Aminodeoxyisochorismate

DHHA : trans-2,3-dihydro-3-hydroxyanthranilic acid

PCA : phenazine-1-carboxylate

الجينات المشاركة في عمليات التحول PhzA, B, G, F, E

شكل 69 : التحويلات الحيوية لإنتاج مشتقات phenazine التي يمكن ان تستعمل كمبيدات

وتستعمل خلايا *Pseudomonas* كمضادات لأحياء أخرى مثل *Ps. fluorescens* BL15 التي تؤثر على الفطر المرضي *Rhizoctonia solani* ، والبكتيريا تنتج المركبات الموضحة في الشكل 68 إضافة إلى إنتاجها سيانيد الهيدروجين HCN والإنزيمات المحللة للكايتين والجيلاتين . وتستعمل البكتيريا *Ps. syringae* var *tagetis* (PST) في مكافحة الأدغال اذ تسبب شحوب القمم للمضاييف التي تصيبها والتي تضم أنواعا وأجناسا مختلفة من الأدغال ، وتستعمل بطريقة الرش في محلول مائي يحوي على السليكون العضوي .

بكتيريا *B. thuringiensis* (Bt)

تعد من أهم المبيدات البكتيرية المنتجة على نطاق تجاري والأكثر استعمالا ففي عام 1995 وصلت مبيعاتها إلى 90 مليون دولار مشكلة 2 % من سوق مبيعات المبيدات الكلي ، ووصل توزيعها إلى 2.3×10^6 كغم .

ومما يشجع استعمالها ان بروتينات Bt غير سامة للطيور واللبائن والبرمائيات والزواحف وإنما تكون مختصة بالحشرات وآفات من اللافقرات . والمبيدات التي أساسها البروتينات البلورية منخفضة الكلفة اذ تصل كلفتها إلى 1 : 40 من كلفة المبيدات الكيماوية . ونظرا لتخصصها فهي تحافظ على الأعداء الطبيعية للحشرات ولذا يكثر استعمالها في الغابات وتستعمل في مكافحة البعوض وأنواع من الذباب التي أصبحت مقاومة للعديد من المبيدات الكيماوية .

بكتيريا Bt موجبة لصبغة كرام تقطن التربة ويمكن عزلها من التربة ومن غبار المواد المخزونة وأوراق النباتات وتشكل فلورا داخلية وطبيعية في العديد من البيئات ، البكتيريا مكونة للابواغ ، متحركة هوائية .

عزل وتشخيص البكتيريا

تعزل البكتيريا من البيئات المذكورة بعد تسخين النماذج للحصول على الابواغ او تتم إجراء خطوات الاغناء بالمعاملة بالخلات او بعض المضادات الحيوية .

تصنف السلالات اعتمادا على مستضدات الاسواط ويوجد حوالي 55 من الضروب المختلفة في مستضدات السوط ، ويوجد 8 سلالات لا تكون الاسواط ، وهذا يشير إلى الاختلافات الوراثية . تدمج بعض الأحيان مع بكتيريا *B. cereus* عند اعتماد الصفات الشكلية المظهرية والصفات الكيموحيوية . اما الطرق الحديثة مثل تحديد توالى 16S rRNA وتهجين DNA الكروموسوم وكذلك تحليل الدهون الفوسفاتية والحوامض الدهنية وخرائط القطع بالإنزيمات للجينوم وغيرها من الطرق الجزيئية تشير إلى أنهم يمكن ان يكونا نوعا واحدا ، كما ان *B. cereus* تظهر تهجين مع المسابر الخاصة بالـ Bt الخاص بأحد السموم البلورية cry 1 A . كما ان كل من *B. cereus* و Bt يمكن

ان تتكاثر في جوف الحشرات مؤدية الى التجرثم Septicemia والاثنان تفرز مضادات حيوية ضد الفطريات والتي يمكن ان تتآزر مع السموم لقتل الحشرات .

عوامل الضراوة

للبكتريا عدد من عوامل الضراوة منها الإنزيمات المحللة للدهون الفوسفاتية والبروتينات والانزيمات المحللة للكايتين وسموم حساسة للحرارة وسموم البتا (β - toxins) وتفرز بروتينات قاتلة للحشرات في طور الخضري .

واهم السموم هي السموم البلورية او المتبلورة (cry toxins) التي تتكون عند التبوغ وتتنظم في تركيب يسمى Paraspore body أثناء طور الاستقرار من دورة نمو البكتريا ويمثل احد عوامل الضراوة ويساعدها في النمو على الحشرات الضعيفة ، ويطلق على السموم أحيانا δ - endotoxins وتصل أوزانها الجزيئية 27 - 140 كيلو دالتون .

وتنتج السلالات المختلفة سموم كثيرة تصل الأنواع المتبلورة منها الى حوالي 140 ، كما ان السلالة الواحدة يمكن ان تنتج أكثر من سم مما يزيد من وسع مضايها ، وهذا يشير الى مرونتها الوراثية وان هناك عمليات تبادل وراثي تحصل عندما تنمو أكثر من سلالة في الحشرة الواحدة ، خاصة وان معظم جينات السموم تقع على بلازميدات اقترانية مما يسمح لهذه الجينات التحرك بين الأنواع .

المضاييف التي تؤثر عليها

كل سلالة من البكتريا تنتج خليط من البروتينات التي تقضي بشكل متخصص على المضاييف الحساسة مثل نوع واحد او أنواع متقاربة من يرقات الحشرات . وهذه السموم أدت الى تطوير مبيدات حشرية حيوية لمكافحة عدة رتب من الحشرات مثل حرشفية الاجنحة Lepidoptera والخنافس Coleoptera وثنائية الاجنحة Diptera وتوجد سلالات تؤثر على غشائية الاجنحة Hymenoptera ومتجانسة الاجنحة Homoptera ومستقيمة الاجنحة Mallophaga ، Orthoptera وكذلك لمكافحة السوس Mites والابتدائيات والديدان والمن Aphids .

ويمكن ان تعمل السموم بشكل متأزر مع الابواغ ، وفي هذه الحالة فان السموم كموا برووتينية تتفكك بسرعة البيئة بينما تبقى الابواغ لعدة سنين في التربة وان كان تعدادها وسميتها تقل نتيجة لتأثير الظروف البيئية .

التركيب الوراثي للبكتريا

تحتوي سلالات البكتريا على جينوم يتراوح حجمه بين 2.4 - 5.7 مليون زوج من القواعد ، وكان مسجلا ان هناك 14 جين مسؤولة عن تخليق السموم ولكن بتطور الدراسات ازداد عدد المكتشف منها فوصلت في نهاية القرن الماضي الى حوالي 100 جين خاص بالسموم . ونظرا لأهمية البكتريا

فقد تم تحديد حوالي 42 سلالة منها . وتشير نتائج تحديد توالي القواعد الى تشابه كبير (على الأقل في النصف القريب لنقطة أصل التضاعف) مع البكتريا *B. cereus* ، ويوجد اختلاف في النصف الثاني .

تحتوي سلالات البكتريا على عناصر لاكروموسومية مثل البلازميدات ، البعض حلقية وأخرى مفتوحة . وبروتينات السم البلوري يشفر لها بواسطة بلازميد كبير اقتراني . وتوجد تواليات في مناطق التشفير للسموم على البلازميد مشابه لمناطق موجودة على الكروموسوم وقد تشارك هذه المناطق الكروموسومية في إنتاج السموم .

العناصر القافزة

تحتوي سلالات البكتريا على عدد كبير من العناصر القافزة منها عناصر إقحام IS وجينات قافزة ، فمثلا الجين المشفر للسم cry 1 A تحيطه تواليات مقلوبة من IS سميت IS231 , IS232 , الأول يعود الى عائلة IS4 والثاني يعود الى العائلة IS21 . وبما ان هذه العناصر يمكن ان تقفز لذلك فمن المحتمل ان تحرك جينات السم معها وتحتوي السلالات على قافزات معقدة Composite transposons . والعنصر IS231 منتشر بكثرة في البكتريا . وتوجد العديد من تواليات الإقحام التي تحيط بالجينات المختلفة ولها تسميات خاصة .

وتحتوي السلالات على جينات قافزة Tn تحوي على الجينات التي تشفر للإنزيمات التي تساعد في الانتقال والاندماج وغيرها من الفعاليات مثل إنزيمات Recombinase , Resolvase , Integrase , ويعتقد ان وجود العناصر القافزة في البكتريا يؤدي ادوارا معينة منها :

- ◆ تضخيم جينات السم في الخلية البكتيرية .
- ◆ تساعد وتتوسط في نقل البلازميدات بآليات مختلفة .
- ◆ لذلك فان العناصر القافزة تساعد في نقل الجينات أفقيا .

التعبير عن جينات السم

الصفة المميزة لهذه الجينات هو التعبير عنها بشكل أساسي في طور الاستقرار من أطوار المجموع البكتري ، وتتجمع النواتج لتكون جسم بلوري التركيب في الخلية الأم والذي تصل نسبته الى 20-30 % من الوزن الجاف للخلايا المتبوعة ، وتتم السيطرة على التعبير باليات مختلفة وعند مراحل او مستويات مختلفة وهي :

- ◆ مستوى الانتساخ .
- ◆ مستوى بعد عملية الانتساخ .
- ◆ مستوى بعد الترجمة .

آلية الانتساخ : بعض الجينات يكون التعبير عنها معتمدا على عملية التبوغ وأخرى غير معتمدة على التبوغ :

الانتساخ المعتمد على التبوغ ، عند الانتساخ وتكون البوغ يشترك عددا من العوامل المنشطة وهي عوامل سيكما التي ترتبط الى RNAP لتوجيه الانتساخ والارتباط بالممهدات الخاصة بعملية التبوغ وهي بداية تعود الى الخلايا الخضرية مثل δ^A وعوامل أخرى هي δ^H , δ^F , δ^E , δ^G , δ^K .

فالعوامل δ^A و δ^H تكون نشطة في الخلايا قبيل الانقسام .

العوامل δ^E و δ^K تكون نشطة في الخلايا الأم .

العوامل δ^E , δ^G تكون نشطة في البوغ الأول المتكون في المراحل الأولى من عملية التبوغ . ويكون تنشيط هذه العوامل معتمدا على المخطط الزمني الذي تمر به عملية تكوين البوغ . فمثلا cry 3 Aa يعبر عنه في أثناء الطور الخضرى وبداية طور الاستقرار ويستمر نشاطه من نهاية الطور أللوغاريتمي الى حين الوصول الى المرحلة الثانية من عملية التبوغ (يراجع الفصل الخامس) ، أي بعد حوالي 3 ساعات ويبقى نشطا الى حين الوصول الى المرحلة الرابعة من عملية التبوغ أي بعد حوالي 7 ساعات . وهو لا يعتمد على عوامل سيكما الخاصة بعملية التبوغ ولكن قد يكون اختفاء δ^A محفزا للتعبير عنه .

آليات التنظيم بعد الانتساخ

ان ثباتية جزيئات mRNA تكون مهمة لإنتاج كميات كبيرة من السم في Bt . فالعمر النصفى للجزيئات mRNA يصل الى 10 دقائق والذي يعادل خمسة أضعاف العمر لجزيئات mRNA العادية ، ومما يؤدي الى ثباتية الجزيئات وجود تواليات Shine – Dalgarno (SD) الثابتة المكونة من التوالي (GAAAGGAGG) والذي يطلق عليها STAB – SD . والثباتية يمكن ان تنتج من تداخل النهاية 3' للـ 16S rRNA مع STAB – SD ولذلك فان الارتباط الى وحدة الرايبوزوم الصغيرة 30S يساعد في حماية mRNA من تأثير الإنزيمات الحالة Ribonucleases ويوجد STAB – SD في مواقع مختلفة من الجينات وتقوم بإضفاء الثباتية على منتجاتها .

آليات التنظيم بعد الترجمة

بعد تخليق السموم تنتظم في بلورات لغرض حمايتها من التعرض للإنزيمات المحللة للبروتينات ، وتكون البلورات المتكونة داخل الخلية الأم بأشكال مختلفة اعتمادا على تركيب السم الأولي Protoxin ، والأشكال اما ان تكون هرمية مثل cry 1 او مكعبة الشكل cry 2 او مستطيلات مفلطحة cry 3A ، او تتخذ إشكال غير منتظمة مثل cry 3B او أشكال كروية كما في cry 4B ، cry 4A او أشكال معينة cry 11A .

ان عملية تكوين البلورات تعتمد على تركيب بروتين السم ووجود الطاقة والأواصر الكبريتيدية الثنائية ووجود بعض المركبات الخاصة ، فعند كثرة ثملات السستيين في النهاية الكربوكسيلية لبروتين السم فانها تساعد في تكوين التركيب البلوري عند تكوين الاواصر الكبريتيدية الثنائية . اما عند غياب المناطق الحاوية على السستيين فان السم يكون تراكيب مفلطحة او غير منتظمة كما في السم cry 3A ، اذ لا ترتبط فيه البيبتيدات المتعددة بأواصر S=S . وتساهم الجسور الملحية في تكوين التراكيب البلورية . إضافة الى احتمال وجود بعض البروتينات تقوم بتثبيت السلاسل البيبتيدية للسم الأولي بعد ترجمتها وتساعد في تكوين التراكيب البلورية .

بعض السموم تفرز الى الوسط المحيط مثل cry IIa ويفرز أثناء التبوغ كما يحصل في افراز بعض سموم أنواع Clostridia وقد تكون له أهمية بيئية ، اما الباقي فتبقى داخل الخلايا .

تركيب وأصناف السموم ووظائفها

تتكون السموم من سلاسل وحلزونيات طويلة من الحوامض الامينية تكون ذات طبيعة كارهة للماء ويكون امفوتيري او ذات طبيعة كيميائية هجينة وتكون مكونة من عدة أجزاء Domains ويعتقد ان الجزء الأول بالصفات المذكورة هو المسؤول عن تكوين الثقوب في أغشية الخلايا التي يصيبها ، وتظهر السموم شبيها بسم الخناق و Colicin A ولكن قليلة الشبه بالسم A للبكتريا Pseudomonas .

ويوجد تشابها كبيرا في الجينات المسؤولة عن تكوين السموم في السلالات التي تم تحديد توالي جينوماتها . ويوجد حوالي 13 نوع من السموم البلورية الرئيسية Crystal proteins وعدد قليل او واحد له قابلية التحلل الخلوي Cytolytic (cyt) . وقد قسمت الجينات والبروتينات التي تنتجها الى أربعة مجاميع اعتمادا على التشابه في التركيب ومضاييف الحشرات التي تصيبها البكتريا وهي :

الصف الأول Class I ويكون خاصا برتبة الحشرات حرشفية الاجنحة .

الصف الثاني Class II ويكون خاصا برتبة الحشرات ثنائية الاجنحة .

الصف الثالث Class III ويكون خاصا برتبة الخنافس .

الصف الرابع Class IV ويكون خاص برتبة الحشرات ثنائية الاجنحة .

ويوجد سم إضافي لبروتين بلوري يعمل على تحلل الخلايا cytA يؤثر في عدد من خلايا الفقريات واللافقرات وله وزن جزيئي 27 كيلو دالتون وهو لا يشبه الأنواع الأخرى من الناحية التركيبية (كما ذكر اعلاه) .

الصف الأول cry I

يوجد حوالي 20 جين ضمن هذا الصف تنتج بروتينات بحدود 130 – 140 كيلو دالتون ، تتجمع بشكل بلورت هرمية أثناء عملية التبوغ . وهي سموم أولية تذوب في السائل القاعدي للأمعاء

الحشرة وتحول الى سم فعال بتأثير بروتينات أمعاء الحشرة ذات الوزن الجزيئي 60 – 70 كيلو دالتون ويمكن لهذه السموم البروتينية ان تحول خارج الجسم الحي باستعمال عدد من الإنزيمات المحللة للبروتينات .

الجزء الفعال من السم يقع في النهاية الامينية للبروتين (في اغلب السموم) ويكون موقع الانفلاق بالبروتينات ثابت لعدد من السموم مثل cryIA , cryID . وسمية البروتينات الناتجة من تحلل البروتينات البلورية تعتمد على مصدر الإنزيمات المحللة للبروتينات التي تنتج التركيب السام . اما الطرف الكاربوكسيلي للسم فيكون حاويا على السستئين ويقوم بإضفاء الثباتية على السم بتكوينه للجسور الكبريتيدية الثنائية ويضفي قابلية الذوبان غير الطبيعية لذلك يعتقد ان الطرف الكاربوكسيلي يكون مسؤولا عن التركيب البلوري . وبعض البلورات يمكن ان تحوي على أكثر من سم او بروتين . وهناك عددا من السلالات تستطيع إنتاج عددا من البروتينات البلورية في الوقت نفسه .

الجينات المسؤولة عن تخليق السموم موجودة على بلازميد اقتراني كبير لذلك فان الجينات يمكن ان تتحرك بين السلالات المختلفة للبكتريا . وعملية التحرك تكون نتيجة لوجود تواليات الاقحام والجينات القافزة . وقتل الحشرات يمكن ان يتم بمساعدة بعض السموم الخارجية مثل β - exotoxins وبعض مكونات البوغ القاتلة خاصة عند استعمال مستحضرات خام تحوي الابواغ . والسموم الخارجية الخاصة برتبة حرشفية الأجنحة يمكن ان يحصل تداخل في فعاليتها وذلك لوجود تشابه من الناحية التركيبية .

الصنف الثاني cryII

بروتينات بحدود وزن جزيئي 65 كيلو دالتون وتكون بشكل بلورات مكعبة تنتج من العديد من سلالات Bt وتكون متخصصة في تأثيرها على الرتبة ثنائية الأجنحة و حرشفية الأجنحة ، ويوجد منها نوعان cryII A , cryII B وهذه البروتينات تكون ذات شبه عالي من ناحية الحوامض الامينية المكونة لها الا إنهما يختلفان في المضايغ التي تؤثر عليها ، فالنوع A يؤثر في الربتين المذكورة ، اما B فيؤثر في حرشفية الأجنحة فقط .

الصنف الثالث cry III

سموم الصنف متخصصة في التأثير على رتبة الخنافس وينتج من عدد من سلالات البكتريا ، تكون السموم بشكل تراكيب بلورية معينة الشكل تحوي عادة على بروتين واحد . تنتج البروتينات بوزن جزيئي 72 كيلو دالتون ثم يحول الى وزن جزيئي 66 كيلو دالتون بتأثير بروتين مرتبط ببوغ البكتريا ليزيل 57 من الحوامض الامينية عند النهاية الامينية من البروتين .

الصنف الرابع cryIV

تكون سامة لرتبة ثنائية الأجنحة ، ويحوي الصنف على مجموعة غير متجانسة من البروتينات المتخصصة لقتل أفراد الرتبة . الجينات المسؤولة عنها موجودة على بلازميد كبير بحجم 72 ميكا قاعدة ، وتوجد عدة جينات كل واحد يشفر لبروتين يختلف عن الآخر بالوزن الجزيئي ، يحوي الصنف على عدة سموم منها A وهو بروتين بوزن جزيئي 135 ، B بروتين بوزن جزيئي 128 كيلو دالتون ، C بروتين بوزن جزيئي 78 كيلو دالتون ، و D بروتين بوزن 72 كيلو دالتون ، هذه البروتينات تتجمع مع بروتين آخر بوزن جزيئي 27 كيلو دالتون وهو ناتج السم المحلل cytA لتكوين تركيب بيضوي . وتعمل السموم ضد بعض يرقات أنواع البعوض ايضا ، ويمكن للسموم ان تعمل بشكل متأزر للوصول الى أفضل سمية وتتركز سمية البروتينات في الطرف الاميني من البروتين كما هو الحال مع باقي السموم

السم المحلل cytA

وهو بروتين بوزن جزيئي 27 كيلو دالتون يؤدي الى تحلل الخلايا لعدد من الفقرات واللافقرات ومنها خلايا اللبائن .

سموم الخلايا الخضرية

مجموعة من السموم التي لها علاقة بالسموم البلورية المرافقة للبوغ تنتج من قبل عدد من السلالات أثناء النمو الخضري وتسمى VIPs ويمكن ان تتداخل مع السموم البلورية التي تنتج أثناء النمو او الطور الخضري وطور الاستقرار وأطوار التبوغ وخاصة cry 3Aa . ويمكن ان توجد جيناتها على البلازميد الذي يحمل جينات السموم البلورية ومن أهمها :

Vip 1A وهو بروتين بوزن جزيئي 100 كيلو دالتون عند إنتاجه ولكنه يعالج لينتج بروتين بوزن جزيئي 80 كيلو دالتون عند الإفراز ويكون ساما ليرقات الديدان التي تصيب جذور الذرة . تسلسل حوامضه الامينية مشابه لمستضد الحماية في عصيات الجمرة الخبيثة *B. anthracis* .

Vip 2A وتقع جيناته الى يسار Upstream جينات النوع أعلاه .

Vip 3A بروتين بوزن جزيئي 88 كيلو دالتون وينتج أثناء النمو الخضري ولا يتعرض لعمليات معالجة أثناء إفرازه ، فعال ضد عدد من الحشرات من رتبة حرشفية الأجنحة ، اذ يسبب شلل القناة الهضمية (Gut) ويحلل الخلايا الطلائية لأمعاء الحشرة عند تناوله ، وجيناته شائعة في *Bt* وكذلك في *B. cereus* .

آلية تأثير السموم

السموم قاطبة تؤثر على الجهاز الهضمي لليرقات بشكل خاص التي تعد اكثر اطوار الحشرات ضررا . تؤدي السموم الى اضطراب الخاصية التنافذية للخلايا الطلائية في الامعاء . وأكثر البروتينات

البلورية تكون بشكل سم أولي ثم تتحول الى بيبتيديات سامة بتأثير بروتيازات الامعاء مثل Chymotrypsin – like enzyme , Trypsin – like enzyme . اذ يذوب البروتين مطلقا لب السم الذي يمثل الجزء الفعال . والاختلافات في امعاء اليرقات الحشرية تؤثر على تحول السم الأولى الى سم فعال ، ويمكن إذابة السم ليصبح فعالا في الحشرات التي لا تستجيب له ، ولذلك فان عملية تنشيط السم تعتمد على مصدر الإنزيمات المحللة له ، فبعض الانزيمات تعطي مشتقات للسم قد لا تجد لها مستلمات على سطوح الخلايا . كما ان المستلمات على سطوح خلايا أمعاء الحشرات تختلف من نوع الى اخر وهذا ما يؤدي الى تخصص السم في تأثيره .

ومن مستلمات السموم هي بروتينات Amino peptidases المختلفة وكذلك Alkaline phosphatases وغيرها . ويدخل السم الى أغشية خلايا امعاء الحشرة عن طريق الأجزاء الكارهة للماء ، وهي الطرف الاميني من السم ، ويدخل البروتين بشكل يشبه المظلة ثم يفتح داخل الغشاء ليتداخل مع الأغشية الخلوية ، وتشارك الأجزاء الامفوتيرية مع الأجزاء الكارهة للماء في عملية الدخول . وتتم عملية التسمم التي تلي ابتلاع اليرقة للسم بخطوات :

- إذابة البروتين البلوري في المحيط القاعدي لأمعاء الحشرة .
 - هضمه لإنتاج البيبتيديات الفعالة .
 - ارتباط السم الفعال الى مستلمات على سطوح خلايا الامعاء ، وتكون سموم Bt ذات ألفة عالية للارتباط على مستلمات السطوح الخلوية .
 - إقحام السم في الأغشية الخلوية لتكوين قنوات او ثقب تخرج منها الايونات والمواد الخلوية .
- وعملية ارتباط السم الى الخلايا الحساسة له تكون خلال المستلمات وتكون على مرحلتين ، الأولى قابلة للرجوع لذلك تستهدف عمليات تحسين Bt وسمومها إيجاد تراكيب او طفرات تنتج بروتينات ترتبط بشكل غير قابل للرجوع ، وذلك لان الارتباط غير القابل للرجوع يكون مرتبطا بزيادة السمية إضافة الى زيادة الألفة الأولية للارتباط . اما المرحلة الثانية فتكون غير قابلة للرجوع وهي ناتجة من الارتباط القوي للسم وإقحامه في الغشاء الخلوي وبذلك يصبح السم غير حساس للبروتينات او التأثيرات الاخرى . بعد ذلك يقوم السم بتكوين قنوات في الاغشية ويكون قطر الثقب معتمدا على تركيز السم ، اذ ان التراكيز العالية تؤدي الى انتاج ثقب كبيرة القطر (0.5 – 1 نانومتر) وتزيد من تسميم الخلايا . وهذه العملية تكون معتمدة على الرقم الهيدروجيني في البيئة المحيطة ، فعند رقم هيدروجيني 9.5 تتكون قنوات لنقل الايونات موجبة الشحنة ، اما عند رقم هيدروجيني 6 فتتكون قنوات لإخراج المركبات السالبة الشحنة وتكون القنوات بأقطار مختلفة 8 – 120 وهي في جميع الأحوال اقل قطرا من قنوات الايونات الموجبة التي تصل الى 100 – 200 ، ويحصل انخفاض للرقم الهيدروجيني بشكل تلقائي نتيجة لتحلل الخلايا . وهذا يعني ان تكون الثقب يؤدي الى خروج الايونات

ودخول الماء وفي النهاية الى انتفاخ الخلايا وانفجارها مما يؤدي بدوره الى صوم اليرقات وانقطاعها عن التغذية ثم الموت .

ونظرا لسرعة تأثير السم فهذا يشير الى عدم الحاجة لدخول السم الى داخل الخلية لإظهار السمية . وقد وجد انه عند استعمال سم نقي على مزارع خلايا حساسة فانه يؤدي بشكل خاص الى منع نقل الحامض الاميني الهستيدين بواسطة تدرج البوتاسيوم K^+ gradient وهي متوافقة مع الطرح أعلاه . كما ان تأثير السم يمكن ان يوقف او يؤخر بإضافة الحاميات التنافذية .

العوامل المؤثرة على سمية البروتينات

تتأثر فعاليات السموم بعدد من العوامل منها :

- عمر اليرقة .
- تغذية اليرقة .
- التغيرات الطبيعية في مجاميع الحشرات .
- نوعية وتركيبه Formulation للمستحضر المستعمل .
- الظروف البيئية .

تطوير سموم Bt

تعاني السموم من بعض نقاط الضعف وتجري الدراسات للتقليل منها وذلك بالاعتماد على ان جينات السموم تقع على البلازميدات التي يسهل تحريكها ، ومما يزيد من الإمكانات ان البلازميدات لها إشارات مختلفة وقد لا تعتمد في التنظيم على عمليات التبوغ . ومن المشاكل التي تعاني منها السموم :

- ضيق المضاييف التي تعمل عليها السموم لذلك المحاولات جارية لتوسيع المضاييف بإدخال جينات إضافية اليها بعمليات :

◊ الاقتران خاصة وان اغلب جينات السموم هي على بلازميدات اقترانية ويمكن استعمال النواقل المكوكة .

◊ استعمال طرق أخرى لإدخال الجينات مباشرة مثل استعمال النثقيب الكهربائي وغيره من الطرق .

- سموم Bt تكون غير ثابتة او ذات ثباتية محدودة ، لذلك يفضل إدخال الجينات الى احياء مرتبطة بالنبات وقد أمكن إدخال الجينات الى بكتريا موجودة على النباتات او ذات علاقة بها مثل إدخال الجينات الى كروموسوم *Ag. radiobacter* , *Ps. fluorescens* التي أظهرت كفاءة عالية في

القضاء على بعض الحشرات . والجينات المدخلة الى احياء أخرى يمكن ان تربط الى كروموسوماتها او الى البلازميدات .

وقد أمكن بعمليات التحويل الوراثي إنتاج سموم Bt غير الموجودة في الطبيعة وذات فعالية عالية ضد الحشرات اضافة الى علو إنتاجها وذلك بتطوير سلالات من Bt باستعمال كل الوسائل المتوفرة للتحويلات الجزيئية ، كما أمكن إنتاج سلالات من Bt تنتج السموم دون ان تنتج الابواغ .

• يمكن زيادة فعالية السموم وذلك باستعمال خليط منها لان السموم تتأزر فيما بينها وكذلك تتأزر مع الابواغ ولذلك تعد خلطات المبيدات من مزارع نمو البكتريا الحاوية على السموم والابواغ .

• السموم حساسة للضوء لذلك تم معالجة هذه المشكلة بإنتاجه في *Ps. fluorescens* باستعمال جينات ذات اصول مختلفة Chimeric genes بعمليات التخمير ثم قتل الخلايا لتعمل بمثابة محافظ للسم الذي يبقى في الخلية المنتجة .

• وللمساعدة في بقاء السم في المواقع التي يستعمل فيها يمكن إدخاله في بكتريا من تلك الموجودة على سطوح النباتات او الاحياء من الفلورا الداخلية ، ونظرا لكون هذه الاحياء مرتبطة بعلاقات وثيقة مع النباتات فإنها تهيأ الفرصة لبقاء السم لمدة طويلة لزيادة الحماية ضد الحشرات ، ومن الاحياء التي هندست لهذه الأغراض *Ps. fluorescens* , *Rhizobium* , *Ps. cepacia* , *Azospirillum* , *leguminosarum* وقد أمكن نقل الجينات لأحياء تعيش في البيئات المائية مثل *B. sphaericus* و *Caulobacter crescentus* لمكافحة البعوض . وكذلك نقلت الى أنواع من البكتريا المزرقة مثل *Synechococcus* , *Agmenellum quadruplicatum* .

ولكن الهندسة الوراثية لا تكون ناجحة دائما ، ولذلك تم اللجوء الى تحويل الجينات وهي داخل الخلايا دون إدخال جينات غريبة عليها مثل اجراء عمليات الحذف او الإضافة او تبادل كروموسومي ولكنها كما ذكر لا يمكن ان تؤدي الأغراض المطلوبة دائما .

ومن المبيدات المسوقة والمحضرة بطرق الهندسة الوراثية *Foil bioinsecticide* ضد حشرات رتبة *Coleoptera* وحضر من السلالة EG2424 . Bt يحوي المبيد على بروتينات مهندسة وراثيا وهذه السلالة أظهرت قابلية لفقد البلازميد عند إعادة دورة التبروغ ، وهذا لا يلاءم العملية الإنتاجية ولكن قد يكون مفيدا من الناحية البيئية اذ يمكن استعمال السلالة بشكل مؤقت ثم يختفي البلازميد من المجموع البكتري .

ولا يزال البحث جاريا لاكتشاف سلالات جديدة يمكن ان تنتج سموم غير المعروفة .

هندسة النباتات

نظرا لبعض جوانب القصور المذكورة أعلاه قد يكون من المفيد هندسة النباتات لتقوم هي بإنتاج السموم . اذ ان هذه تمثل وسيلة مهمة او بديلة لحماية النباتات من التأثير المدمر الذي تسببه الحشرات .

وبهذه الطريقة سيتم إنتاج السم بشكل مستمر ويقاوم لمدة طويلة في بيئة أنسجة النبات وسيساعد في التقليل من استعمال المبيدات وبالتالي تقليل الكلفة . كما انه سيكون اقل تأثيرا في البيئة ولا يؤثر على الاحياء المفيدة مثل المفترسات والطفيليات الخاصة بالحشرات . ووجوده في النبات سيهيئ الفرصة لقتل حشرات وديدان أخرى تغطى النبات من غير المخطط لمكافحةها .

وبدأ بإنتاج النباتات المحورة وراثيا في بداية تسعينيات القرن المنصرم . واستعملت البكتريا *Ag. tumefaciens* لعملية نقل الجينات ، اذ وضعت (بداية) جينات السموم أمام مهده نباتي وادخلت الى البكتريا المستعملة في النقل ، وأمكن تطوير نباتات تبغ محورة وراثيا مقاومة للحشرات . ان عملية نقل الجينات من البكتريا تصطدم بالعديد من المشاكل وحصيلتها ان يكون التعبير عن الجينات واطئ جدا . وذلك لان جينوم Bt يكون غنيا بـ A : T وهذا يمكن ان يؤثر سلبا على التعبير عن الجينات في النبات بتأثيره على :

- مواقع تعديل نسخ RNA الناتجة (Splicing sites) .
 - يؤثر على مواقع إضافة الأدينين (Poly(A) addition sites) .
 - يؤثر على الإشارات الخاصة بتفكيك mRNA .
 - يؤثر على مواقع انتهاء عمليات الانتساخ Transcription termination sites .
- إضافة الى وجود التحيز في استعمال الشفرات الوراثية للحوامض الامينية التي تكون بعيدة عن تلك التي تفضلها الخلايا النباتية ، وللتغلب على هذه المشكلة يمكن تحويل الشفرات المتماثلة Synonymous codons لتقليل او إلغاء تأثير التواليات وخلق تحيز في الشفرات بحيث يكون مشابه أكثر لما موجود في النباتات . وهذا يؤدي الى زيادة التعبير عن الجينات البكتيرية في النباتات .
- وقد استعملت ممهدات نباتية أكثر كفاءة في عمليات الكلونة مثل استعمال ممهد الفيروس الذي يصيب القرناييط بمرض التبغ الموزائيكي Cauliflower mosaic virus (CMV) الذي استعمل في تحويل نباتات الطماطة ، وكذلك استعمال ممهدات فيروسات تصيب ألج Alfalfa mosaic virus لهندسة نباتات التبغ بغية الحصول على نتائج أفضل .

واستعملت تقنيات مختلفة لإدخال الجينات مثل القصف السريع High velocity projectiles خاصة مع النباتات ذوات الفلقة الواحدة مثل الذرة التي لا يمكن تحويلها بـ *Agrobacterium* ، ومن المتوقع في هذا المجال ان يكون التعبير عن الجينات البكتيرية في البلاستيدات أفضل .

وكان حصىلة الجهود تسويق بطاطا وقطن حاوية على جينات Bt عام 1996 . ولكن تبقى المشكلة التقليدية في تقبل الأحياء المهندسة وراثيا والخوف من تسرب الجينات الى الأنواع الطبيعية الأخرى ، اذ يمكن ان يحصل تضريب طبيعي بين الأنواع المتقاربة مثلما حصل مع تضريب *Brassica napus* حاوي على جينات السموم مع أنواع طبيعية للعائلة نفسها وانتقلت إليها الصفات بشكل جيد . ولذلك فمن المحتمل ان تنتقل الصفات الى الأنواع غير المرغوب فيها وتؤدي إلى نتيجة عكسية .

مقاومة الحشرات

تعد الحشرات من انجح الأحياء على الأرض نظرا لقابليتها العالية على التأقلم مع الظروف الطبيعية والمستجدة في بيئتها . وعدم تسجيل مقاومة لسموم Bt منذ عشرات السنين من الاستعمال يعود الى ان السم لا يدوم طويلا في الحقل ولكن هذا الوضع قد يتغير بشكل كبير عند هندسة النباتات وانتشارها ولعدة أجيال مما يعني ان الحشرات ستعرض سنويا او موسميا للسم الموجود في النبات وبذلك يشكل السم ضغطا انتخابيا عليها وبالتالي سيؤدي الى نشوء وتطور المقاومة .

ومسألة إطالة التعرض للسم وكونه سببا في نشوء المقاومة سجلت في السلالات المختبرية ففي إحدى التجارب استعمل المبيد Dipel الحاوي على السم cry 1A وهو مستحضر تجاري من البكتريا *Bt ssp kurstaki* ضد الحشرة *Plodia interpunctello* بوضعه في الطعام ، وأدى الاستعمال الأول الى قتل 70 – 90 % من اليرقات ، وبعد جيل ازدادت المقاومة الى 30 ضعف ولكن بعد 15 جيل وصلت المقاومة الى 100 ضعف وبقيت المقاومة ثابتة في الحشرات حتى بعد إبعاد المبيد واستورثت الصفة كصفة متنحية ، وكانت المقاومة في الحشرات المستعملة متخصصة بالسم المستعمل في التجربة وليس السموم الأخرى ، وكانت ناتجة من قلة ألفة ارتباط السم الى المستلمات الخلوية .

وتجارب أخرى مشابهة أشارت الى تطور المقاومة للسم cryI Ab ولكن السلالات المقاومة أصبحت حساسة جدا للسم cryI Ca إذ ازدادت قابلية السم للارتباط الى الخلايا والسم الأخير لم يكن ضمن تشكيلة السموم المستعملة . ونشأت المقاومة أيضا للسم الذي نقل الى البكتريا *Ps. fluorescens* بحيث زادت المقاومة بعد 7 أجيال الى 20 ضعف وفي الجيل الحادي عشر كانت المقاومة قد ارتفعت الى 71 ضعف ، ويمكن حث المقاومة في المختبر الى 1000 – 2000 ضعف . وفي النباتات المهندسة وراثيا مثل نبات التبغ لوحظت المقاومة في يرقات الحشرات التي تصيبه ، اذ تحوي أنسجة النبات على 0.007 – 0.01 % من السم الذائب cry 1Ab . والمقاومة ليس بالضرورة تكون ناتجة عن فقدان قابلية السم للارتباط بالمستلمات الخارجية وانما توجد آليات أخرى . وفي العموم تكون صفة المقاومة في الحشرات صفة متنحية ولو جزيئا . وفي الحقل فان حالات المقاومة المسجلة قليلة خاصة في الحقول المثقلة بالإصابة ، ولكن ما سجل اظهر حصول مقاومة

متداخلة خاصة للسموم التي لها تشابه في توالي الحوامض الامينية في الجزء المؤثر (الطرف الاميني) الذي يرتبط الى المستلم .

وكن المؤمل ان لا تظهر المقاومة في الحشرات لسموم البكتيريا ولكن الزيادة وتكرار استعمال المستحضرات نفسها يؤدي الى ظهور المقاومة .

الوسائل الممكنة لمنع المقاومة

كما ذكر أعلاه ان الحشرات يمكن ان تطور المقاومة للسموم بشكل كبير ولذلك كان لابد من وضع الخطط للتعامل مع هذه المقاومة . وهذه الخطط وضعت بالاعتماد على الدراسات النظرية وبرامج الحاسوب لتحديد وتقييد نمو المجموع الحشري ومنها :

- عند هندسة النباتات يفضل إدخال أكثر من سم على ان تؤثر بأساليب مختلفة للتقليل من احتمالية تطور المقاومة في الحشرات .

كما يفضل ان تدخل الجينات الى أجزاء معينة من انسجة النبات التي تكون اكثر حساسية للإصابة وبذلك تكون اجزاء معينة محمية مثل التعبير عن الجينات في جوز القطن حديثة التكوين كما يمكن ان يصمم النبات المهندس بحيث يعبر عن الجينات تحت ظروف معينة أي وضع جينات السم أمام مهادت مستحثة تعمل عند رش النبات بمواد كيميائية حاثية ، وبذلك يكون للفلاح الخيار في التعبير عن سموم Bt عندما تصل الإصابة الى مستوى من الشدة تكون مدمرة اقتصاديا .

يصمم النبات لإنتاج كميات كبيرة من السم تقضي على الحشرات متباينة الزيجة Heterozygous لان صفة المقاومة كما ذكر اعلاه تكون صفة متنحية .

- استعمال سموم متعددة في عمليات الرش ، لذلك تحضر المبيدات عادة من التخمرات التجارية الحاوية على عدد من السموم والابواغ .

- استعمال الدورات الزراعية وسموم مختلفة من حيث الآلية والمستلمات التي تستعملها وهذا يضخم ظاهرة التآزر بين السموم من حيث التأثير مثل مساعدة السم الحال cyt 1A لتأثير السموم الاخرى .

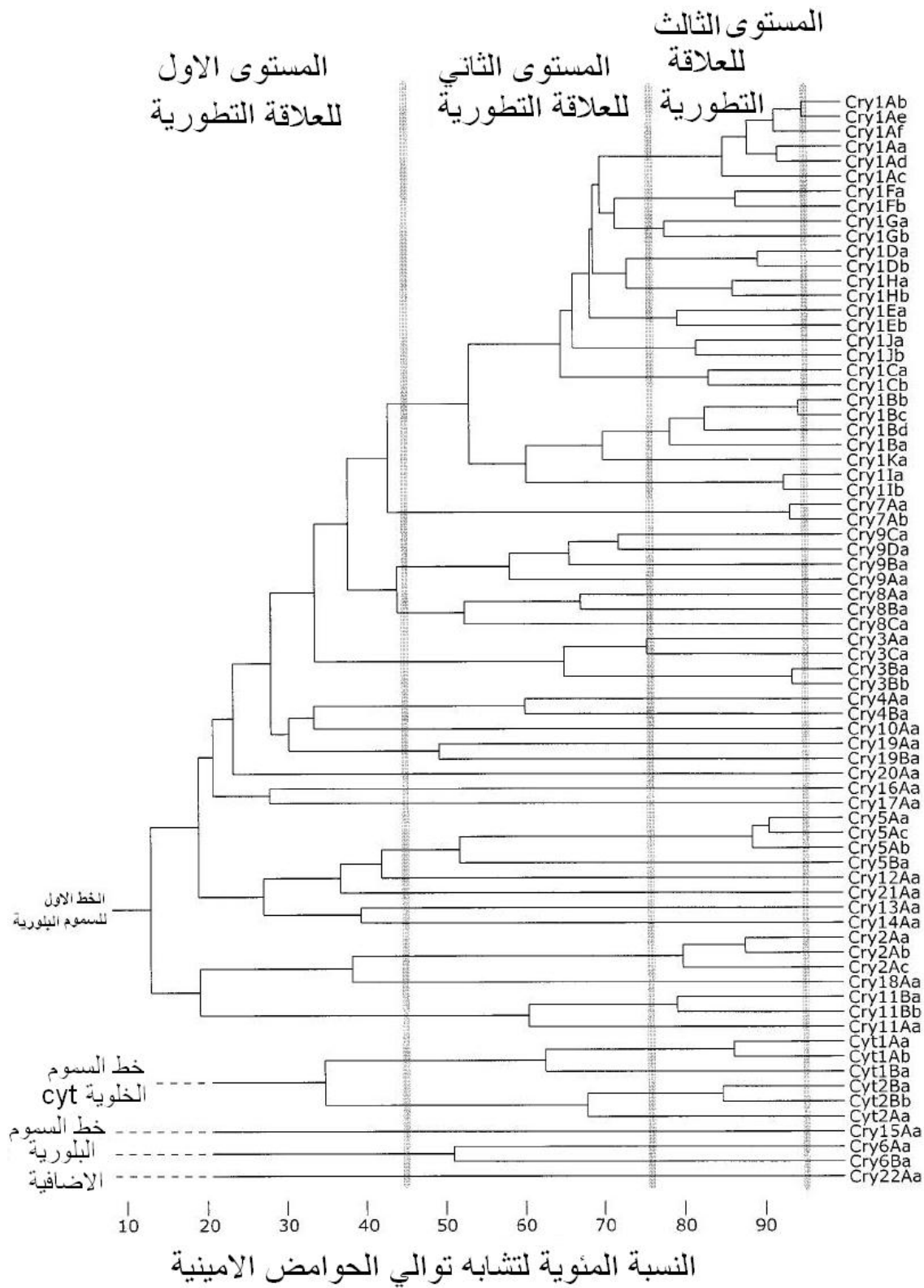
- استعمال تراكيز عالية جدا وهذه تكون مكلفة اقتصاديا خاصة عند استعمال طريقة رش السموم .

- فصل وعزل المناطق المعاملة بالمبيدات الحشرية .

والنقطتان الأخيرة والتي تتضمن استعمال تراكيز عالية مع العزل ستؤدي للقضاء على اغلب الحشرات متباينة الزيجة اما المتبقي ستنزاج مع الحشرات الحساسة من المناطق المجاورة الخالية من السموم ولذلك فان احتمالية نشوء حشرات متجانسة الزيجة يكون بعيد الاحتمال ، أي ان صفة التنحي ستؤخر ظهور المقاومة لعدة أجيال على الأقل .

ومثل هذه الوسائل والمقترحات يجب ان تكون مقبولة بالنسبة للعاملين في المراكز التقنية المزودة للمبيدات وكذلك شركات إنتاج البذور والمشرفين على زراعة المحاصيل والمنظمين لها والفلاحين الذين يقومون بتنمية النباتات لتكون هناك شبكة عمل منسجمة .

التصنيف والتسمية الحديثة للسموم : نظرا لكثرة السموم التي تنتجها Bt وعدم وجود نظام تصنيف وتسمية موحدة وخشية الاختلاط والالتباس قامت الجهات المختصة Bt. Pesticidal Crystal Protein Nomenclature Committee في مركز Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) بإعادة تسمية وتصنيف السموم بالاعتماد على برامج الحاسوب الخاصة بعد وضع العلاقة التطورية للسموم الموضحة في الشكل (70) .



واعتقاد تسلسل الحوامض الامينية في بروتينات السم لتغير التسميات القديمة الى تسميات جديدة
موحدة كما موضح في الجدول (38)

جدول 38 : التسميات الجديدة لسموم Bt

الاسم الجديد	الاسم الاصلي	الاسم الجديد	الاسم الاصلي
<i>cry2Ab2</i>	<i>cryIIB</i>	<i>cry1Aa1</i>	<i>cryIA(a)</i>
<i>cry2Ac1</i>	<i>cryIIC</i>	<i>cry1Aa2</i>	<i>cryIA(a)</i>
<i>cry3Aa1</i>	<i>cryIIIA</i>	<i>cry1Aa3</i>	<i>cryIA(a)</i>
<i>cry3Aa2</i>	<i>cryIIIA</i>	<i>cry1Aa4</i>	<i>cryIA(a)</i>
<i>cry3Aa3</i>	<i>cryIIIA</i>	<i>cry1Aa5</i>	<i>cryIA(a)</i>
<i>cry3Aa4</i>	<i>cryIIIA</i>	<i>cry1Aa6</i>	<i>cryIA(a)</i>
<i>cry3Aa5</i>	<i>cryIIIA</i>	<i>cry1Ab1</i>	<i>cryIA(b)</i>
<i>cry3Aa6</i>	<i>cryIIIA</i>	<i>cry1Ab2</i>	<i>cryIA(b)</i>
<i>cry3Ba1</i>	<i>cryIIIB2</i>	<i>cry1Ab3</i>	<i>cryIA(b)</i>
<i>cry3Ba2</i>	<i>cryIIIB</i>	<i>cry1Ab4</i>	<i>cryIA(b)</i>
<i>cry3Bb1</i>	<i>cryIIIBb</i>	<i>cry1Ab5</i>	<i>cryIA(b)</i>
<i>cry3Bb2</i>	<i>cryIIIC(b)</i>	<i>cry1Ab6</i>	<i>cryIA(b)</i>
<i>cry3Ca1</i>	<i>cryIIID</i>	<i>cry1Ab7</i>	<i>cryIA(b)</i>
<i>cry4Aa1</i>	<i>cryIVA</i>	<i>cry1Ab8</i>	<i>cryIA(b)</i>
<i>cry4Aa2</i>	<i>cryIVA</i>	<i>cry1Ab9</i>	<i>cryIA(b)</i>
<i>cry4Ba1</i>	<i>cryIVB</i>	<i>cry1Ab10</i>	<i>cryIA(b)</i>
<i>cry4Ba2</i>	<i>cryIVB</i>	<i>cry1Ac1</i>	<i>cryIA(c)</i>
<i>cry4Ba3</i>	<i>cryIVB</i>	<i>cry1Ac2</i>	<i>cryIA(c)</i>
<i>cry4Ba4</i>	<i>cryIVB</i>	<i>cry1Ac3</i>	<i>cryIA(c)</i>
<i>cry5Aa1</i>	<i>cryVA(a)</i>	<i>cry1Ac4</i>	<i>cryIA(c)</i>
<i>cry5Ab1</i>	<i>cryVA(b)</i>	<i>cry1Ac5</i>	<i>cryIA(c)</i>
<i>cry5Ac1</i>		<i>cry1Ac6</i>	<i>cryIA(c)</i>
<i>cry5Ba1</i>	PS86Q3	<i>cry1Ac7</i>	<i>cryIA(c)</i>
<i>cry6Aa1</i>	<i>cryVIA</i>	<i>cry1Ac8</i>	<i>cryIA(c)</i>
<i>cry6Ba1</i>	<i>cryVIB</i>	<i>cry1Ac9</i>	<i>cryIA(c)</i>
<i>cry7Aa1</i>	<i>cryIIIC</i>	<i>cry1Ac10</i>	
<i>cry7Ab1</i>	<i>cryIIIC(b)</i>	<i>cry1Ad1</i>	<i>cryIA(c)</i>
<i>cry7Ab2</i>	<i>cryIIIC(c)</i>	<i>cry1Ae1</i>	<i>cryIA(e)</i>
<i>cry8Aa1</i>	<i>cryIIIE</i>	<i>cry1Af1</i>	<i>icp</i>
<i>cry8Ba1</i>	<i>cryIIIG</i>	<i>cry1Ba1</i>	<i>cryIB</i>
<i>cry8Ca1</i>	<i>cryIIIF</i>	<i>cry1Ba2</i>	
<i>cry9Aa1</i>	<i>cryIG</i>	<i>cry1Bb1</i>	ET5
<i>cry9Aa2</i>	<i>cryIG</i>	<i>cry1Bc1</i>	<i>cryIB(c)</i>
<i>cry9Ba1</i>	<i>cryX</i>	<i>cry1Bd1</i>	<i>cryE1</i>
<i>cry9Ca1</i>	<i>cryIH</i>	<i>cry1Ca1</i>	<i>cryIC</i>
<i>cry9Da1</i>	N141	<i>cry1Ca2</i>	<i>cryIC</i>
<i>cry9Da2</i>		<i>cry1Ca3</i>	<i>cryIC</i>
<i>cry10Aa1</i>	<i>cryIVC</i>	<i>cry1Ca4</i>	<i>cryIC</i>
<i>cry11Aa1</i>	<i>cryIVD</i>	<i>cry1Ca5</i>	<i>cryIC</i>
<i>cry11Aa2</i>	<i>cryIVD</i>	<i>cry1Ca6</i>	<i>cryIC</i>

<i>cry11Ba1</i>	Jeg80	<i>cry1Ca7</i>	<i>cryIC</i>
<i>cry11Bb1</i>	94 kDa	<i>cry1Cb1</i>	<i>cryIC(b)</i>
<i>cry12Aa1</i>	<i>cryVB</i>	<i>cry1Da1</i>	<i>cryID</i>
<i>cry13Aa1</i>	<i>cryVC</i>	<i>cry1Db1</i>	<i>prtB</i>
<i>cry14Aa1</i>	<i>cryVD</i>	<i>cry1Ea1</i>	<i>cryIE</i>
<i>cry15Aa1</i>	34kDa	<i>cry1Ea2</i>	<i>cryIE</i>
<i>cry16Aa1</i>	<i>cbm71</i>	<i>cry1Ea3</i>	<i>cryIE</i>
<i>cry17Aa1</i>	<i>cbm72</i>	<i>cry1Ea4</i>	
<i>cry18Aa1</i>	<i>cryBP1</i>	<i>cry1Eb1</i>	<i>cryIE(b)</i>
<i>cry19Aa1</i>	Jeg65	<i>cry1Fa1</i>	<i>cryIF</i>
<i>cry19Ba1</i>		<i>cry1Fa2</i>	<i>cryIF</i>
<i>cry20Aa1</i>	86kDa	<i>cry1Fb1</i>	<i>prtD</i>
<i>cry21Aa1</i>		<i>cry1Ga1</i>	<i>prtA</i>
<i>cry22Aa1</i>		<i>cry1Ga2</i>	<i>cryIM</i>
<i>cyt1Aa1</i>	<i>cytA</i>	<i>cry1Gb1</i>	<i>cryH2</i>
<i>cyt1Aa2</i>	<i>cytA</i>	<i>cry1Ha1</i>	<i>prtC</i>
<i>cyt1Aa3</i>	<i>cytA</i>	<i>cry1Hb1</i>	
<i>cyt1Aa4</i>	<i>cytA</i>	<i>cry1Ia1</i>	<i>cryV</i>
<i>cyt1Ab1</i>	<i>cytM</i>	<i>cry1Ia2</i>	<i>cryV</i>
<i>cyt1Ba1</i>		<i>cry1Ia3</i>	<i>cryV</i>
<i>cyt2Aa1</i>	<i>cytB</i>	<i>cry1Ia4</i>	<i>cryV</i>
<i>cyt2Ba1</i>	" <i>cytB</i> "	<i>cry1Ia5</i>	<i>cryV159</i>
<i>cyt2Bb1</i>		<i>cry1Ib1</i>	<i>cryV465</i>
		<i>cry1Ja1</i>	ET4
		<i>cry1Jb1</i>	ET1
		<i>cry1Ka1</i>	
		<i>cry2Aa1</i>	<i>cryIIA</i>
		<i>cry2Aa2</i>	<i>cryIIA</i>
		<i>cry2Aa3</i>	
		<i>cry2Ab1</i>	<i>cryIIB</i>

المبيدات الفيروسية

الفيروسات طفيليات إجبارية تصيب العديد من الحشرات وتكون إصابات مميّنة 100 % تقريبا ، وتكون إصابات في اغلب الحالات متخصصة جدا ، وهذه لها فوائد اذ انها تحافظ على الحشرات المفيدة ولكنها قد تكون غير مرغوب فيها لان الفلاح يحتاج الى القضاء على عدد من الآفات بمنتج واحد . وهناك عددا ليس بالكبير من الفيروسات يستعمل في مكافحة الحشرات منها Cypovirus الذي يتكاثر في الخلايا الطلائية لأمعاء الحشرة *Sesamia calamistis* التي تصيب الذرة ويتكاثر ايضا في بعض الحشرات المشابه لها ويقضي عليها .

واهم الفيروسات المستعملة كمبيدات على نطاق تجاري واسع لمكافحة الحشرات هو الفيروس العصوي Baculovirus ، يستعمل في مكافحة حشرات النباتات المهمة اقتصاديا مثل مكافحة دودة

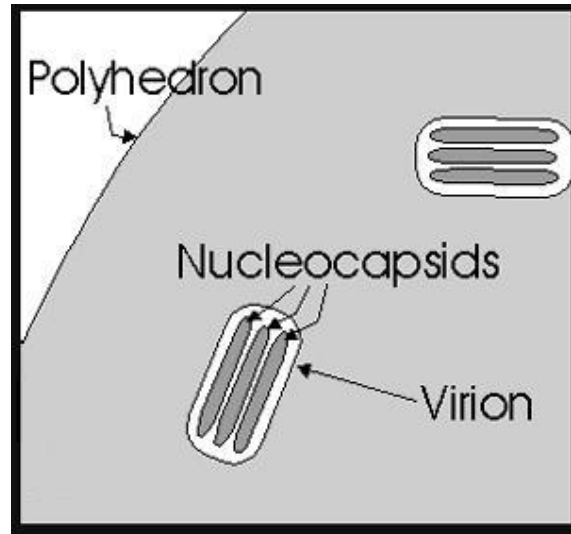
جوز القطن *Helicoverpa armigera* في مجال انتاج القطن العضوي الذي يخلو انتاجه وتنميته من استعمال المواد الكيماوية ، ويستعمل بمستوى $10^{12} \times 5$ وحدة فيروسية / هكتار .

الفيرس العصوي Baculovirus

يعود الى العائلة الفيروسية Baculoviridae ويهاجم الحشرات وبعض مفصليات الأرجل ، ينتشر الفيروس في كل أنحاء العالم ويوجد حيثما وجدت الحشرات وتحمله الرياح والإمطار من مكان الى آخر ، لذلك لا يتوقع ان يخلو منه مكان على اليابسة او البيئة المائية ، وهذا الانتشار الواسع يسجل كدليل مباشر او غير مباشر على مدى سلامة استعمال المبيدات الحاسوبية عليه . والمبيدات الفيروسية ليس لها تأثيرات سلبية على النباتات او الحيوانات مثل الطيور والأسماك وهي لا تصيب الا الحشرات المستهدفة ، كما انها لا تتأثر بالمبيدات المستعملة الا في حالة وجود بعض مركبات الكلور عند استعمالها سوية . والفيروس كبير الحجم نسبيا اذ يمكن رؤيته بالمجهر الضوئي بقوة تكبير - 1000x 400x ويظهر على شكل بلورات تشبه بلورات الملح غير المنتظمة او بشكل حبات الرمل .

تركيب الفيروس

يتكون جينوم الفيروس من أشرطة مزدوجة dsDNA يحوي الجينات اللازمة لإدخال الفيروس وإيجاده داخل الخلية المضيفة والتكاثر فيها ، ويحاط الجينوم ببقية من البروتينات . وتكون وحدات الفيروس حساسة للضوء ومحيط أمعاء الحشرة لذلك تحاط الوحدات الفيروسية Nucleocapsids بغلاف يسمى Polyhedron لذلك يسمى Nucleopolyhedrovirus (NPV) كما موضح في الشكل (71) .



شكل 71 : تركيب الفيروس العصوي
Baculovirus

ويظهر جينوم الفيروس مرونة كبيرة لعمليات الهندسة الوراثية ، لذلك تستغل هذه المرونة في توسيع المضاييف التي يصيبها ، اذ أمكن إدخال الجين المولد للسموم العصبية *egt* في فيروس الحشرة *Autographa californica* (Ac NPV) لتصيب أحياء أخرى مثل *Lymantria dispar* ، *Bombyx mori* .

دورة حياة الفيروس

حتى يؤثر الفيروس على الحشرة يجب ان تبتلعه ، وفي دورة حياته والتي تشابه باقي الفيروسات تبدأ بارتباطه الى مستلمات على الخلايا الحساسة ويتكاثر داخل الحشرات ويؤدي الى موتها . والحشرات التي تقتل بالفيروس لها صفات معينة فتكون فاتحة اللون وزيتية المظهر وعادة تبقى معلقة على النباتات الموجودة عليها وتكن هشّة تنفجر عند الملامسة او الحركة لتنتج سائل مليء بجزيئات الفيروس القادرة على إصابة حشرات أخرى ، وتكون هذه المظاهر والانفجار ضرورية لإعادة دورة الحياة ، اذ تقوم حشرات سليمة بالتغذي على النبات الملوث بالفيروس لتبدأ إصابة جديدة .

انتاج المبيدات الفيروسية

تعاني المبيدات الفيروسية من ضيق المضاييف التي تصيبها وان كانت هذه مهمة من ناحية تخطي الحشرات النافعة ، لذلك تتجه عمليات الهندسة الوراثية الى التقليل من هذه المعضلة وتوسيع المضاييف . وقد اطلق استعمال الفيروسات المهندسة وراثيا في بعض البلدان . وتكون المبيدات الفيروسية كفوة وقد تفوق المبيدات الكيماوية ، ولكن ما يعرقل إنتاجها هي كلفة الإنتاج ، وذلك لان تربية الحشرات تضيف تكاليف إضافية الى تكاليف الإنتاج والتشكيل اللاحقة . ولكن هذه المشكلة حلت عندما تطورت تقنيات زراعة الخلايا وتكون المزارع الخلوية اقل كلفة دون الحاجة الى الحشرات .

وقد استعملت مفاعلات حيوية مختلفة لتناسب تنمية خلايا الحشرات الكبيرة والهشة منها مفاعل Packed bed واستعمال حبات خرز الزجاج كمواقد سائدة ، وبعد نمو الخلايا على حبات الخرز يتم إصابتها بالفيروس ومثل هذه الخلايا لا تنقلت من مساندها .

ويمكن استعمال مفاعلات أخرى مثل الصهاريج مستمرة الخلط CSTR كما في تنمية خلايا حشرة *Spodoptera frugiperda* وبعد نمو الخلايا تنقل الى مفاعل آخر وتلقح بالفيروسات مثل AcNPV ويمكن الحصول على 10^7 / مليلتر من الفيروسات الكاملة المحاطة بالفقيصة . وهذه الإنتاجية تكون منافسة لأنواع المبيدات الأخرى .

المبيدات الفيروسية المستعملة : تستعمل الفيروسات في حماية المحاصيل المهمة والاقتصادية ، مثل مكافحة دودة جوز القطن *Helicoverpa armigera* اذ ترش الحقول بمعدل 5×10^{12} / هكتار . ومنها الموضحة في الجدول (39)

جدول 39 : المبيدات الفيروسية المستعملة لمكافحة بعض المحاصيل المصابة

المحاصيل المصابة	الآفة	الفيروس
التفاح ، الكمثرى ، الاجاص	عثة التفاح	Codling moth granulosus virus
اللاهنة ، الطماطة ، القطن	عثة اللاهنة دودة الجوز diamondback moth, عثة البطايا عثة العنب	Cabbage army worm nuclear polyhedrosis virus
القطن ، الذرة ، الطماطة	<i>Spodoptera littoralis</i>	<i>Spodoptera littoralis</i> nuclear polyhedrosis virus
القطن ، وبعض الخضر والتبغ	دودة براعم التبغ دودة جوز القطن	<i>Helicoverpa zea</i> nuclear polyhedrosis virus
الخضر ، وزهور البوت الزجاجية	دودة جذور الشوندر (<i>Spodoptera exigua</i>)	<i>Spodoptera exigua</i> nuclear polyhedrosis virus
الخضر	قفاز الكرفس (<i>Anagrapha falcifera</i>)	<i>Anagrapha falcifera</i> nuclear polyhedrosis virus
الجت والمحاصيل المشابه	قفاز الجت (<i>Autographa californica</i>)	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus
الغابات والاشجار	عث دوكلاس (<i>Orgyia psuedotsugata</i>)	<i>Orgyia psuedotsugata</i> nuclear polyhedrosis virus
الغابات والاشجار	العث الغجري (<i>Lymantria dispar</i>)	<i>Lymantria dispar</i> nuclear polyhedrosis virus

وتستعمل المبيدات الفيروسية ضد العث باستعمال المستحضر بالاسم التجاري Gypchek الحاوي على (Gypchek NPV) لرش الآلاف الهكتارات من الغابات سنويا . ويمكن ان تزداد كفاءة المبيدات الفيروسية عند استعمالها مع بعض المبيدات الكيماوية .

المبيدات الفطرية Mycopensticides

تشكل الفطريات رافدا كبيرا من روافد المبيدات الحيوية ، اذ يتطفل بعضها على الأحياء الضارة مثل الحشرات الضارة والنافعة أيضا . وتتطفل على الديدان والأدغال والفطريات وغيرها من الأحياء التي تحتاج الى مكافحة . وتمثل الفطريات التي تكون الابواغ اللاجنسية (الكونيديا) المجال الأفضل للاستعمال وذلك لانها تنتج كميات كبيرة منها ، كما انها تكون منتجات جافة يسهل تشكيلها والتعامل معها ، كما انها تتحمل الجفاف في الحقل ولكن عند الإصابة تحتاج الى درجات حرارية عالية ورطوبة كافية .

وتمتاز الفطريات المستعملة في السيطرة على الحشرات بعدم الحاجة الى ابتلاعها وإنما يمكن ان يحفز إنبات الكونيديات او الابواغ بمجرد التلامس مع الحشرة . وتعمل الفطريات بآليات عدة في القضاء على المضايغ التي تتطفل عليها ومنها إنتاج الإنزيمات المحللة مثل Chitinases وإنزيمات محللة للسليولوز كآلية للتضاد ، كما ان بعضها يكون مصائد لاقتناص فريسته كما في الفطريات المستعملة في مكافحة الديدان في الأرض ، وبعد الاقتران تفرز الإنزيمات عليها وتتغذى بها . وبعض الفطريات ينتج السموم مثل الفطريات التي تصيب النباتات ، او تنتج المضادات الحيوية او مركبات ايض أخرى تضاد بها المضيف .

ويوجد عدد كبير من الفطريات المستعملة في السيطرة الحيوية أهمها مكافحة الحشرات والجدول (40) يوضح بعض المبيدات المسجلة والمنتجة باستعمال فطريات خاصة لمكافحة بعض الحشرات .

جدول 40 : بعض الأمثلة على مبيدات الحشرات الفطرية المسجلة والمستعملة

المبيد	الفطر المستعمل	الحشرات المستهدفة	المحاصيل التي تصيبها
Mycotrol/Botanigard	<i>Beauveria bassiana</i>	الذباب الابيض ، المن ، حشرات ماصة	طماطة البيوت الزجاجية وازهار البيوت الزجاجية
Naturalis	<i>B. bassiana</i>	الحشرات الماصة	محاصيل البيوت الزجاجية والقطن
BioBlast	<i>Metarhizium anisopliae</i>	الارضة	البيوت
TM PFR-97	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	الذباب الابيض والحشرات الماصة	محاصيل البيوت الزجاجية
Vertalec/Mycotal	<i>Verticillium lecanii</i>	المن ، والحشرات الماصة	محاصيل البيوت الزجاجية
Green Muscle	<i>M. anisopliae</i>	الجراد	الاشجار الطبيعية
Betel	<i>B. bassiana</i>	يرقات الخنافس	قصب السكر
Engerlingspilz	<i>Beauveria brongniartii</i>	يرقات الخنافس	مراعي
Beauveria Schweizer	<i>B. brongniartii</i>	يرقات الخنافس	مراعي
Ostrinol	<i>B. bassiana</i>	حفار الذرة	الذرة
BioGreen	<i>M. flavoviride</i>	الدودة البيضاء	مراعي ، اعشاب

وهناك العديد من الفطريات التي تستعمل كمبيدات اضافة الى ما ذكر اعلاه ومنها *Alternaria destruens* , *Colletotrichum truncatum* والفطر *C. truncatum* يستعمل كمبيد للأعشاب Mycoherbicides والأدغال النامية مع الرز واقطن ، اما *A. destruens*

فتستعمل في مكافحة حقول الجزر و Safflower . Cranberry والطماطة . ويستعمل F. *oxysporum* , *Fusarium solani* في مكافحة بعض الديدان والسوس التي تصيب الموز الذي يمثل المحصول الاقتصادي لبعض البلدان .

ويشكل عالم الحشرات الحقل الأهم للمعالجة بالفطريات واغلب الحشرات تصاب بالفطريات الممرضة فهناك حوالي 700 نوع من الفطريات التي تصيب الحشرات وبعض الأنواع تكون انتقائية في أمراضيتها مثل *Aspergillus* و *Fusarium* ، والأخرى تكون عامة . إضافة الى ذلك هناك بعض الفطريات تكون مجبرة على التطفل على الحشرات وتوليد الأمراض فيها مثل الانواع التابعة للجنس *Cordyceps* . وتعد الفطريات من العوامل المهمة للسيطرة على الذباب والمن وغيرها في البيئات الدافئة والرطبة . ولكن إنتاجها ليس بالمزدهر نظرا لصعوبة إنتاجها على نطاق تجاري واسع ، كما ان فعاليتها في الحقل تكون ضعيفة لأنها تحتاج الى ظروف معتدلة الرطوبة والحرارة . وأكثر العمليات التجارية تركز على الفطريات العائدة لل صنف Hyphomycetes مثل *Metarhizium* , *Beauveria* , *Verticillium* , *Plaecilomyces* الموضحة في الجدول أعلاه . واغلب أنواعها تكون ذات مضايك واسعة نظرا لطبيعة تأثيرها على الطبقة الخارجية للحشرة ، اذ تقوم بغزو طبقة الكيوتكل Cuticle بمجرد ملامسة الحشرة . وتكون الحاجة ماسة للمبيدات الفطرية لمكافحة الآفات الرعوية للحيوانات في المناطق المفتوحة حيث يكون استعمال المبيدات الكيماوية غير ممكن عمليا ومكلفا

فطر *Metarhizium*

يعد أهم الفطريات المستعملة لمكافحة حشرات التربة والجراد وقراد الأبقار والحشرات التي تصيب النباتات . والمبيد الحشري منه مستحضر يحوي على الكونيديا الحية ، وعندما تلامس الكونيديا الطبقة الخارجية للحشرة تبدأ بالإنبات وتكوين الأنبوب الجرثومي ثم يدخل الى الحشرة مسببا إصابة جهازية خلال 7 - 21 يوم اعتمادا على الظروف وخاصة الحرارة . وعند موت الحشرة تكون مكونة من جثة مليئة بالمايسيليوم الذي يمتد الى الخارج من خلال طبقة الكيوتكل لتكوين جيل جديد من الكونيديا خارج الجثة .

وفي حشرات المناطق الجافة مثل الجراد فتحضر المبيدات في مادة أساس زيتية لتخطي حواجز الرطوبة ، كما ان المايسيليوم لا يخرج خارج جسم الحشرة الميتة نظرا لصلابة الطبقة الخارجية وكذلك تكون الجثة جافة وسرعان ما تلتهم من قبل المفترسات او الحشرات الأخرى مثل النمل .

يحوي الجنس على 3 انواع تقسم الى 10 ضروب أكثرها أهمية وشيوعا *M. anisopliae* var *anisopliae* والضرب الآخر *M. anisopliae* var *acridum* الذي يصيب الجراد والجنادب ، وتوجد بين الضروب اختلافات وراثية كبيرة ، وتكون أكثر السلالات ضراوة هي التي

تسبب اصابات وبائية في مضايف محددة . والتخصص يكون معتمدا على الجرعة اذ تزداد عدد المضايف عند الجرعة العالية . وبالرغم من ان دراسة نسق DNA يمكن ان يدل على السلالات الضارية الا ان التقدير الحيوي يعد الأهم للتحري عن السلالات الضارية المراد استخدامها .

وتعد الحرارة من العوامل المهمة في انتخاب السلالات لتطوير المبيدات الحشرية ، فأكثر العزلات تنمو بدرجة حرارة معتدلة 15 – 30° م ، ولكن توجد سلالات تنمو بدرجات حرارية منخفضة (5 – 10° م) وأخرى تنمو بدرجات حرارية عالي (35 – 40° م) .

والفطريات المستعملة كمبيدات حشرية تنتج واحد او اكثر من سموم Destruxins التي تسبب التسمم لرتبة ثنائية الأجنحة وتكون ذات علاقة بضرارة السلالة ، وهذه السموم ليست ذات أهمية كبيرة كمبيدات حشرية ولكنها قد تكون مساعدة اذ تعمل مضادة للتغذية Antifeedants . ويستعمل الفطر كمبيد لحماية محصول قصب السكر المهم ، فهناك حشرات تصيب جذور النبات وتؤدي الى قلة الحاصل وكذلك توجد حشرات تصيب أجزاء النبات الاخرى وتؤدي الى خسائر اقتصادية فادحة . ومن جهة ثانية فان استعمال المبيدات الكيماوية تكون مكلفة إضافة الى عدم إمكانية الوصول الى كافة أجزاء النبات المصاب ، كما ان بعضها يتفكك خاصة في الترب القلوية لذا كان الطلب على المبيدات الحيوية وبالذات الفطرية ملحا وعليه يستعمل الفطر *M. anisopliae var anisopliae* .

فطر *Metarhizium* في مكافحة الأرضة

يكون استعمال الفطر محدد ضد الأرضة او ما يسمى بدابة الأرض او النمل الأبيض Termites وذلك لان هذه الحشرة تنتج مواد مضادة للفطريات داخل أعشاشها إضافة الى تصرفات الحشرة الخاصة ، فهي يمكن ان تكتشف الكونيديا وتتجنبها . وبالرغم من وسع انتشار الفطر الا انه يقل في أعشاش الأرضة ، ولكن عزلت بعض العزلات من الأعشاش التي تكون متطبعة للعيش في بيئات الأرضة وهي أكثر ضراوة من السلالات الأخرى وتعيش برطوبة عالية وبدرجة حرارة 35° م وتقوم الأرضة بتنظيف المناطق التي تعيش فيها وهذا يقلل من انتشار الفطر وربما كانت هذه وسيلة دفاعية في حشرات الأرضة ، اذ انه بعد عمليات التنظيف تصبح الكونيديا داخل أمعاء الحشرة وتفقد قابليتها على الإصابة ، وعندما تفرغ الحشرات أمعائها وتستعمل المستفرغ في لحم خطوط البيت تكون الكونيديا لا تزال حية ولكن غير قادرة على ملامسة كيوتكل الحشرة وغزوها ، لذلك فهناك محاولات لإنتاج مبيدات ملائمة ضد الحشرة واستعمال طرق ملائمة للمكافحة ومنها إيجاد سلالات لا تنفر منها الحشرة والعناية بتحضير وتشكيل المبيد بحيث لا يكون منفرا للحشرة . وفي مجال تطبيق المبيد فتستعمل طريقة نفخ الكونيديا في بيوت الحشرات الموجودة في النباتات المصابة وبذلك سيلاص الفطر الحشرة عن طريق الغبار مؤديا الى الحد من امتداد مستعمراتها وهي التي تبحث دائما عن أماكن جديدة . والطريقة الاخرى هو البحث عن مستعمرات الحشرة وإدخال مستحضرات نقية وفعالة

في مركز المستعمرة للقضاء على المستعمرة ، وفي حالة الأشجار المصابة يمكن نفخ الكونيديا الى داخل جذع الشجرة المجوف وبالتالي يمكن ان تصل الكونيديا الى أهدافها من الحشرات .

فطر *Metarhizium* في مكافحة الجراد

يشكل الجراد احد المشاكل العالمية المهمة خاصة عند حصول موجات الاجتياح للمناطق الزراعية ويكافح بالمبيدات الكيماوية ولكن السيطرة الحيوية تفرض نفسها لعدم جدوى المعالجات الكيماوية عندما تكون أعداد الجراد كبيرة جدا ، والجراد يصاب بسلالات من *M. anisopliae* var *acridum* ويتم تحضيره في الزيت الذي يؤدي الى قتل الحشرات بسرعة مقارنة بالمستحضرات المائية . وتكون مؤثرة تحت ظروف قليلة الرطوبة ، وتحتاج الى أسبوعين ليظهر تأثيرها في الحقل . ويستعمل المبيد في معاملة المراعي الواسعة التي تصل مساحتها الى أكثر من 2000 هكتار برشها بالكونيديا المعلقة في زيت معدني بمعدل $10 \times 5 - 1$ كونيديا / هكتار وهذه يمكن ان تسيطر على 90 % من الجراد الزاحف أثناء موجات الاجتياح . وتتأثر العمليات بشكل كبير بدرجات الحرارة اذ يتطور الفطر بدرجة حرارة 20 – 35 °م لذلك تؤجل عمليات الرش الى المساء لحين انخفاض درجات الحرارة وذلك لان درجة حرارة جسم الحشرة يمكن ان تصل الى 40 °م نظرا لتعرضها للشمس أثناء النهار خاصة في فصل الصيف .

ومن الحشرات التي تتأثر بالفطر هي الجنادب عديمة الأجنحة وشغالات النحل عند أخذها للطعام من النباتات المعاملة مما يؤدي الى تعرضها الى جرع كبيرة .

إنتاج المبيدات الفطرية

اغلب عمليات إنتاج المبيدات الفطرية هي على نطاق محلي باستعمال فضلات العمليات التصنيعية وإنتاجها في الدول المتقدمة محدود . وتنتج في البرازيل والصين ، وهذه المبيدات تعد من العضويات Organics وصديقة للبيئة لذا يتوقع ان تجد لها أسواقا واسعة في المستقبل .

وفي حالة الإنتاج تنمى بطريقة التخمرات الصلبة كما في استعمال حبوب الرز او الفضلات الصناعية ثم تشكل على شكل حبيبات صغيرة ، وعند استعمال حبوب الرز فيمكن استعمالها بدون تشكيل . ويمكن ان تفصل الكونيديا النامية على المواد بالنخل وتشكل على شكل حبيبات او مسحوق بعد إضافة المواد اللازمة للتشكيل .

وتكون طريقة تخمر المواد الصلبة ذات إنتاجية عالية لانها تعطي حاصلا كبيرا من الكونيديا ، اذ يمكن ان تصل إنتاجية 1 – 3 كغم من مواد التخمر بعد 2 - 3 أسابيع الى إعطاء كمية من الكونيديا كافية لمكافحة هكتار من الأراضي الزراعية .

ولمكافحة الحشرات التي تصيب الجذور تخلط الكونيديا مع الطين لتقليل الغبار وتستعمل بمستوى 6 – 7 10×13 كونيديا / هكتار وتوضع على عمق 10 – 15 سم تحت سطح التربة وتغطى بسرعة

لضمان عدم قتل الكونيديا بالحرارة والتعرض للضوء ، وتستطيع ان تبقى الكونيديا في التربة لمدة 3 سنوات او أكثر اعتمادا على ملائمة الظروف في التربة . ويمكن ان تستعمل المبيدات عند أي مرحلة من مراحل نمو النبات التي تحددها الضرورة .

وقد تستعمل سموم Destruxins كمضادات تغذية أي كعوامل مساعدة مع الفطريات اذ تزيد من كفاءة المبيدات .

ومن الفطريات الاخرى التابعة للجنس والمستعملة كمبيدات هو الفطر *M. flavoviride* . ويوجد فطر اخر يستعمل بكثرة في مجال المبيدات الفطرية هو فطر *Beauveria bassiana* الذي يستعمل في مكافحة عدد من الحشرات كما موضح في الجدول أعلاه (جدول 40) .

فطر *Trichoderma*

من الفطريات المستعملة في السيطرة والمكافحة الحيوية اذ للفطر إمكانيات كبيرة في هذا المجال إضافة الى مواصفات اخرى مفيدة .

بيئة الفطر

يوجد الفطر في كل الترب والبيئات تقريبا فيكثر في البيئات التي تكثر فيها المواد العضوية او المواد النباتية المتفسخة وفضلات المحاصيل خاصة عند إصابتها بفطريات اخرى ، وتستطيع العيش في ظروف مختلفة مما يضمن لها الانتشار الواسع ، وهي اكثر الفطريات استزراعا من التربة ، يزداد تعدادها في التربة بوجود جذور النباتات بمستويات عالية والتي تستعمر من قبل الفطر . وهو اكثر المنافسات في المنطقة المحيطة بالجذور ، وتستعمر سطوح الجذور والقشرة عند التلامس بشكل يعتمد على السلالة ، ولذلك فعند معاملة البذور فان أفضل السلالات هي التي تستعمر الجذور الجديدة البازغة . ويمكن ان توجد في المناطق المحيطة بالجذور على بعد اكثر من متر وتبقى في التربة بعد إضافتها لمدة تزيد عن سنة ونصف وهي صفة لسلالات معينة .

مواصفات الفطر ونموه

يعود الفطر الى مجموعة الفطريات الناقصة وهذا يعني عدم وجود طور التكاثر الجنسي او انه غير مكتشف ، اما السلالات التي لها طور جنسي فتضم الى صنف الفطريات الكيسية ضمن الجنس *Hypocrea* . والسلالات معروفة الطور الجنسي هي غير مستعملة في السيطرة الحيوية .

ينتج الفطر الابواغ اللاجنسية التي تستعمل في التصنيف إضافة الى مواصفات أخرى . وفي الوقت الحاضر تصنف اعتمادا على المواصفات الجزيئية وبعتماد هذه التوجهات سجل حوالي 30 نوعا بدلا من 9 ، والأنواع المسجلة ذات فوائد في عالم الزراعة ، وتكون مقاومة بشكل طبيعي لأكثر المبيدات المستعملة خاصة ضد الفطريات واخرى المستعملة لإغراض أخرى ، فهو يمكن ان يفكك

المبيدات العضوية الكيماوية الحاوية على الكلور وغيرها المستعملة كمبيدات حشرية فضلا عن تفكيكها لمبيدات الأدغال مثل Glyphosate و Trifluralin لذلك يمكن ان يستعمل في معالجة التلوث البيئي . وتختلف مقاومته للمبيدات لذلك اختيرت بعض سلالاته للاستعمال الزراعي .

يتكاثر الفطر بتكوين هايفات متفرعة فطرية نموذجية بقطر 5 – 10 مايكرومتر . ويبدأ التكاثر اللاجنسي في خلية مفردة لتكون كونيديا بقطر 3 – 5 مايكرومتر وتنطلق بكميات كبيرة ، وينتج الفطر الابواغ العملاقة الهاجعة Resting chlamydospores من خلايا مفردة تحت ظروف خاصة ويمكن ان يلتحم اكثر من بوغ عملاق سوية .

قابليات الفطر

لفطر قابليات كبيرة ومتنوعة تساهم في زيادة استعماله نظرا لاحتوائه على الجينات التي تؤهله للقيام بالوظائف المختلفة ومنها :

- الفطر سريع النمو والتطور .
- قادر على التطفل على الفطريات الاخرى (Mycoparasitism) وبذا يستطيع الحصول على المواد الغذائية من الفطريات التي ينمو عليها .
- للفطر قابلية على التضاد الحيوي .
- له قابلية المنافسة على المكان والمواد الغذائية وذلك يساعد في العمليات الحيوية مثل الكمر وتفكيك المواد العضوية اذ يحوي على الإنزيمات المحللة للخشب والسليلوز .
- يزيد من قابليات النباتات التي يعيش معها على مقاومة ظروف الإجهاد وحث المقاومة فيها .
- إذابة وحجز المواد الغذائية اللاعضوية وبذا يقوم بتحريك المواد الغذائية من التربة الى النباتات .
- له قابلية تعطيل إنزيمات الأحياء الممرضة ويكون ذو كفاءة عالية في السيطرة على أمراض النبات

- له قابلية عالية على تحمل الظروف البيئية المتطرفة في البيئات التي يقطنها .

السيطرة الحيوية

تستعمل سلالات الفطر سواء المسجلة او غير المسجلة للسيطرة على أمراض النبات ، وتوجد شركات تقوم بإنتاج الفطر وتسويقه مثل الفطر *T. harzianum* المستعمل ضد الفطر الممرض *Botrytis cinerea* المسبب للتعفن الرمادي بإنتاجه للبروتينات .

والفطر يستطيع حث بعض المواد مثل Terpenoids في جذور القطن للسيطرة على الاصابة بالفطر *Rhizoctonia solani* كما في استعمال الفطر *T. virens* . ويمكن للفطر حث دفاعات اخرى في النباتات عند معاملتها بالفطر .

ومن دواعي استعماله في السيطرة الحيوية هو إكسبته للتطفل على الفطريات والديدان وغيرها من الاحياء التي تهاجم النباتات ولذلك يسمى الفطر بـ *Hyperparasitic fungus* . وللاستعمال في النباتات تعامل البذور المعدة للزراعة بالفطر . فالبذور عادة تحفظ من موسم الى اخر بدون اضافة المواد الحافظة للحفاظ على نسبة إنبات عالية ولذلك يمكن ان تصاب او تهاجم من قبل الفطريات والمرضات التي تؤدي الى فقدان نسبة عالية من قابلية الإنبات وبالتالي فقدان الإنتاجية . ومعاملة البذور بفطر *Trichoderma* يساعد في ضمان نسبة إنبات عالية ومحصول السنة القادمة ، اذ يقوم الفطر باستعمار البذور وحماية النباتات التي ستنتج منها من الأمراض بعد مرحلة بزوغ النبات من البذرة وخاصة في مرحلة البادرات . واستعمال الفطر مع البذور يكون أكثر فائدة من عدة نواحي مثلا الاقتصادية ومن حيث السيطرة اذ يكون أكثر فاعلية من الاستعمال بعد حصول مشاكل الإصابة .

وتتم معاملة البذور بعالق مائي او مسحوق للكونيديا (10 % لمدة 10 دقائق) بوجود او غياب مواد لاصقة ، وهذه المعاملة بالإضافة الى الحماية التي تضفيها فإنها تساعد على إنبات البذور والنمو ، وفي احدى الممارسات وجد ان معاملة البذور تؤدي الى خفض الإصابة بالفطر *R. solani* الى 3 % مقارنة بإصابة وصلت الى 90 % في معاملة السيطرة .

والجدول (41) يوضح اهم الأمراض والفطريات المسببة لها والقضاء عليها بالفطر *T. harzianum* .

وتمتد سيطرة الفطر الى التربة اذ يمكن معاملة التربة بالفطر بمعدل 10⁸ وحدة تكوين المستعمرات / Propagules / كغم تربة وإجراء عمليات الحراثة ، والدورات الزراعية تساعد الفطر في القضاء على الوحدات التكاثرية للفطريات الممرضة في التربة التي تساهم في الإصابات المتأخرة ، لذلك يكون من الضروري استعمال المستحضرات الحيوية Biopreparations مع الدورات الزراعية خاصة في المناطق شديدة الإصابة ، ومما يزيد في كفاءة الفطر العناية بالتسميد والسقي لان هذه تساعد في إبقاء العلاقة القائمة بين الفطر والنبات . ويكون استعمال الفطر مع المخصبات بخلط الكونيديا مع روث الحيوانات او المسمدات الاخرى . ويعد Peat (مزارع الخث) ومنتجات قصب السكر أوساط حاملة جيدة للفطر والتي تحافظ عليه لمدة شهر تحت الظروف الاعتيادية .

فطر *Trichoderma* والمخصبات

يستعمل الفطر كما ذكر اعلاه في تحفيز نمو النباتات ، فهو يزيد من معدلات نموها وتطورها بعد ان يساعد على الإنبات ، وزيادة معدلات النمو تعود الى ان الفطر يساعد في تكوين جذور قوية تمتد الى عمق كبير وبذا يمكن ان تقلل من السماد المستعمل ، اذ تقلل سماد النتروجين بنسبة 40 % ، وتساعد في نمو النبات في المناطق المرستيمية في الأجزاء الفتية مؤدية الى حدوث نمو سريع ويمكن ان تصل نسبة الزيادة في النمو الى 70 – 80 % مقارنة بالنباتات غير المعاملة ، وتحصل زيادة في

الوزن المكتسب تصل الى 60 % كما انه يزيد من نسبة الوزن الجاف بأكثر من 20 % ، وزيادة طول الجذور والمدادات تصل الى 30 % .

وتتآزر فعاليات الفطر مع فعاليات الاحياء المفيدة الاخرى مثل الفطريات المكونة Mycorrhizae في محيط الجذور لتزيد من إذابة الفوسفات ، وكذلك تتآزر مع فعاليات *Azotobacter chroococcum* المثبتة للنتروجين بشكل حر أي يؤدي الى إيجاد علاقات تبادل منفعة .

جدول 41 : الامراض ومسبباتها التي يسيطر عليها بفطر *Trichoderma*

الاحياء الممرضة	الامراض التي تسببها	المحاصيل المستهدفة
<i>Armillaria spp.</i>	تعفن الجذور	اشجار الفاكهة
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Anthracnose ، التعفن	البطاطا ، الطماطة ، البزاليا ، الفراولة والازهار
<i>Fusarium moniliform</i>	التعفن	الذرة الحلوة
<i>Phytophthora infestans</i>	اللفحة	البطاطا ، البطيخ
<i>Phytophthora spp.</i>	التعفن	التبغ والازهار واشجار الفاكهة
<i>Pythium spp.</i>	لفحة القطن ، الذبول	محاصيل مختلفة
<i>Fusarium oxysporum</i>	الذبول	بطاطا ، طماطة ، موز ، بزاليا ، الذرة الحلوة ، القرنفل
<i>Rhizoctonia solani</i>	لفحة القطن ، الذبول	الجزر ، الطماطة ، الخس ، اللهاية ، القهوة ، البطاطة ، البصل ، الثوم ، الفلفل
<i>Macrophomina phaseolina</i>	تعفن فحمي	الذرة الحلوة ، البزاليا ، البطيخ ، السمسم
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	لفحة القطن ، الذبول	البزاليا الطماطة ، الخس ، اللهاية ، البطاطة ، القهوة ، البصل ، الثوم ، الفلفل
<i>Rosellinia necatrix</i>	تعفن الجذور الابيض	اشجار التفاح
<i>Botrytis cinerea</i>	التعفن الرمادي	البطاطا ، الطماطة ، البزاليا ، الفراولة والازهار
<i>Cylindrocladium scoparium</i>	الذبول	التفاح الصنوبري (الاناناس)

استغلال فطر *Trichoderma*

من الفوائد المذكورة اعلاه يتبين ان للفطر إمكانيات وراثية كبيرة ، وغياب الانقسام الاختزالي ، وهذه يشير الى وجود مرونة كبيرة في كروموسوماتها ، والسلالات المختلفة تحوي على أعداد وأحجام

مختلفة من الكروموسومات . واغلب الخلايا تحوي على عدد من الانوية والتي تحصل فيها عمليات وراثية كثيرة تؤدي الى اختلاف الانوية في الكائن الواحد ، والذي يؤدي الى تنوع كبير في النمط الجيني والمظهري وتزيد من قابليتها على التطبع الذي ينشأ بسرعة في هذا الفطر . والانواع عالية التطبع تحوي على انوية غير متماثلة النمط Heterokaryon ، اما الانواع المستعملة في السيطرة الحيوية يجب ان تكون متماثلة الانوية من الناحية الوراثية وهي التي تسوق تجاريا كي تكون ملائمة للسيطرة النوعية التي تخضع لها قبل الإطلاق .

ويستغل الفطر كمصدر للجينات لتحوير النباتات وراثيا ، وتستعمل أنزيماته في العديد من الصناعات تمتد من صناعة الانسجة ، صناعة علف الدواجن وغيرها من الصناعات ، اضافة الى استعماله في انتاج النكهات المستعملة في التصنيع الغذائي مثل انتاج نكهة جوز الهند وبعض الانزيمات مثل تلك المحللة للسليلوز .

واقع المبيدات الحيوية

كما اتضح اعلاه ان استعمال المبيدات الحيوية يمتد الى جذور تاريخية ليست بالقصيرة ولعل ما استجد على استخدامها هو هندسة النبات والاحياء الاخرى لتحوي على جينات غريبة لتساعد في التخلص من الآفات ، والمنحى الاخير أدى الى ظهور المعارضة التقليدية لكل ما هو مهندس وراثيا (وهو لا ينبع من فراغ) لذلك استوجب اختبار الاحياء المهندسة وراثيا ودراستها من ناحية مدى إصابتها للأهداف للتعرف على جدوى التغيير الوراثي ، اضافة الى اجراء الدراسات المناعية للأغذية المنتجة منها وتأثير جينات مقاومة المبيدات المكونة على الإنسان عند تلقيه إياها من خلال الأغذية فمثلا بعض النباتات التي ادخلت اليها جينات Bt مثل الذرة وغيرها من المحاصيل وكانت بروتيناتها تحوي على مجموعة من البروتينات المولدة للحساسية ، لذلك فرضت الفحوص المناعية لاختبار النباتات المهندسة وراثيا ، وقد ظهرت مقاييسات ومفاهيم جديدة في هذا المجال مثل التكافؤ الواقعي Substantial equivalence والتي تخص الأغذية ومدى مطابقتها للمنتجات الطبيعية . اذ تحتاج عمليات طرح الاحياء المهندسة وراثيا الى التوصيف الوراثي للاحياء ومعرفة مدى تداخل الاحياء المهندسة مع الاحياء الطبيعية فهناك العديد من السلالات لا يمكن ان تتزاوج مع بعضها ان كانت في مناطق مختلفة مثل سلالات الفطر *Colletorichum gloeosporioides* ، لذلك لابد من إيجاد العلاقات وهذا يحتاج الى تحديد توالي جينومات الاحياء المستعملة كمبيدات حيوية لإيجاد المجسات الجزيئية والواسمات الجزيئية لتحديد هذه العلاقات ، ويتوقع ان هذه التوجهات ستتطور في المستقبل .

وتحتاج المبيدات الحيوية الى زيادة كفاءتها وذلك من خلال عمليات التشكيل والتحضير حتى تؤدي أغراضها بالشكل الأمثل . فمثلا تحضير Bt على شكل مساحيق قابلة للبلل بعد تجفيفها بالرداذ او التجفيد للمزارع التي نمت فيها لا تفي بالغرض نظرا لحساسية السم للضوء لذلك وجب تغليفها او

خلطتها مع مواد تمتص الأشعة فوق البنفسجية وكذلك مواد تدمر الأوزون ويمكن لهذه المواد ان تشتق من المكوثرات الحيوية التي تنتجها الميكروبات .

ويمكن زيادة كفاءة المبيدات الحيوية بخلطها مع مواد مناسبة مثل المشتتات الحيوية والمستحلبات والزيت لضمان بقائها في البيئة فالزيوت النباتية ومستحلباتها يمكن ان تزيد من كفاءة بعض الأحياء المستعملة في المبيدات الحيوية . ومن الطرق المرشحة استعمال طريقة الاقتناص في النشأ او الجيلاتين او ألجينات الصوديوم او مثيل السليلوز ، إضافة الى استعمال المواد الطبيعية الاخرى مثل بقايا المحاصيل لإنتاج مبيدات حبيبية الشكل .

الجبريلينات Gibberellins

تنتج من الفطر *Gibberella fugikuroi* وتوجد منها انواع GA1 , GA2 , GA3 ومركبات أخرى وأهمها GA3 وهي يمكن ان تنتج في النباتات ولكن الإنتاج الأكثر من الفطريات اذ توجد اكثر من 58 نوع من فطر *Gibberella* تنتج هذه المحفزات ومنظمات النمو النباتي وتساهم في تشجيع نمو النبات واستطالته . وتنتج على نطاق تجاري من زراعة الفطريات المنتجة .

التقنية الحيوية الميكروبية والأغذية

الصفحة	الموضوع
540	المنتجات الميكروبية والأغذية
544	الإنزيمات في الصناعات الغذائية
551	هندسة الإنزيمات
553	أهم الإنزيمات في التصنيع الغذائي
558	المجسات الحيوية
563	الصناعات الغذائية
563	صناعة اللحوم
565	تصنيع الحبوب
566	صناعة الزيوت والدهون
569	إنتاج الفيتامينات
570	إنتاج الحوامض الأمينية
573	إنتاج مركبات النكهة
575	إنتاج الملونات الغذائية
575	إنتاج المكوثرات الحيوية
578	إنتاج بروتين الخلية الواحدة
581	إنتاج الحوامض العضوية
582	تصنيع الفواكه والخضر
585	صناعات الألبان
592	المحليات الصناعية

التقنية الحيوية الميكروبية والاعذية

تعد العلاقة بين التقنية والاعذية من أوثق العلاقات سواء في الأزمان القديمة أو الحديثة ، وتشترك العلاقات مع علاقة التقنية بالمجالات الطبية التي تتمثل بإنتاج الاعذية الصحية أو العلاجية Pharma foods أو Functional foods أو غيرها من المسميات للأغذية التي تحسن من الجوانب الصحية للإنسان والحيوان . وقد مر ذكر بعضها في فصل آخر (يراجع الفصل الثامن) ، ويتداخل مجال الاعذية مع الزراعة التي تزود بالمواد الأولية التي تستعمل مباشرة كأغذية أو تحور بالتخميرات لتستعمل كأغذية بشكل غير مباشر ، وتتداخل الاعذية مع الصناعة من خلال خطوط معينة .

وعمليات التصنيع الغذائي من أقدم وأكبر الصناعات المعتمدة على التقنية الحيوية وخاصة الميكروبية ، وتشكل أكبر مجال للاشتراك مع التقنية الحيوية ، فإنتاج الخبز وغيره من مشتقات الحبوب وصناعة الألبان المتخمرة وإنتاج الفيتامينات والملونات الغذائية الحيوية والمستحلبات والمثبتات ومواد التغليف وقائمة لا تكاد تنتهي هي في الأغلب صناعات قديمة . وفي الوقت الحاضر ترنو الصناعات الغذائية إلى مزيد من الإمكانات من التقنية الحيوية لمزيد من التحسين اعتمادا على تطوير العمليات الصناعية الموجودة حاليا واستنباط عمليات تصنيع ومواد جديدة . فهناك العديد من الجوانب الصناعية لا يزال يعترها النقص فتحتاج الصناعات الغذائية إلى إنتاج مواد حيوية تبتعد بها عن استعمال المواد الكيماوية كملونات غذائية وغيرها المذكورة آنفا ، إضافة إلى الحاجة إلى وسائل ناجعة لمعاملة الفضلات الناتجة للابتعاد عن التلوث البيئي كما في إنتاج الشرش بملايين الأطنان ، وكذلك السيطرة على عمليات التصنيع وإنتاج اغذية بمواصفات ملائمة للاستهلاك البشري وهناك العديد من الجوانب الأخرى التي تحتاج إلى الدراسات . وعليه فإن من الضروري معرفة العلاقات التركيبية والوظيفية للمواد الغذائية والكيمياء الحيوية لها وعلاقتها مع فسلجة الخلايا الميكروبية .

وبملاحظة عامة لميزات التقنية الحيوية والتي لها علاقة بالأغذية والتي منها :

- أهم ميزات التقنية الحيوية الحديثة استعمال rDNA في انظمة جديدة حيث يكلون ويعبر عنها كما في تحويل البودئ المستعملة في التخميرات .

- استعمال تقنية التفاعلات الإنزيمية سواء في المحاليل أي الحرة أو بشكل مقيد .

- استعمال مزارع الخلايا النباتية لإنتاج بعض المواد اللازمة للتصنيع الغذائي بطريقة التحول

الحيوي

- استعمال تقنيات مختلفة للتخمير .

وتستعمل التقنية الحيوية في مجال الاعذية لمختلف الأغراض :

- استعمال الانظمة الحيوية في التصنيع الغذائي سواء بالتأثير المباشر او انتاج مواد تضاف للاغذية كاستعمال غير مباشر .
- تحويل الكتلة الحيوية للأحياء المجهرية غير القابلة للأكل الى مواد صالحة للاستهلاك البشري او استعمالها في العلف الحيواني .
- تحويل الأغذية غير المستساغة الى مواد ملائمة للاستهلاك البشري كما في تحويل المواد الأولية الى منتجات غذائية .
- ولذلك فان التقدم في التقنيات الحيوية يمكن ان يؤثر في الصناعات الغذائية ومن هذه التأثيرات :
 - تحويل مكونات الاغذية والمساعدة في إيجاد مواد جديدة او تحسين أداء المواد ومواصفاتها مثل تحويل دهون الحليب يمكن ان يزيد من الدهون غير المشبعة وزيادة قابلية النشر للزبد المبرد المنتج منه عند الاستعمال .
 - تطوير مجسات حيوية للكشف المبكر عن تلف الأغذية .
 - استعمال طرق جديدة لانتاج النكهات التي تضاف الى الاغذية مثل استعمال مزارع الخلايا النباتية او احياء مجهرية خاصة لهذه الاغراض وكذلك استعمال احياء مجهرية خاصة .
 - إمكانية إزالة المواد الضارة من المواد الغذائية مثل إزالة Erucic acid من زيوت السلجم وإزالة الكافئين من القهوة وإزالة المرارة من بعض المواد الغذائية وغيرها من المواد .
 - هندسة وإنتاج الانزيمات المحورة Xenoenzymes لمقاومة الحرارة او غيرها من الظروف المطبقة في التصنيع الغذائي كما في هندسة الإنزيم Glucose isomerase للعمل في رقم هيدروجيني واطئ للتقليل من تفاعلات الاسمرار في منتجات الحبوب .
 - يمكن للتقنية الحيوية فتح مجالات لمصادر طبيعية جديدة لمواجهة توسع طلب الأسواق على المواد الغذائية .
- **المنتجات الميكروبية والأغذية** : تنتج الميكروبات مواد حيوية تجد لها استعمالات مختلفة في مجال الاغذية البعض منها مذكور في الجدول (42) .

جدول 42 : بعض المنتجات الحيوية من الاحياء المجهرية المستعملة في مجال الاغذية

المادة المنتجة	مجال الاستعمال او الوظيفة	الكائن المنتج
استرات الحوامض الدهنية	اعطاء نكهة الفواكه	<i>Pseudomonas</i>
الالجينات	مثلجات لبنية ، صناعة اللحوم	<i>Azotobacter vinelandii</i>

<i>B. licheniformis</i>	مرطب	الكليسول
<i>Blakeslea trispora</i> والطحالب الصغيرة	صبغات	بتا - كاروتين
<i>Kluyveromyces fragillis, Fusarium graminearum</i>	مدعمات غذائية	بروتين الخلية الواحدة
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	مضاد أكسدة	تربتوفان
<i>Leuconostoc cremoris</i>	نكهة الزبد	ثنائي الاسيتل
<i>Gluconobacter oxydans</i>	اغناء الاعذية ومضاد للاكسدة	حامض الاسكوريك
<i>Acetobacter aceti</i>	مادة حمضة	حامض الخليك
<i>Aspergillus niger</i>	مادة حمضة	حامض الستريك
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	محسن النكهة	حامض الكلوتاميك
<i>Streptococcus , Lactobacillus</i>	مادة حمضة	حامض اللاكتيك
<i>Aspergillus spp</i>	صناعة الجلي والمربيات	حامض المالك
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	مثخنات	دكستران
<i>Ashbya gossipii</i>	مدعم غذائي	رايبوفلافين
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	مثخنات	سكريات مجلثنة بالحرارة
<i>Xanthomonas campestris</i>	مثخنات	صمغ الزانثان
<i>Propionibacterium</i>	مدعمات غذائية	فيتامين B12
<i>Candida lipolytica</i>	استحلاب الاعذية	مستحلبات حيوية

<i>B. licheniformis</i>	ترطيب المواد الغذائية	مشتتات حيوية
<i>Ceratocystis moniliformis</i>	نكهة الموز	3- Methylbutylacetate
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	مادة نكهة	5'- Nucleotides
<i>Trichoderma viride</i>	نكهة جوز الهند	6 –Pentyl-2-pyrone
<i>Penicillium chrysogenum</i>	صبغة للاغذية	Chrysogenin
<i>Ceratocystis spp</i>	نكهة الفواكه	Citronellol
<i>Alcaligenes faecalis</i>	مخنات	Curulan
<i>Sporopolimyces odorus</i>	نكهة الخوخ	Gamma- decalactone
<i>Kluyveromyces fragillis</i>	نكهة الورد	Geranol
<i>B. polymyxa</i>	طلائع الاسبارتام (محليات صناعية)	L- Phenylalanine
<i>St. lactis var maltigenes</i>	نكهة المالت	Methylbutanol
<i>B. cereus</i>	منشط مناعي	N- acetyl tripeptide
<i>St. lactis</i>	مادة حافظة	Nisin
<i>B. subtilis</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>Agrobacterium radiobacter</i>	نكهة الجوز	Tetramethylpyrazine

اما الجدول (43) فيوضح بعض الاغذية الرئيسة التي تحضر بالتخميرات الميكروبية .

جدول 43 : اهم الاغذية المحضرة بالتخميرات الميكروبية

المنتجات	المادة الاساسية للتصنيع	الكائنات المجهرية
الاغذية المخبوزة	طحين الحبوب	<i>S. cerevisiae</i>
الاجبان المنضجة بالعفن	الحليب	<i>Penicillium camembertii</i> , <i>Pen. roquefortii</i>
الاجبان الصلبة	الحليب	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
القهوة	قرنات القهوة	بكتريا حامض اللاكتيك
اللحانة المتخمرة	اللحانة (الملفوف)	<i>Lb. plantarum</i>
النقانق (الصوصج)	لحوم مختلفة المصادر	<i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i>
صوص الصويا	قرنات الصويا	<i>Aspergillus oryzae</i>
الخل	مواد حاوية على السكريات مختلفة (مثل التمر)	<i>Acetobacter aceti</i>
اللبن الرائب	الحليب	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>

الإنزيمات في الصناعات الغذائية

تشكل الانزيمات عصب الحياة للاحياء جميعيا اذ تعمل في التحول او الاستحالة الحيوية Biotransformation والذي هو مصطلح قريب من Biocatalysis وتعني تحويل مادة كيميائية الى مادة كيميائية اخرى باستعمال المساعدات الحيوية ، وغالبا ما تكون إنزيم او كائن حي او ميت يحوي على الانزيم او مجموعة من الانزيمات ، في حين يشير Bioconversion الى التحول باستعمال الكائنات الحية الكاملة .

وتشكل الانزيمات جانبا مهما من عمليات تصنيع الغذاء الحيوي سواء كانت كجزيئات إنزيمية لوحدها او داخل الخلايا التي تقوم بعمليات التخمر ، إضافة الى مساهماتها الفعالة في الجوانب الطبية وبعض الجوانب الصناعية .

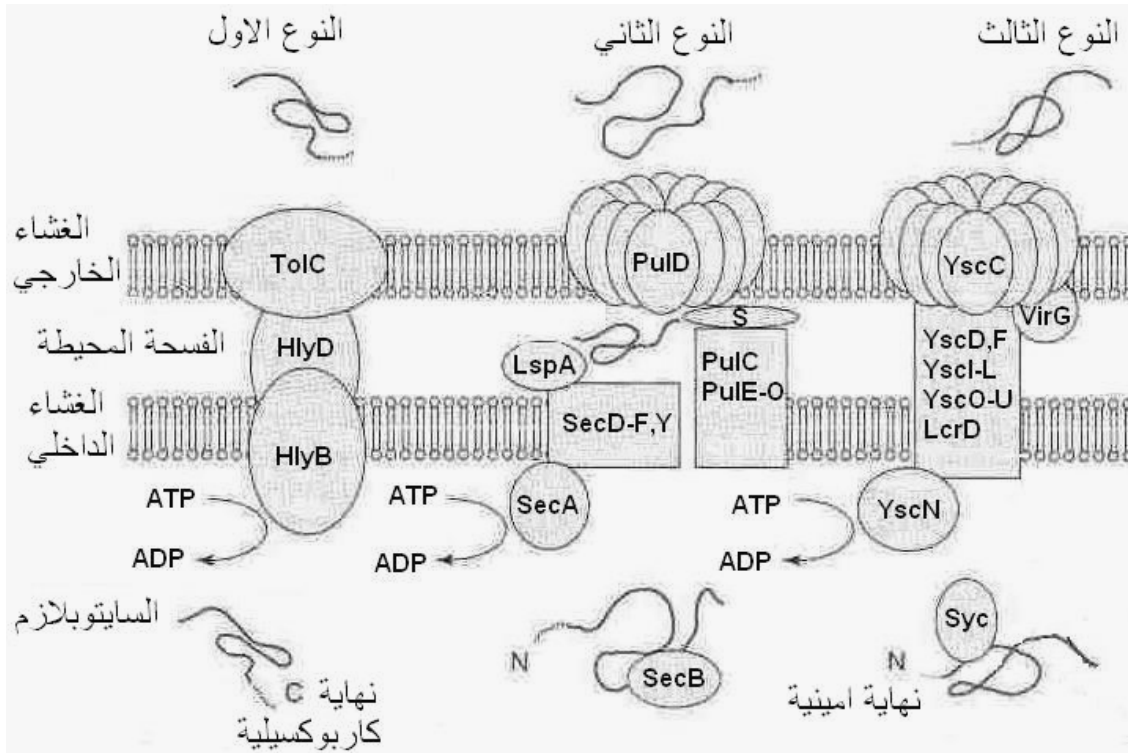
والانزيمات عوامل مساعدة بروتينية تنتج من الانظمة الحيوية ويصل عدد الحوامض الامينية فيها من 200 – 1000 او اكثر مطوية بشكل يلاءم وظيفتها ، ويوجد اكثر من 25000 إنزيم منها حوالي 2000 انزيم من الانزيمات الميكروبية ولكنها لا تستعمل على نطاق واسع ، اذ ان المستعمل منها حوالي 20 انزيم واغلبها انزيمات تحلل مائي مثل الاميلزات والسليلازات واللاييزات اضافة الى انزيمات اخرى تستعمل في التصنيع الغذائي . وتعد الصناعات الغذائية السوق الأكبر الذي تستخدم فيه الانزيمات اذ تستعمل حوالي 40 % من الانزيمات المنتجة وتستعمل في مجالات شتى وتؤدي وظائف شتى ومنها :

- التحليل المائي للمواد الذي يساعد في تقليل اللزوجة .
- فصل المكونات الغذائية كما في فصل البروتينات عن الدهون والشرش عند تصنيع الاجبان .
- تفكيك البكتين والسليلوز لزيادة حاصل العصير من الفواكه .
- تغيير بعض صفات البروتينات الغذائية مثل إجراء تحلل جزئي للبروتينات لإنتاج بروتينات قابلة للخفق
- تحسين العجين وصفاته الريولوجية ليبقى الخبز الناتج محتفظا بصفات الطراوة لمدة طويلة .
- تحويل النكهات كما في إضافة اللاييزات الى أنواع الجبن .
- زيادة قابلية التنظيف في معامل الاغذية اذ ان الاميلزات والبروتيزات الموجودة في المنظفات تزيد من قابليتها على التنظيف وإزالة الألوان .
- يمكن ان تستعمل لأغراض خاصة مثل استعمال إنزيم Naringinase المقيد لإزالة الطعم المر من عصير الليمون الهندي Grapefruit او استعمال الانزيمات الحالة للبكتين لترويق عصير الفاكهة .

إنتاج وإفراز الإنزيمات

اغلب الأنزيمات المستعملة في التصنيع الغذائي هي من الانزيمات التي تفرز الى خارج الخلايا . واكثر الانزيمات الميكروبية تنتج من الفطريات او البكتريا الموجبة لصبغة كرام لأنها تفرز أنزيماتها الى الخارج بسهولة ، ولكن هناك نسبة لا بأس بها تنتج من البكتريا السالبة لصبغة كرام . ويعود السبب في افراز الانزيمات الى الخارج لاعتماد الخلايا في تغذيتها على المواد كبيرة الجزيئات ، وبما ان تغذية الاحياء المجهرية عموما هي تغذية تنافذية لذلك كان من اللازم تحويل المواد المكثرة المعقدة الى مواد بسيطة يمكن ان تعبر الأغشية الخلوية بمساعدة أنظمة النقل .

والبكتريا تفرز الانزيمات خارج الغشاء الخلوي ولكن في البكتريا السالبة لصبغة كرام تتجمع في الفسحة المحيطة ، بينما في الموجبة فهي تنقل الى البيئة المحيطة ، وتوجد عدة أنظمة لإفراز البروتينات والإنزيمات في البكتريا السالبة لصبغة كرام كما موضحة في الشكل (72) .



شكل 72 : أنظمة افراز البروتينات في البكتريا السالبة لصبغة كرام

والبروتينات التي تنقل بالنظام I , III تعبر الغشاء بخطوة واحدة اذ لا تحوي على توالي إشارة وتنقل بشكل كامل ، اما البروتينات التي تنقل بالنظام II (الموضح في الشكل) فتنتقل بعدة خطوات . البروتينات او الإنزيمات المراد نقلها بالنظام الثاني تخلق بداية على الرايبوزومات بشكل بروتينات أولية Proproteins تحوي على توالي الإشارة يتكون من 15 – 40 حامض اميني والأغلبية تكون بحدود 30 حامض اميني وهذه الإشارة توجد على الطرف الاميني من البروتين وتحتاج الى نظام إفراز sec system لنقلها عبر الغشاء الخلوي ، وفي *E. coli* يتكون النظام من عدة بروتينات هي secD , secE , secF , secY اما secA فهو إنزيم ATPase لتزويد الطاقة في حين secB يكون بروتين وصيف يرتبط للبروتين الأولي . بعد عبور البروتين الغشاء الخلوي فان التوالي القائد ينفلق بالإنزيم Signal peptidase الذي يكون مرتبطا بالغشاء وينطلق البروتين الى الفسحة المحيطة ثم يعبر البروتين الغشاء الخارجي بتركيب معقد .

ويستعمل النظام لإفراز الإنزيمات المفككة مثل Phospholipase , Elastase وكذلك السموم الخارجية .

ويوجد نظام رابع لعبور البروتينات بتأثير النهاية الكربوكسيلية للبروتين التي تزال عند انطلاق البروتين من الغشاء الخارجي وتستعمل لنقل السموم التي تنتجها الاحياء والبروتينات المرتبطة بال-DNA كما في نقل المعقدات بين البكتريا *Ag. tumefaciens* الى الخلايا النباتية .

اما البروتينات التي تنقل بالنظام الأول والثالث التي تكون غير معتمدة على أنظمة الإفراز فلا تعاني من معالجات على نهايتها الامينية وكل نظام من هذه الانظمة يحوي عددا من البروتينات . اما افراز الانزيمات في الاحياء المجهرية حقيقية النواة مثل الفطريات والخمائر فان افراز البروتينات فيتم بعد اكتمال عمليات التحويل التي تجري بعد عمليات الترجمة ، ثم تفرز بعد تعبئتها في حويصلات صغيرة على سطوح الشبكة الاندوبلازمية ومساعدة أجسام كولجي وتلتحم مع الاغشية الخلوية لتفرغ الى الخارج .

وتنتج اغلب الإنزيمات من الاحياء المجهرية بطريقة تخمر المواد الصلبة (Solid substrate fermentation) خاصة عند استعمال الفطريات للإنتاج . وللطريقة مزايا عدة تساعد في تفضيلها على الطرق الاخرى ، منها زيادة الحاصل و انتاج كميات اكبر من الإنزيمات للوحدة الحجمية . وتكون طرق استخلاصها بسيطة ، اضافة الى مزايا اخرى .

وتستعمل في طرق تخمر المواد الصلبة المواد الأولية المكوثرة والتي ربما احتاجت الى معاملات أولية مثل الطحن لزيادة المساحة السطحية . وتوضع بشكل طبقات رقيقة وذلك لتلافي الارتفاع بدرجات الحرارة نتيجة للفاعليات الحيوية وكذلك لزيادة التهوية اذ ان الاحياء المستعملة عادة تكون هوائية ، كما ان عملية إنتاج الانزيمات هي عمليات بنائية تحتاج الى كميات كبيرة من الطاقة ATP التي تكون أفضل حالات انتاجها تحت الظروف الهوائية .

اما الطريقة الثانية لإنتاج الانزيمات هي استعمال الأوساط السائلة وهي مشابهة لعمليات التخمر الاخرى ويفضل ان تكون باستعمال المزارع المتقطعة Batch cultures ويمكن إنتاجها بعمليات التخمر المستمرة ولكنها لا تستعمل على نطاق تجاري .

وتنتج الإنزيمات الداخلية ولكن على نطاق ضيق وذلك لضيق أسواق استعمالها ولصعوبة انتاجها اذ تحتاج الى عمليات استخلاص من الخلايا بعد تكسيورها وعمليات تنقية مكلفة . كما انه بالامكان في بعض الحالات استعمال الخلايا الكاملة للتحويل الحيوي والاستغناء عن الانزيمات الداخلية .

استخلاص وتنقية الانزيمات

تعتمد طرق استخلاص وتنقية الانزيمات على الغرض من الاستعمال فالإنزيمات التي تدخل في مجال الأدوية والاستخدام البشري المباشر تحتاج الى عمليات استخلاص وتنقية معقدة ، اما للأغراض الاخرى فيمكن الاكتفاء بخطوات بسيطة ، ولذلك تكون حاوية على مواد اخرى مثل المواد المشتقة من

وسط التنمية أي الوسط الذي أنتجت فيه ، والمستحضرات التجارية تحوي على مواد حافظة ومواد مثبتة مثل الكاربوهيدرات المكوثرة او املاح لا عضوية .

ويتم إنتاج الإنزيمات بعدة أشكال مثل المستحضرات الجافة وهذه تكون ملائمة للصناعات الغذائية التي تكون عادة عمليات واسعة القياس ، او تكون بشكل مستحضرات سائلة ويجب ان تخزن بدرجات حرارية واطئة . ولكل من المستحضرات مدة صلاحية محددة تعتمد على الكثير من العوامل مثل وجود المواد المثبتة والحافظة ونوعية المستحضر من حيث الهيئة الفيزيائية مثل مستحضرات سائلة او جافة .

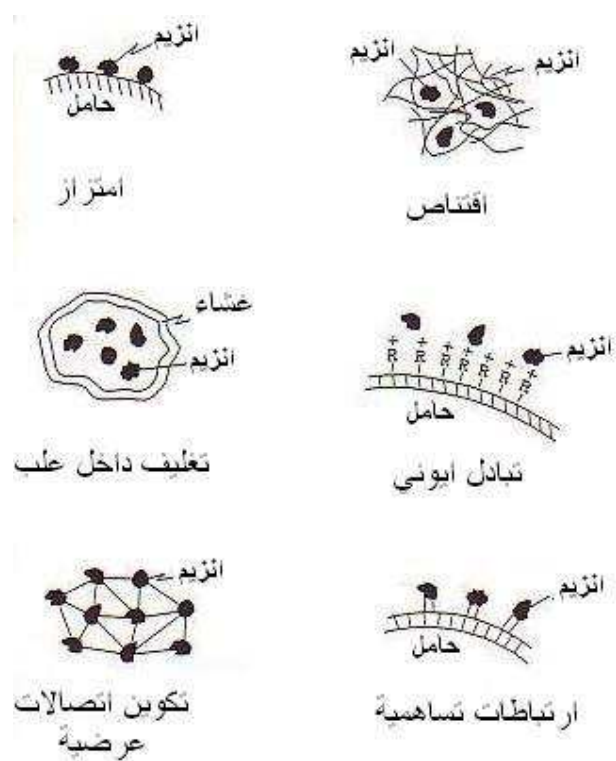
استعمالات الإنزيمات في التصنيع الغذائي

نظرا لوسع عمليات التصنيع الغذائي وكون الإنزيمات ليست بالوفرة المفرطة لذلك يفضل استعمال الإنزيمات المقيدة Immobilized ، وبعض العمليات تحتاج الى الإنزيمات غير المقيدة مثل عمليات تصنيع الحبوب التي تصبح الإنزيمات جزءا من الغذاء . وعمليات التقييد فوائد كثيرة منها :

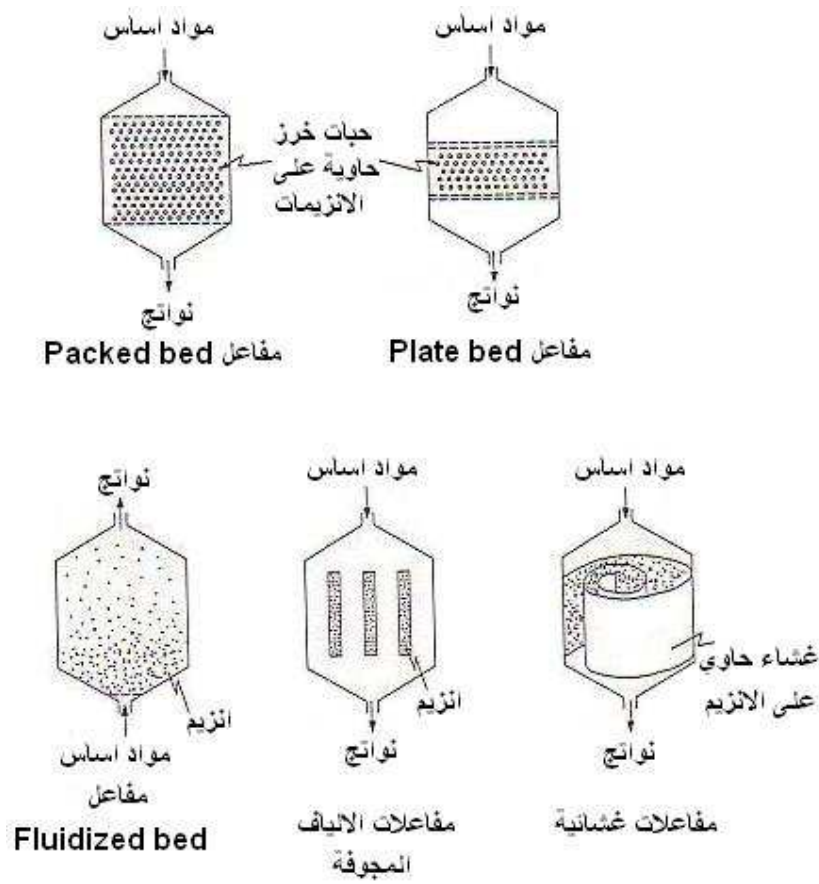
- الإنزيمات لا تصبح جزءا من الغذاء .
- يمكن زيادة تركيز الإنزيمات المستعملة لغرض تسريع العمليات التصنيعية والتي تكون محددة عند استعمال الإنزيمات الحرة .
- تساعد عمليات التقييد في زيادة ثباتية الإنزيمات في البيئات التي يحصل فيها تذبذب للمؤثرات المحيطة .
- تزيد من الاستفادة من الإنزيمات اذ يمكن ان تبقى لمدة طويلة ويمكن إعادة عمليات الاستعمال مرات عديدة .
- باستعمال الإنزيمات المقيدة يمكن إنهاء التفاعلات في الوقت المناسب .
- استعمال الإنزيمات المقيدة يضمن التوزيع على كل مواد الأساس المستعملة .
- يمكن استعمال الإنزيمات المقيدة في عمليات تخمر مستمرة او متقطعة .
- توفر تقنيات التقييد للإنزيمات إجراء عمليات تحول متتابعة وذلك بإضافة او تقييد أكثر من إنزيم .
- يقلل استعمال الإنزيمات المقيدة من الكلفة الإجمالية للعمليات الإنتاجية .

ويمكن استعمال طرق تقييد مختلفة للإنزيمات المستعملة في التصنيع الغذائي وكذلك استعمال مواد مختلفة كما موضح في الشكل (73) .

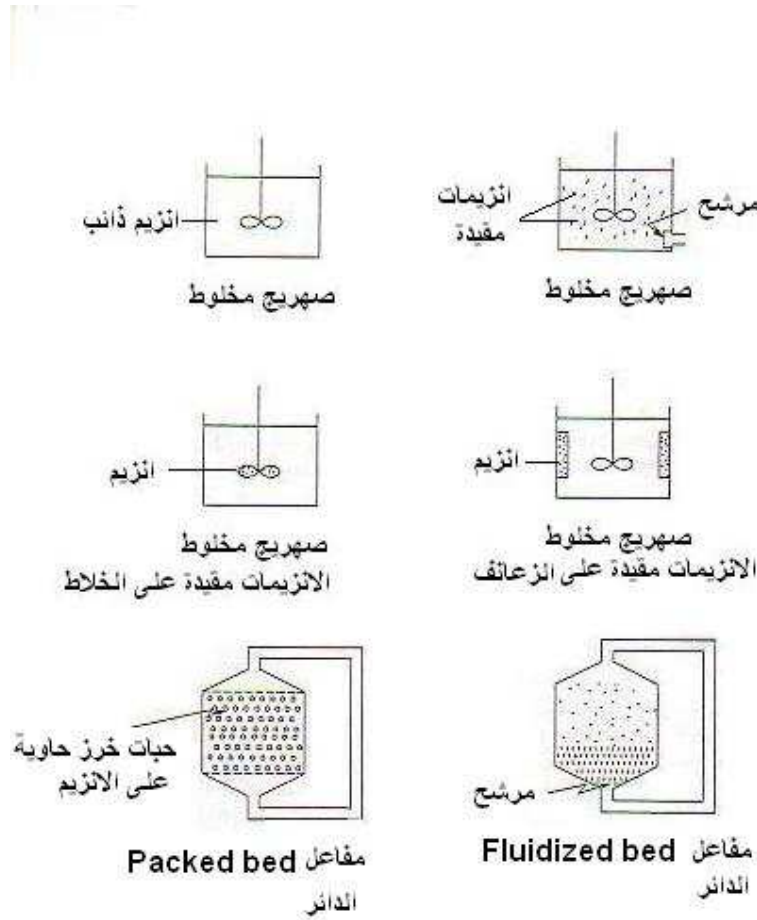
وتستعمل الإنزيمات المقيدة في أنظمة مفاعلات مختلفة اعتمادا على الحاجة او الغاية من استعمالها ، منها أنظمة مستمرة او مفتوحة وهي الموضحة في الشكل (74) ، او الأنظمة المغلقة الموضحة في الشكل (75) .



شكل 73 : أنظمة تقييد الانزيمات



شكل 74 : الانظمة المفتوحة باستعمال الانزيمات المقييدة



شكل 75 : الانظمة المغلفة لاستعمال الانزيمات المقيدة

هندسة الإنزيمات

تحتاج عمليات التصنيع الغذائي الى مواصفات خاصة في الانزيمات المستعملة لتلائم العمليات التصنيعية والتي يمكن ان تتوزع على جوانب عدة :

- عمليات تصنيع الجبن تحتاج الى كميات كبيرة من إنزيم الرنين ولان الإنزيم المشتق من الميكروبات له فعالية عالية فانه يؤدي الى إنتاج البيبتيدات المرة ، لذلك تم كلونة الجينات المسؤولة من المعدة الرابعة للعجول الرضيعة المنتجة له في خميرة الخبز كمضيف بدلا من المضيف التقليدي *E. coli* وذلك لان الأولى من الاحياء حقيقية النواة التي باستطاعتها إجراء التحويلات بعد الترجمة اللازمة لفعالية البروتينات اضافة الى انها مضيف مقبول في الأغذية .

- تحتاج الصناعات الغذائية الى انزيمات ثابتة بالحرارة ويكون ذلك بزيادة الاتصالات العرضية على ان لا تؤثر على فعالية الإنزيم كما حصل في Lysozyme الذي يصبح أكثر ثباتا ، وقد استغلّت هذه الآلية لإنتاج انزيمات ملائمة للتصنيع الغذائي .

- استعملت البروتينات المهندسة في تحضير مسابر خاصة لفحص الأغذية ، وعند تحضير هذه المسابر من احياء حقيقية النواة تستعمل cDNA من مكتبات الجينومات .
- استعملت الهندسة الوراثية وبعض الطرق الخاصة مثل التطفير الموجه Site – directed mutagenesis لتحضير إنزيمات ملائمة ، فيمكن تغيير ثملالات هامة في الانزيمات التي تكون حساسة للأكسدة الكيماوية او غيرها من العوامل ، مثل استبدال ثمالة الميثايونين التي تكون حساسة للأكسدة والتنشيط في بروتين Subtilisin ليكون اكثر مقاومة ومثل هذه يمكن استغلالها لإنتاج انزيمات ملائمة للتصنيع الغذائي . وكذلك يمكن الحصول على الثباتية بنقل الجينات الملائمة مثل نقل جينات البروتيز المقاوم للحرارة من البكتريا *B. stearothermophilus* الى سلالات من *B. cereus* خالية من البروتيز والذي أدى بالسلالة الأخيرة الى إنتاج بروتينات مقاومة للحرارة . وتستعمل عملية هندسة البروتينات لزيادة ثباتية الانزيمات لمدى متغير من الأرقام الهيدروجينية وفقا للحاجة ، او انزيمات تقاوم قوى القص التي تتعرض لها أثناء التخمرات اذا كانت حرة وغير مقيدة ، وتستعمل هندسة البروتينات لزيادة تخصص الانزيمات وذلك بتحويل وتبديل ثملالات الحوامض الامينية عند المواقع الفعالة للإنزيمات .
- وفي كل العمليات الخاصة بهندسة البروتينات داخل الأنظمة الحية *In vivo* او هندسة الاحياء الكاملة يلاحظ ان المضاييف التقليدية هي *E. coli* ولكن هذه تكون قليلة الفائدة للصناعات الغذائية وذلك لقصور هذه الأحياء بدائية النواة على إجراء التحويلات اللازمة للبروتينات بعد الترجمة والتي تؤثر في فعاليتها ، اضافة الى ان البكتريا سالبة لصبغة كرام وبذا فهي تحوي على السموم الداخلية . لذلك كان لابد من البحث عن مضيف بديل من بدائية النواة وكان الاختيار *Corynebacterium glutamicum* التي تستعمل في عمليات الإنتاج التجاري للعديد من الحوامض الامينية ومركبات النكهة النيوكلوتيدية . اما البديل الأفضل هو استعمال خلايا حقيقية النواة لذلك كان اختيار خميرة الخبز وهي مقبولة من نواحي وصفات عدة .

والانزيمات المحورة يمكن ان يتم الحصول عليها من الانزيمات الطبيعية بواسطة :

- التحويلات الكيماوية للانزيمات بعد تخليقها أي هندسة بروتيناتها .
- إجراء التطفير العشوائي على الأحياء المنتجة .
- استعمال التطفير الموجه لإنتاج إنزيمات بمواصفات محددة .

والتحويلات الكيماوية يمكن ان تجرى بواسطة :

- مفاعلة الانزيمات مع الايونات او الجزيئات الصغيرة .
- مفاعلة الانزيمات مع مكوثرات غير ذائبة في الماء .

- مفاعلة الانزيمات مع مكوثرت ذائبة في الماء كما في تقييد الانزيمات .
- وقد استعملت الانزيمات المحورة في مجالات عدة في التصنيع الغذائي كما في صناعة الجبن ،
- وتحويل النكهة وتحسين عمليات التخمر .

أهم إنزيمات التصنيع الغذائي

تستعمل في التصنيع الغذائي مجموعة من الانزيمات والتي تكون عادة من الانزيمات الخارجية ومنها :

البروتيازات

- وتعزل من الاحياء الملوثة او المتلفة للمواد الغذائية ، وهي تحلل الأواصر البيبتيدية في البروتينات وتضيف جزئية ماء . وتقسم الى قسمين اعتمادا على الأصرة التي تفلقها :
- البروتيازات الداخلية Endopeptidases وهي التي تفلق الاواصر البيبتيدية داخل البروتينات .
- البروتيازات الخارجية Exopeptidases تفلق الأواصر الطرفية .
- ومن البروتيازات العاملة على الأواصر البيبتيدية موضحة في الجدول (44) .

جدول 44 : انواع الانزيمات المحللة للبروتينات المنتجة من بعض الاحياء المجهرية

نوعية الانزيمات	الاصناف الثانوية	امثلة على الاحياء المنتجة
البروتيازات السيرينية	بروتيازات مشابهة للتريسين	<i>Streptomyces</i>
	بروتيازات سيرينية قلبية	<i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Aspergillus</i>
	بروتيازات المكورات العنقودية	<i>Staph. aureus</i>
	بروتيازات سيرينية متعادلة	<i>B. pumilus</i>
	بروتيازات سيرينية اخرى	<i>Escherichia</i> , <i>Saccharomyces</i>

<i>Bacillus</i>	بروتيازات معدنية متعادلة	بروتيازات معدنية
<i>Pseudomonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i>	بروتيازات معدنية قاعدية	
<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i>	بروتياز البيبسين الحامضي	بروتيازات حامضية
<i>Mucor</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Endothia</i>	مشابهات الرنين الحامضي	
<i>Clostridium</i> مجموعة A من المكورات المسبحية	<i>Clostripain</i> بروتيازات المكورات المسبحية	بروتيازات ثايولية

ويلاحظ من الجدول ان الانزيمات يمكن ان تقسم اعتمادا على الرقم الهيدروجيني الذي تعمل فيه ، فمنها الحامضية والقاعدية والمتعادلة . إضافة الى استعمال مؤشرات اخرى مثل وجود بعض الحوامض الامينية في الموقع الفعال للإنزيم مثلا البروتيازات السيرينية ، او احتواء الإنزيم على المعادن كما في البروتيازات المعدنية والتي تفقد فعاليتها عند سحب الايونات بالمواد الخالبة . ومن اهم البروتيازات المستعملة في التصنيع الغذائي :

- الرنين (Chymosine) من البروتيازات الداخلية ويستعمل في تخثير الحليب لتصنيع الجبن . وينتمي الإنزيم الى البروتيازات الحامضية اذ يمكن ان يعمل برقم هيدروجيني 2 – 3 ، وينتج بشكل رئيس من الفطريات مثل *Endothia parasitica* . *Mucor miehei* , *M. pusillus* . ويعمل الإنزيم على كسر الأواصر المجاورة للحوامض الامينية الحلقية .
- مشابهات الببسين من البروتيازات الداخلية وتعمل بأرقام هيدروجينية عالية وينتج من الفطريات *Aspergillus oryzae* . *A. flavus* , *A. niger* , *A. sojae* وكذلك من *Streptomyces* .
- البروتيازات الفطرية الحامضية وتعمل بأرقام هيدروجينية حامضية وتحلل مدى واسع من الأواصر البيبتيدية .
- مشابهات التربسين وينتج من انواع مختلفة من *Streptomyces* ويحلل الأواصر البيبتيدية المجاورة لثمالات الارجنيين واللايسين .

وتوجد انزيمات اخرى ذات مصادر متعددة مثل انزيم البابين والبرومالين تعمل على مدى واسع من الأواصر وهي ذات مصادر نباتية وتستعمل في التصنيع الغذائي .
والغرض من استعمال البروتيازات في الصناعات الغذائية للسيطرة على الزوجة والمطاطية وقابلية الالتصاق وكذلك الاستحلاب ، وتثبيت الرغوة والتحكم بقابلية الخفق وزيادة قابلية الاستخلاص . وتستعمل ايضا لتطوير النكهة او تحويلها وتقديد اللحوم . وتعمل البروتيازات في تحويل بروتينات الحبوب مثل الكلوئين .

الاميليزات

وهي الانزيمات التي تعمل على تحليل النشا وتصنف اما على نوع الاحياء المنتجة مثل الاميليزات الفطرية او البكتيرية ، وكذلك تصنف اعتمادا على الأواصر التي تكسرها في النشا ومنها :
[X] الانزيمات العاملة على الأصرة $\alpha - 1,4$ وهذه تقسم الى :

• انزيمات داخلية تعمل على كسر الأواصر داخل جزيئية النشا ومنها $\alpha - \text{amylase}$ وتنتج من عدد كبير من البكتيريا مثل *Bacillus* , *Pseudomonas* .

• الانزيمات الخارجية وهي التي تكسر الأواصر الطرفية وتفصل جزيئات السكر الطرفية ومنها $\beta - \text{amylase}$ ويعبر الاواصر $1,6$ الفرعية ، وينتج بشكل رئيس من الفطريات ، *Rizopus* , *Aspergillus* وتنتج ايضا بعض انواع الجنس *Bacillus* و *Streptomyces* .

[X] الانزيمات التي تعمل على الأصرة $\alpha - 1,6$ في تفرعات جزيئات النشا ومنها :

Pullulanases الذي ينتج من *Aerobacter* وانزيم *Isoamylase* المنتج من

Pseudomonas وكذلك من الفطر *A. niger* , *Pullularia pullulans* وانزيم *Exo-*

Pullulanases المنتج من الفطر *Cladosporium*

وتعمل اميليزات - الفا على فلق الأواصر بشكل عشوائي في مكوثرات النشا لإنتاج الدكستريانات وتعمل بأرقام هيدروجينية 6 - 7 بشكل عام . وتمتاز الاميليزات البكتيرية بتحملها للدرجات الحرارة العالية تصل الى 70 - 110 °م في حين ان الاميليزات الفطرية فتعمل بدرجات حرارية اقل .

وتستعمل الانواع المتخصصة من الانزيمات مثل *Amyloglucosidases*

(*Glucoamylases*) لتحضير شراب الذرة من النشا وإنتاج منتج غني بالسكريات .

الإنزيمات المحللة للسليولوز Cellulases

وهذه تمثل انظمة إنزيمية تنتج على نطاق تجاري من الفطر *Trichoderma viride* . والإنزيمات تحلل السليولوز الذي هو مكوثرات للكلوكوز مرتبطة بأصرة (4 , 1) - β . وتحتاج الانزيمات الى معاملة مواد الأساس معاملات أولية لفعاليتها مثل السماح لألياف السليولوز بالانتفاخ والتشرب بالماء ، وتكون الأواصر المتعرضة لفعل الانزيمات معتمدة على مدى انتفاخها بالماء .

ويمكن زيادة امتصاص الماء ببعض المعاملات مثل السحق الميكانيكي أو استعمال البخار أو استعمال بعض المواد الكيماوية المخففة ، وتقسم المجموعة الى :

- السليليزات الداخلية Endocellulases وهي التي تحلل الأواصر (4 , 1) - β بشكل عشوائي على طول سلاسل السليلوز منتجة سكريات قليلة التكوثر Oligosaccharides .
- السليليزات الخارجية Exocellulases وتفلق جزئيات الكلوكوز من أطراف مكوثر السليلوز .
- انزيمات Exo - cellobiohydrolases وهي التي تحلل الأواصر (4 , 1) - β لإطلاق سكر Cellobiose من النهايات غير المختزلة من السلاسل .
- انزيمات Cellobiases وتقوم بتحليل الأصرة (4 , 1) - β في سكر السيليبايوز وإعطاء جزيئين من سكر الكلوكوز .

الإنزيمات المحللة لأشباه السليلوزات Hemicellulases

أشباه السليلوزات مكوثرات متباينة ويمكن أن تحوي على 5 - 6 من السكريات المختلفة ، وهناك بعض الإنزيمات التي تعمل عليها :

- Endohemicellulases وتقوم بفلق العديد من الأواصر الداخلية للمواد .
 - Exohemicellulases وتقوم بفلق الأواصر من الجهة غير المختزلة للسلاسل .
- وتضم المجموعة انزيمات أخرى مثل الانزيمات المحللة للمواد الخشبية Xylanases وغيرها Mannanases , Galactanases وغيرها وتنتج من قبل عدد كبير من الاحياء المجهرية خاصة تلك المتطفلة على النباتات .

الانزيمات المحللة للبكتين Pectinases

البكتات نوع خاص من الكربوهيدرات ، الوحدات الرئيسية فيها Galacturonic acid والانزيمات التي تحلله :

- Endogalacturonases وتقوم بفلق أواصر Glucoside bonds بشكل عشوائي .
 - Exogalacturonases وتقوم بفلق وحدات ثنائية من السكر من الأطراف غير المختزلة .
 - Pectinestrases تحلل أسترات البكتين ، وتنتج من بعض الفطريات والخمائر والبكتريا .
 - Transeliminases تقوم بفلق الأواصر الكلايكوسيدية بدون إضافة ماء .
- تستعمل الانزيمات في انتاج واستخلاص القهوة وصناعة عصير الفواكه لتقليل اللزوجة وإزالة عتمة العصائر والألوان غير المرغوبة .

تنتج من الفطريات المتلفة للفواكه ومنها انواع من جنس *Aspergillus* مثل *A. mentii* , *A. niger* , *oryzae* وغيرها . وتستعمل الانزيمات ذات الاصل الميكروبي في تسريع عملية تكوين الهلام ، وإزالة الألوان من عصير الفواكه وتروقيها وزيادة ثباتيتها .

انزيمات المزامرة Isomerases

تستعمل في تحويل المركبات من نظير الى اخر وأهمها في الصناعات الغذائية Glucose isomerase يستعمل لتحويل الكلوكوز الى فركتوز الذي تكون حلاوته ضعف حلاوة السكروز . لذلك يستعمل في تحضير شراب الذرة الغني بالفركتوز ويستعمل في صناعة الأغذية الحلوة .

انزيمات تحلل الدهون

تقوم بفك الحوامض الدهنية من الكليسرول في الزيوت والدهون بمهاجمة الأواصر الاسترية لذلك تستعمل في عمليات الاسترة و Transesterification . ومنها Lipases التي تؤثر على الكليسيريدات الثلاثية ، اما إنزيمات Phospholipases فتؤثر على الدهون الفوسفاتية . وبعض الانزيمات تكون متخصصة بالأصرة التي تعلقها مثل C-1 او C-2 من الكليسيريدات الثلاثية .

تنتج من قبل عدد كبير من الفطريات والخمائر والبكتريا . وتستخدم الفطريات لعمليات الإنتاج التجاري . ومن اهم الفطريات المنتجة *Geotrichum candidum* الذي يستعمل في صناعة الجبن المنضج . وتنتج ايضا من الفطريات *A. niger* , *Mucor spp* , *Rhizopus arrhizus* , *Penicillium spp* ومن الخمائر تستعمل *Candida* , *Torulopsis* ، والبكتريا المنتجة *Staphylococcus* , *Achromobacter* , *Pseudomonas* .

تستعمل الانزيمات في انضاج الجبن ، اما العاملة على الدهون الفوسفاتية فتستعمل في تحضير المستحلبات من ليسثين صفار البيض وليسثينات فول الصويا .

الانزيمات المؤكسدة Redox enzymes

الانزيمات التي تساهم في عمليات الأكسدة والاختزال وتساهم في تكسير وتخليق الجزيئات الحيوية . ومعظم هذه الإنزيمات تحتاج الى مرافقات Cofactors او مواد أساس مرافقة التي تشترك في التفاعلات . وفي عمليات التصنيع الغذائي فهي تؤدي عدة وظائف منها :

- منع تفاعلات الاسمرار .
- تعمل كاسحات للأوكسجين .
- منع تطور النكهات غير المرغوب فيها في للأغذية .

ومنها :

❖ Glucose oxidase يؤكسد الكلوكوز الى حامض الكلوكونيك Gluconic acid و

يؤكسد الأوكسجين الجزئي الى بيروكسيد الهيدروجين .

❖ إنزيم الكاتيليز يؤكسد جزيئات بيروكسيد الهيدروجين الى أوكسجين جزئي وماء

ويستعمل في البسترة الباردة للحليب .

❖ **Lipooxidases** تؤكسد الحوامض الدهنية غير المشبعة Polyunsaturated الى ما يقابلها من Hydroperoxides .

❖ **Oxidoreductases** انزيمات تساعد في عمليات الأكسدة والاختزال ومنها Peroxidases الذي يكون مهما في معاملة فضلات معامل الأعذية . ويستعمل انزيم Lactase (β - galactosidase) لتحليل سكر اللاكتوز في بعض المنتجات الغذائية لمنع تبلور السكر وإعطاء الحلاوة . ويستعمل الانزيم المقيد لتفكيك اللاكتوز الى كلوكوز وكلاكتوز في معامل التصنيع الغذائي .

المجسات الحيوية

تعد المجسات عنصرا ضروريا للسيطرة على عمليات التصنيع الغذائي . وعمليات السيطرة مهمة وهي ليست بالسهلة ، نظرا لحصول التفاعلات المعقدة الداينميكية عند تفاعل مواد خليطة مثل الانظمة الغذائية خصوصا عندما يراد استعمالها على نطاق صناعي ، وعند عدم السيطرة فان كل من مواد الاساس (المواد الأولية) والنواتج وعمليات التحفيز الحيوي وعدد الخلايا ومؤشرات اخرى سوف تكون ليست بالمستويات المثلى وتؤدي الى فشل العمليات التصنيعية .

تستعمل المجسات الحيوية بكافة أنواعها الإنزيمية او المعتمدة على خلايا الاحياء المجهرية بهدف السيطرة على العمليات التصنيعية . وكذلك الكشف عن صلاحية الأعذية الطبيعية والمصنعة للاستهلاك البشري . ولذلك تحتاج العمليات الى تسجيل مباشر او غير مباشر سريع للمؤشرات الدالة الى عدم سير العمليات بشكل سليم ، وعليه صممت مجسات دقيقة Micro-electronics للوصول الى عمليات سيطرة افضل .

تركيب المجسات : تتكون المجسات من أجزاء :

- الجزء الحيوي Biocomponent : تعتمد المجسات الحيوية على استعمال المواد الحيوية كجزء اساسي لتحسس مثل الإنزيمات او الخلايا الميكروبية ، او الأجسام المضادة وحيدة النسيلة ، او اللكتينات Lectins او الصبغات او قطع من DNA او قطع من أنسجة حيوانية او نباتية .
- الجزء الثاني الناقل Transducer وهي بشكل عام الكترودات خاصة بالايونات او الكترودات تتحسس الغاز او الحرارة وتقوم بتحويل الاشارة الكيموحيوية الى استجابة الكترونية . وعلى ضوءها تقسم المجسات الى انواع :

- مجسات لقياس الجهد الكهربائي Potentiometric وقياس الجهد الكهربائي للتفاعلات .
- مجسات قياس التيار الكهربائي Amperometric وتعمل بجهد كهربائي ثابت وتتحسس التغيرات بالتيار الكهربائي الناتجة من التفاعلات عند سطح الالكترود .
- مجسات التحسس الحراري Calorimetric وقياس الحرارة الناتجة من التفاعلات الحيوية .

• مجسات تحسس الضوء Optical وفيها يقيد الإنزيم على ألياف ضوئية وتقوم بقياس التغير في الإشارات الضوئية الناتجة من التفاعلات .

• مجسات الايصالية الكهربائية Conductimetric ومجسات لقياس الضغط الكهربائي Piezoelectric (قياس الضغط الكهربائي او كهربائية الاجهاد) وهذه المجسات تقيس التغير في ايصالية المحلول الناتجة من التفاعلات الانزيمية وما تنتجه من تغييرات في الايصالية الكهربائية .

ومجمل انواع المجسات الحيوية موضحة في الجدول (45) والنواتج التي يتحسس بها

جدول 45 : المجسات الحيوية المستعملة في فحص الاعذية

نوع المتحسس	المواد المتحسسة
Amperometric	H_2O_2 , I_2 , $NADH$, O_2
Field effect transistor	H^+ , H_2 , NH_3
Ion – selective	CN^- , CO_2 , H^+ , I^- , NH_4^+ , NH_3
Photomultiplier	انبعاث الضوء
Photodiode	امتصاص الضوء
Piezoelectric crystal	قياس الضغط الكهربائي
Thermistor	امتصاص الحرارة من التفاعلات الانزيمية وغيرها من التفاعلات

ويتم تقيد الجزء الحيوي من المجس عادة على سطح ناقل أي الجزء الثاني من المجس . ويمكن استعمال طرق عديدة لعملية التقيد مثل التقيد باستعمال Polyacrylamide او السليلوز او الاكروز او الالجينات ، او استعمال الأغشية مثل اغشية Acetyl cellulose .

وتستعمل المجسات الحاوية على الإنزيمات او الخلايا الميكروبية في عمليات التصنيع الحيوي للتسجيل والسيطرة على عدة مؤشرات منها قياس الحوامض الامينية والكحولات ، وتركيز اليوريا والامونيا وتركيز الحوامض العضوية مثل حامض الفورميك واللاكتيك وكذلك قياس الكلوكوز او الكليسرول وغيره من الجزئيات .

وتعاني المجسات الحيوية المستعملة من قلة ثباتيتها اذ تتراوح صلاحية معظمها بين 2 – 4 أسابيع ، وتكون مدة استجابتها بين 0.5 – 2 دقيقة للاغلبية . وتساعد المجسات في قياس مؤشر واحد في اغلب الأحيان ، كما انه لا يمكن تعقيمها اذ تتأثر بالمواد الكيماوية المعقمة والحرارة وغيرها من

طرق التعقيم . ويمكن استعمال المجسات للقياس المباشر او غير المباشر . والجدول (46) يوضح بعض مواصفات لبعض المجسات الحيوية المستعملة في التصنيع الغذائي .

جدول 46 : مواصفات بعض المجسات الحيوية الانزيمية المستعملة في مجال الصناعات

الغذائية

المادة المراد قياسها	الجزء المتحسس	نوعية التقييد	مدة الثباتية	وقت الاستجابة دقيقة	كمية الانزيم (Units)	مدى الحساسية (ملي مول)
الاسبارجين	ايون موجب	فيزيائية	شهر	1	50	$10^{-2} - 10^{-5}$
التايروسين	غاز ثنائي او كسيد الكربون	فيزيائية	3 اسابيع	1 - 2	25	$10^{-1} - 10^{-4}$
الحوامض الامينية يسارية الدوران (L)	Pt(H ₂ O ₂) Pt(O ₂) ايون موجب NH ₄ ⁺ I ⁻	كيمياوية كيمياوية فيزيائية كيمياوية كيمياوية	4-6 شهر 4 اشهر اسبوعين اقل من شهر اقل من شهر	12 ثانية 1 2-1 3-1 3-1	10 10 10 10 10	$10^{-3} - 10^{-5}$ $10^{-2} - 10^{-4}$ $10^{-2} - 10^{-4}$ $10^{-2} - 10^{-4}$ $10^{-3} - 10^{-4}$
الحوامض الامينية يمينية الدوران (D)	ايون موجب	فيزيائية	شهر	1	50	$10^{-2} - 10^{-5}$
الكبريتات	Pt	كيمياوية	شهر	1	10	$10^{-1} - 10^{-4}$
الكلوتامين	ايون موجب	ذائب	يومان	1	50	$10^{-1} - 10^{-4}$
النترات	NH ₄ ⁺	ذائب		2-3	10	$10^{-2} - 10^{-4}$
النترت	غاز الامونيا	كيمياوية	3-4 اشهر	2-3	10	$10^{-2} - 10^{-4}$
اليوريا	ايون موجب ايون موجب pH	فيزيائية كيمياوية فيزيائية	3 اسابيع 4 اشهر 3 اسابيع	30 ثانية 2-1 5-10	25 10 100	$10^{-2} - 10^{-5}$ $10^{-2} - 10^{-4}$ $10^{-3} - 10^{-5}$

10^{-4} - 10^{-2}	0.5	4-1	20 يوم	كيمياوية	غاز الامونيا	
10^{-4} - 10^{-2}	25	2-1	3 اسابيع	فيزياوية	غاز ثنائي او كسيد الكربون	
10^{-4} - 10^{-1}	10	30 ثانية	4 اشهر	كيمياوية	Pt(O ₂)	حامض الخليك
10^{-4} - 10^{-3}	2	10-3	اسبوع	ذائب	Pt[Fe-(CN) ₆ ⁴⁻]	حامض اللاكتيك
10^{-4} - 10^{-2}	10	30 ثانية	4 اشهر	كيمياوية	Pt(O ₂)	حامض اليوريك
10^{-4} - 10^{-1}	50	1	يومان	ذائب	ايون موجب	حامض الكلوتاميك
0.5-100 ملغم %	10	12 ثانية	اسبوع	ذائب	Pt(H ₂ O ₂)	كحولات
0.5-100 ملغم %	10	30 ثانية	4 اشهر	فيزياوية	Pt(O ₂)	
10^{-3} - 10^{-1}	100	10 - 5	اسبوع	ذائب	pH	كلوكوز
10^{-4} - 10^{-2}	10	12 ثانية	6 اشهر	كيمياوية	Pt(H ₂ O ₂)	
10^{-4} - 10^{-2}	10	1	14 شهر	كيمياوية	Pt(H ₂ O ₂)	
10^{-5} - 10^{-1}	10	1	4 اشهر	كيمياوية	Pt(O ₂)	
10^{-4} - 10^{-3}	10	8 - 2	شهر	كيمياوية	I-	
10^{-4} - 10^{-2}	20	5 - 2	3 اسابيع	فيزياوية	غاز الاوكسجين	
10^{-4} - 10^{-2}		2		ذائب	Pt(H ₂ O ₂)	كولسترول

مجسات عد الخلايا الميكروبية

تحتاج عمليات التصنيع الغذائي المعتمدة على التخمرات التي تقوم بها الاحياء المجهرية الى تسجيل عدد الخلايا وهذه في اغلب الاحيان لا يمكن ان تتم بصورة مباشرة ، اذ تقاس بعض المؤشرات وتقارن مع منحنيات تعبير Standard curves معدة مسبقا لتحديد العدد وان كان بشكل تقريبي ومن المؤشرات المقاسة :

- قياس الكثافة الضوئية .
 - قياس ATP .
 - قياس مواد الايض ذات شحنة محددة .
 - قياس الصفات الكهربائية للنماذج مثل قياس الايصالية الكهربائية .
- وتحضر المجسات او تعتمد على تقييد الخلايا الميكروبية كاملة ، فتوجد مجسات تحوي على الخميرة *Trichosporon cutaneum* لقياس الطلب الحيوي للاوكسجين BOD ومجسات اخرى قيدت فيها خلايا *E. coli* لقياس كمية ثنائي اوكسيد الكربون او كمية حامض الكلوتاميك .

المجسات الانزيمية

وتتكون من دائرة كيميائية كهربائية ، اذ يكون الجزء الكهربائي باتصال مع طبقة من جزئيات الانزيم المقييد ويمكن ان يتحسس بمواد الاساس ونواتج التفاعلات الانزيمية . وتكون ذات مدة صلاحية محدودة ، ودرجة تحسس محدودة كما موضح في الجدول المذكور اعلاه .

مجسات الخلايا الميكروبية والعضيات

وتكون الاجزاء الحيوية منها حاوية على خلايا ميكروبية مقيدة او قطع من الانسجة او عضيات خلوية . وتقيد بشكل مناسب وقد طور منها عدد كبير للاستعمال في مجال التصنيع الغذائي .

مسابر DNA

لهذه المسابر تطبيقات كبيرة جدا خاصة في مجال الكشف عن تلوث الاعذية ، وتعتمد المسابر على عملية التهجين للحوامض النووية لتحديد الكائنات الميكروبية مثل البكتريا والفيروسات وغيرها في خليط من الاعذية والسوائل .

وتستعمل في تحضير هذه المسابر اشربة مفردة ssDNA لتواليات محددة من DNA بطول 10 – عدة الالاف من النيوكلويتيدات وتعلم بمواد خاصة مثل ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I والتي يمكن ان تصمم لاغراض خاصة ، وهذه الاشربة المفردة تتكامل مع مكملاتها ان وجدت في النماذج المفحوصة .

بعد تقييد DNA تحضر النماذج المراد الكشف عنها اذ تقييد على اغشية Nitrocellulose او الياف النايلون لغرض التهجين ، تنقل المستعمرات او أي نموذج اخر الى الاغشية وتعامل بالمواد

القلوية للتخلص من المواد الحيوية ما عدا DNA ويثبت الاخير بالحرارة ولمدة معينة ثم تفاعل مع المسابر المعلمة ويحدد التهجين بـ Autoradiography . وقد امكن باستعمال هذه المسابر من الكشف عن اكثر من 350 سلالة من بكتريا *Salmonella* في الاغذية .

توجد مسابر عشوائية تستعمل للكشف عن وجود الانواع الميكروبية دون تحديد ، وتوجد اخرى حاملة لاشرطة او معلومات مسئولة عن السموم الميكروبية وتستعمل للكشف عن الاحياء المسببة للتسمم الغذائي .

الصناعات الغذائية

صناعة اللحوم

تستهلك اللحوم ام طازجة او مصنعة ، والدراسات الوبائية الواسعة تدل على ان هناك علاقة وثيقة بين استهلاك اللحوم وخاصة الحمراء وسرطان القولون ، اضافة الى العلاقة الوثيقة مع امراض اخرى مثل امراض القلب التاجية وغيرها .

ويتم تصنيع اللحوم لتحسين النكهة ولاغراض اخرى وكذلك لإطالة مدة الصلاحية ومنع التلف دون التأثير على القيمة الغذائية ، وتستعمل انواع من الاحياء المجهرية في تخمير اللحوم ومنها المذكورة في الجدول (47) .

جدول 47 : البوائى المستعملة في تخمرات اللحوم

مجموعة الاحياء	الاحياء المستعملة	الاستعمال
الفطريات	<i>Pen. chrysogenum</i> <i>Pen. nalgiovense</i>	لإعطاء النكهة ، اللون وتحسين الجوانب الصحية
بكتريا حامض اللاكتيك	<i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. sakei</i> <i>Ped. acidilactici</i> <i>Ped. pentosaceus</i>	لإعطاء النكهة ، اللون ، زيادة مدة الصلاحية ، تحسين الجوانب الصحية ، زيادة قابلية التقطيع
Micrococcaceae	<i>M. varians</i> <i>Staph. carnosus</i> <i>Staph. xylosus</i>	لإعطاء النكهة واللون
Streptomycetaceae	<i>Streptomyces griseus</i>	لإعطاء النكهة
الخمائر	<i>Candida famata</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>	لإعطاء النكهة واللون

وكما يلاحظ من الجدول ان الاغراض تكون متعددة منها تحسين النكهة ، واللون واطالة مدة الصلاحية وغيرها من الاغراض .

والاحياء المستعملة في صناعة اللحوم هي بكتريا حامض اللاكتيك اضافة الى احياء اخرى مثل Micrococci والبكتريا العنقودية والخمائر وبعض الاحيان الفطريات . كما تستعمل الانزيمات لغرض تقديد اللحوم Tenderization . وتقوم بكتريا حامض اللاكتيك باعطاء اللحم الطعم الحامضي وخفض الارقام الهيدروجينية الذي يزيد من صفة عصيرية اللحم Juiciness وتعطي اللحم النسجة الصلبة المتماسكة . وتقوم ايضا بمضادة الاحياء المجهرية المرضية مثل بكتريا *Salmonella* , *Staph. aureus* .

واهم بكتريا حامض اللاكتيك المستعملة في هذا المجال *Pediococcus cerevisiae* , *Lb. plantarum* . وتخمر اللحوم باضافة البودائ يؤدي الى خفض مستويات الهستامين . واثناء انضاج اللحم تزداد اعداد خلايا البودائ من العصيات اللبنية لتصل الى 10^8 - 10^9 / غم طول مدة التخمر ، بينما يكون تعداد الاحياء الاخرى مثل العنقوديات *Staph. xylosus* , *Staph. carnosus* بمعدلات 10^6 - 10^7 وحدة تكوين مستعمرات / غم وهذه تقل اعدادها عند استعمال النتريت NO_2^- الذي يستعمل لتحسين لون اللحوم ، وكذلك يقل تعدادها عند انخفاض الرقم الهيدروجيني . وعلى العموم يكون تعداد الاحياء على السطوح اكثر حيث وفرة الأوكسجين . وبكتريا حامض اللاكتيك المضافة تتنافس مع الاحياء الاخرى وتؤثر هي ومكونات البادئ الاخرى والفلورا الطبيعية على مكونات اللحوم من البروتينات والدهون . اذ تتأثر الاخيرة وتنتج خلال عمليات التخمر حوامض دهنية طويلة السلسلة من الكليسيريدات الثلاثية والدهون الفوسفاتية ليصل مستواها الى 5 % من الحوامض الدهنية الكلية . وتشارك الانزيمات الداخلية في اللحوم في هذه التحولات .

وتؤثر عمليات تخمر اللحوم على مركبات النكهة والتي تتكون من :

- مواد نكهة متطايرة وهي التي تنتج من تحلل الدهون والدهون الفوسفاتية والتي يليها اكسدة الحوامض الدهنية المتحررة .
- مواد منتجة من الاحياء المجهرية وتشمل حوامض عضوية ومواد ناتجة من تحلل البروتينات مثل الحوامض الامينية والبيبتييدات التي تحول الى مركبات نكهة مثل الكحولات والاستالديهايد وحوامض اخرى تؤثر في او تحور عمليات أكسدة الدهون .
- مواد النكهة تنتج من الفطريات والخمائر العاملة في الانضاج السطحي للحوم .

وتستعمل البوادىء كما ذكر أعلاه لأكثر من غرض وتم تبين بعضها اما الجوانب المهمة هي الجوانب الصحية او العلاجية فاللحم المتخمر او النقانق او ما يسمى بالصوصج يمكن ان يعد للاغراض العلاجية وقد انتجت مثل هذه المنتجات اللحمية الحاوية على *Lb. paracasei* والبكتريا المنشطرة . واستهلاك هذه اللحوم يؤثر على الكثير من المؤشرات في الدم ، فالاشخاص اللذين يتناولون اللحوم المخمرة العلاجية ازدادت عندهم عدد الخلايا التائية $CD4^+$ وكذلك ازداد معامل الابتلاع PI (Phagocytic index) للخلايا الابتلاعية الكبيرة ، وحصلت زيادة في الاجسام المضادة ، وتغيرت مؤشرات الدهون نحو الافضل .

ولكن على الجانب الثاني يلاحظ ان عمليات تخمر اللحوم تنتج بعض الامينات الحيوية Biogenic amines اذ قد تصل تراكيزها من صفر - 100 ملغم / كغم وهي تشمل Phenylethylamine , Tyramine , Histamine , Tryptamine , Cadaverine , Putrescine . وتنتج من فعالية الاحياء المجهرية التي تقوم بازالة ثنائي اوكسيد الكربون من الحوامض الامينية . وتختص البكتريا السالبة لصبغة كرام بانتاج Cadaverine , Putrescine . وعند زيادة تركيز الهستامين والتايرامين فانها تكون مضره بالجسم ، ووجودهما يعد دليلا على رداءة اللحم . وبعض افراد بكتريا حامض اللاكتيك يمكن ان تستعمل الهستامين لانتاج الحامض الاميني الهستيدين ، و Tyramine لانتاج الحامض الاميني التايروسين و Putrescine لانتاج الحامض الاميني الاورنيثين . لذلك فحسن اختيار البوادىء يؤدي الى نتيجة افضل ، فبعض بكتريا حامض اللاكتيك تكون فعالية الانزيم المزيل لثنائي اوكسيد الكربون من التايروسين Tyrosine decarboxylase واطنة لذلك لا تنتج كميات كبيرة من Tyramine .

تصنيع الحبوب

لا يخفى على احد ما للحبوب ومنتجاتها من اهمية واستخدام كبير فهي المحصول الاهم والاول واللاعب الرئيس في سياسات الدول ولها استعمالات كثيرة مباشرة وغير مباشرة .

الاستعمالات المباشرة

هو الاستعمال في التغذية العامة للانسان والحيوان . ويعتري بعض بروتينات الحبوب مثل الحنطة والشعير بعض القصور في اداء بروتيناتها التي قد لا تكون ملائمة ويؤدي الى اهمال استعمال الكثير من الضروب في الاستعمال المباشر ، ومنها ضعف الكلوتين لذلك استغلت الهندسة الوراثية لتعديل هذه البروتينات ومنها ادخال مواقع لعمل الجسور ثنائية الكبريتيد واستعمال انزيم اللايسوزايم من العائي T4 الذي يزيد من ثباتية البروتينات خاصة تجاه الحرارة .

وقد امكن باستعمال الاشعة السينية تحديد تركيب البروتينات وتحديد مواقع ثملالات السستيين اللازمة لتكوين الاواصر الكبريتيدية . والحقيقة ان تدخلات الهندسة الوراثية في تغيير الحبوب وصفاتها هي الشغل الشاغل للعاملين في مجال التقنية الحيوية النباتية .

الاستعمالات غير المباشرة للحبوب

تشمل انتاج شراب الذرة الغني بالفركتوز HFCS (Hihg – fructose corn syrup) الذي له حلاوة اكثر من السكروز وينتج من تحليل نشا الحبوب الى كلوكوز او كلوكوز وفركتوز . ويكون الناتج حاويا على 42 % فركتوز ، ويمكن تحويل الكلوكوز الناتج الى فركتوز باستعمال انزيم Glucose isomerase الذي وجد انه ينتج من العديد من الكائنات . وعمليات تحضير HFCS تنتج ايضا Maltodextrins التي لها استعمالات خاصة في التصنيع الغذائي ، وبذلك تكون الحبوب من المحاصيل السائدة لتقليل سحب السكروز من اسواقه الخاصة به .

ومن الصناعات غير المباشرة بتصنيع الحبوب ايضا انتاج خميرة الخبز التي تعمل على تخمير طحين الحبوب نظرا لاحتوائها على الانزيمات اللازمة ومنها انزيمات دورة تحلل السكر Glycolysis واهم الانزيمات العاملة فيها Pyruvate kinase (PK1) و Phospho- fructokinase (PK2) التي تسيطر على عمليات التخمير .

وتستعمل في انتاج خميرة الخبز سلالات سريعة النمو لتعطي حاصلا عاليا من الكتلة الحيوية على شرط عدم انحراف الظروف الى الظروف اللاهوائية التي تؤدي الى انتاج الكحول . وتنمو الخميرة في العجين بشكل بطيء نظرا للطبيعة المعقدة لمكوناته لذا وجب اضافتها بمستويات عالية ، وقد كانت تستخدم قديما على شكل عجين قديم (خمرة) يضاف الى وجبات جديدة . وقد طرات تغييرات كبيرة على عمليات انتاج الخميرة لتطال كل كبيرة وصغيرة في العملية الانتاجية نظرا لكونها من المنتجات الاقتصادية المهمة . وانتاجها يمثل عمليات انتاج الكتلة الحيوية أي مواد ايض اولي . وتسوق بعدة أشكال .

وتتناول التغييرات على خميرة الخبز محاولات إيجاد سلالات تتحمل إجهاد درجات الحرارة خاصة الواطنة لغرض استعمالها في المعجنات التي تنتج بكميات كبيرة وتحفظ بالتجميد لحين اجراء عمليات الخبز

صناعة الزيوت والدهون

تعد الزيوت والدهون من المكونات الاساسية في التغذية وتتعرض للعديد من عمليات التصنيع التي تدخل فيها الانزيمات المحللة للدهون Lipases بشكل فعال في عمليات التصنيع وتشارك عمليات التقنية الحيوية باحيائها المجهرية بشكل فعال في عمليات الانتاج لتشكل رافدا جديدا اضافة الى المصدر التقليدية من المصادر الحيوانية والنباتية اضافة الى دخولها في عمليات تحويل الدهون .

انتاج الزيوت والدهون الميكروبية

يمكن انتاج العديد من هذه المواد من عدد كبير من الاحياء المجهرية ويطلق عليها SCO (Single cell oil) ، وتوجد مجاميع مختلفة من الاحياء المنتجة للدهون Oleaginous خاصة من الخمائر والفطريات ومنها الموضحة في الجدول (48) .

وهناك اعداد قليلة من البكتريا المنتجة للدهون مثل *Nocardia* , *Corynebacterium* , *Mycobacterium* ولكن الدهون المنتجة من هذه الاحياء وبكتريا اخرى تميل للتحلل مؤدية الى انتاج مواد مولدة للحساسية وذات طابع سام . اما البكتريا *Arthrobacter* (AK 1a) وهي من بكتريا التربة المستهلكة للهيدروكربونات الواطئة الوزن الجزيئي وعند نموها على الكلوكون تجمع 80 % من الوزن دهون و 90 % من الدهون المتجمعة هي من Triacylglycerols و 50 % من حوامضها الدهنية من الحوامض غير المشبعة . وتصل افضل انتاجية لها 12.5 – 14 غم من الدهون / 100 غم كلوكون عند وصول الكتلة الحيوية تحت الظروف الملائمة الى 20 غم / 100 غم من الكلوكون .

جدول 48 : الاحياء المجهرية المنتجة للدهون ونسبة الدهن فيها

النسبة المئوية	الكائن المنتج
الخمائر	
58	<i>C. curvata</i>
65	<i>Endomycopsis vernalis</i>
63	<i>Lipomyces starkeyi</i>
66	<i>Rhodospiridium toruloides</i>
45	<i>Trichosporon cutaneum</i>
65	<i>Cryptococcus terricolus</i>
63	<i>Lipomyces lipofer</i>
64	<i>Lipomyces tetrasporus</i>
71	<i>Rhodotorula glutinis</i>
65	<i>Trichosporon pullulans</i>
الفطريات	
45	<i>Entomophthora coronata</i>
56	<i>Cunninghamella elegans</i>
45	<i>Mucor albo-ater</i>
51	<i>Mucor muceus</i>
47	<i>Mucor spinosus</i>
49	<i>Pythium ultimum</i>
51	<i>Asp. nidulans</i>

57	<i>Asp. terreus</i>
50	<i>Fusarium bulbigenum</i>
56	<i>Penicillium lilacinum</i>
46	<i>Sclerotium bataticola</i>
51	<i>Ustilago zeae</i>
45	<i>Cunninghamella echinulata</i>
66	<i>Mortierella vinacea</i>
65	<i>Mucor circinelloides</i>
56	<i>Mucor ramannianus</i>
49	<i>Rhizopus arrhizus</i>
53	<i>Aspergillus fisheri</i>
48	<i>Aspergillus ochraceus</i>
54	<i>Chaetomium globosum</i>
48	<i>Gibberella fujikuroi</i>
45	<i>Geotrichum candidum</i>
48	<i>Tricholoma nudum</i>

اما دهون الفطريات والخمائر فتحتوي على 80 – 90 % من Triacylglycerols . والكليسريدات الثلاثية المنتجة من الخميرة *C. curvata* لها مدى انصهار مشابه لزبدة الكاكاو وتحتوي على حوامض دهنية بكميات مختلفة مثل , Palmitic acid , linoleic acid , Oelic acid , Stearic acid , Palmitoleic acid . واكثر الدهون الميكروبية تكون مشابه للزيوت النباتية من حيث محتواها من الحوامض الدهنية غير المشبعة .

ومعظم الزيوت المنتجة من الخمائر تشبه Palm oleon الذي هو جزء من زيت النخيل ذو درجة انصهار واطنة ، كما ان زيوت الخمائر تمتاز بكونها سهلة التجزئة لتعطي زيوت غير مهدرجة Non – hydrogenated ومشتقات اخرى .

اما الطحالب وخاصة الصغيرة Microalgae يمكن ان تتفوق على انتاج الزيوت من فول الصويا الزيتي بمعدل 30 ضعف ، ويصل محتوى الزيوت في الطحالب الصغيرة الى 12.5 – 40 % .

ولذا يمكن استغلال الأحياء المجهرية لإنتاج الدهون وذلك باستعمال مواد اولية رخيصة ، اضافة الى ان وقت الجيل لها قصير جدا وبذا تكون اقتصادية جدا مقارنة بالمصادر الاخرى .

تحويل الزيوت

يمكن استعمال الأحياء المجهرية لتحويل الزيوت وتغيير من الصفات غير المرغوبة فيها . وتستعمل الخميرة *C. lipolytica* لتحويل الدهون مثل اختزال كميات Liolenate ، اضافة الى

إمكانية إجراء تحويل على الكولسترول في الدهون الحيوانية ، ويمكن للأحياء المجهرية إزالة بعض مكونات الزيت غير المرغوب فيها .

انتاج الفيتامينات

من مكونات الاغذية التي يحتاجها الجسم بكميات قليلة مقارنة بمكونات الاغذية الاخرى ، فهي عوامل نمو ، وتوجد في معظم الاغذية لذلك فلم تزدهر صناعتها بشكل كبير . ولكن البعض منها ينتج من قبل الاحياء المجهرية ومنها :

الرايبوفلافين الذي يوجد في الحليب بشكل حر . يدخل الرايبوفلافين في بعض الجزئيات الحيوية في الجسم . وينتج على نطاق تجاري من الفطريات الشبيه بالخمائر الممرضة للنباتات *Ashbya gossypii* التي تسبب الامراض لنبات القطن . وتستعمل في الانتاج التجاري وكذلك تستعمل *Eremothecium ashbyii* وبعض الأحيان تستعمل أحياء اخرى للانتاج مثل

Mb. smegmatis , *Mycocandida riboflavina* , *C. flareii* . *Cl. acetobutylicum*

وتجري عمليات تحسين الاحياء لنقل الانظمة الجينية المسؤولة عن التخليق الى احياء ملائمة للتصنيع مثلا تمتاز بسرعة النمو وغزارة الانتاج .

ويمثل الفيتامين احد مواد الايض الاولي المرتبطة بعملية النمو لذلك تحور العمليات الإنتاجية لإطالة الطور اللوغاريتمي ، ومن جهة ثانية وبما انه من مواد الايض الاولي فهذا يعني بقاءه في داخل الخلايا الحية لذلك يتم التلاعب بتركيب وسط التخمر الذي يؤثر على تركيب الأغشية الخلوية لجعلها أكثر نضوحاً للمادة والتخلص من عمليات تنظيمية التي تسمح بانتاج مستوى معين ، او استعمال طفرات تكون أغشيتها ناضجة .

انتاج فيتامين B12 : يحتاج الجسم الى كميات قليلة من هذا الفيتامين Cobalamine والحاجة اليه قليلة نظرا لانتاجه من قبل الفلورا الطبيعية للجسم ، اضافة الى انتشاره في العديد من الاغذية .

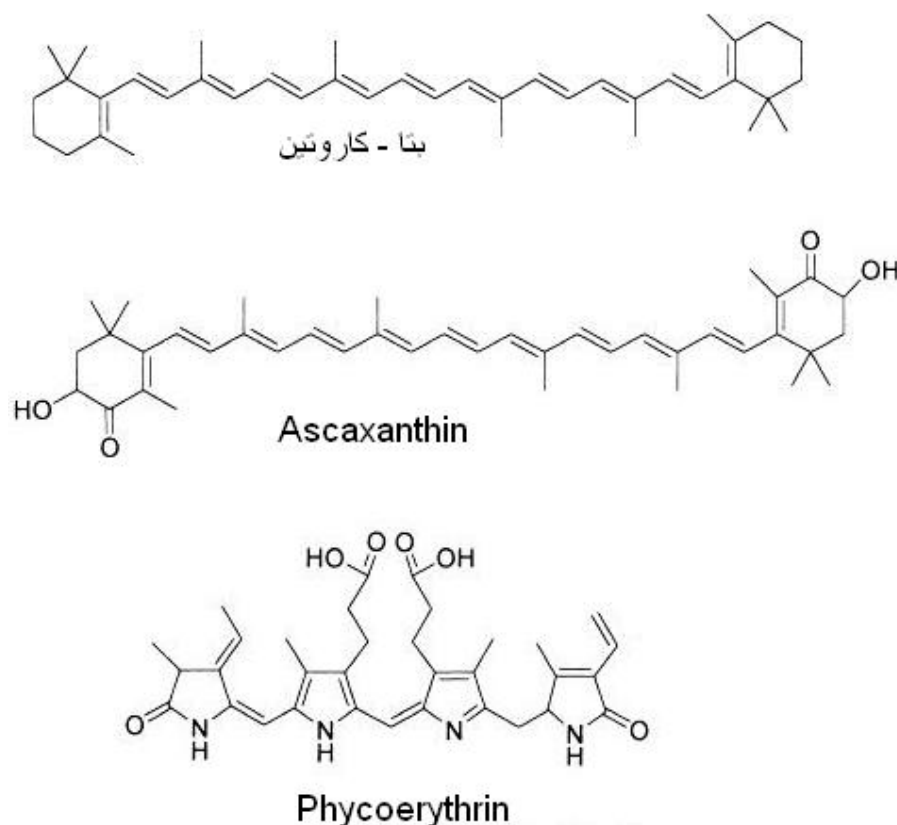
ينتج على نطاق تجاري من البكتريا ومنها انواع الجنس *Propionibacterium* التي يترواح انتاجها 12 – 19 ملغم / لتر من وسط التخمر ، وينتج ايضا من البكتريا *Ps. denitrificans* التي يصل انتاجها الى 20 ملغم / لتر .

وهو من مواد الايض الاولي وينتج من البكتريا الاخيرة تحت الظروف الهوائية وتزود الاوساط الغذائية بمواد خاصة لزيادة الانتاجية . وبما انه من مواد الايض الاولي لذا يتم الحصول عليه بعد تكسير الخلايا .

اما الفيتامينات الاخرى فتكون عمليات انتاجها محدودة ولكل فيتامين سلالاته الخاصة للانتاج وظروف الانتاج الملائمة . والمواد الأولية المستعملة هي مواد عامة ولكن تدعم بمركبات خاصة لزيادة الإنتاج .

انتاج الكاروتينات

وتعد هذه المركبات طلائع لفيتامين A كما انها تستعمل كملونات غذائية في منتجات الالبان والاعلاف وغيرها وتوجد منها مشتقات كثيرة موضح بعضها في الشكل (76) . وتستعمل كمواد مضادة للأكسدة لذلك تضاف الى الاغذية العلاجية . ويعتمد الانتاج التجاري في دول الشرق الاقصى على الطحالب الصغيرة . كما ينتج فيتامين A من الفطر *Blakeslea trispora* اثناء تزاوج سلالات مختلفة . وتوجد احياء اخرى منتجة ولكن لا تستعمل على نطاق تجاري .



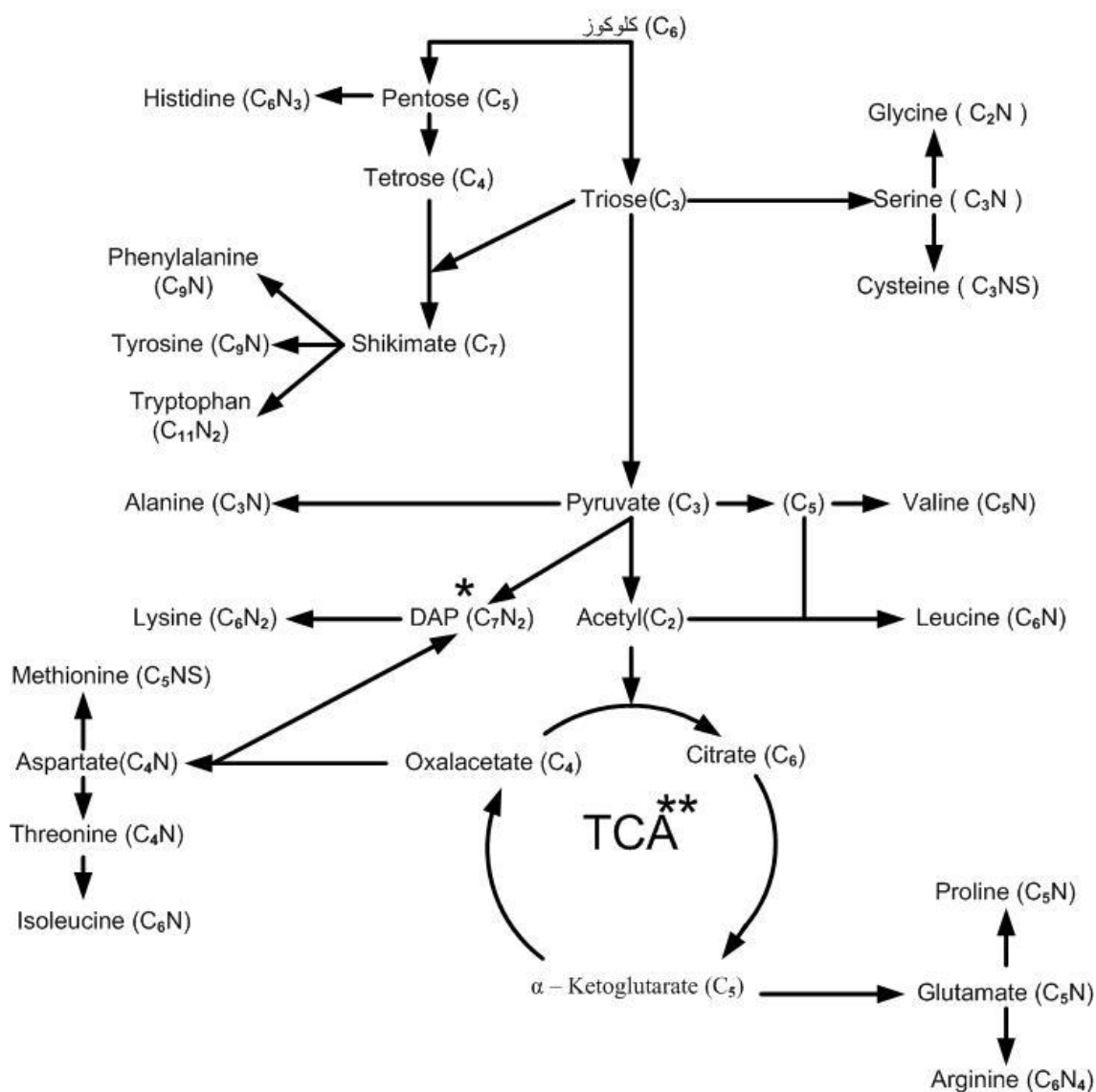
شكل 76 : بعض الصبغات المنتجة من الطحالب

انتاج الحوامض الامينية

الحوامض الامينية وحدات بناء البروتينات وعادة تكون في الانظمة الحيوية من النوع اليساري الدوران (L) ، وتنتج بعضها على نطاق تجاري واسع لتدعيم الاغذية او لاغراض اخرى . والاعذية التي تدعم هي البروتينات النباتية التي تنقصها بعض الحوامض الامينية مثل اللايسين والثريونين والتربتوفان والميثايونين . وفي بعض الاحيان تضاف لاعطاء النكهة مثل حامض الكلوتاميك ، ولها استعمالات اخرى في مجال الطب والصناعة .

والحوامض الامينية من مواد الايض الاولى ، لذلك فان عمليات الانتاج التجاري يجب ان تستهدف وان يؤخذ بنظر الاعتبار الاتي :

استهداف الاغذية الخلوية ونضوحيتها لذا يعنى بتركيب الوسط الغذائي لتغير النضوحية ، او اضافة بعض المواد التي تؤثر على النضوحية او اجراء التغييرات الوراثية واستعمال طفرات ناضحة الحوامض الامينية يتم انتجها ضمن شبكة من المسارات وعمليات التنظيم الخلوي الداخلي كما موضح في الشكل (77) .



* DAP = Diamino pimelpic acid

** TCA = Tricarboxylic acid cycle

شكل 77 : مسارات تخليق الحوامض الامينية

ويستوجب تغيير عمليات التنظيم لغرض انتاج حامض اميني معين .
وتنتج على نطاق تجاري يصل في حالة حامض الكلوتاميك الى مئات الاطنان او اكثر سنويا .
واهم الاحياء المستعملة لانتاج الحوامض الامينية هي بكتريا *C. glutamicum* ,
والسلالات المستعملة عادة تكون محورة وراثيا فهي اما طفرات عوز غذائي او
مقاومة لبعض مضاهيات القواعد النتروجينية او الحوامض الامينية والجدول (49) يوضح اهم
السلالات المستعملة ومواصفاتها .

جدول 49 : مواصفات البكتريا المستعملة في انتاج الحوامض الامينية

الحامض الاميني	السلالة المستعملة	الصفات الوراثية	المصدر الكربوني	معدل الكمية المنتجة (غم/لتر)
الهستدين L	<i>Brev. flavum</i>	TA ^r SM ^r Eth ^r	كلوكوز	10
ايزوليوسين L	<i>Brev. flavum</i>	AHV ^r MT ^r	كلوكوز	15
الليوسين L	<i>Brev. lactofermentum</i>	Ile ⁻ , Met ⁻ ,TA ^r	كلوكوز	28
اللايسين L	<i>C. glutamicum</i> <i>Brev. flavum</i> FAI- 30 <i>Brev. flavum</i>	Hom ⁻ , Leu ⁻ , AEC ^r AEC ^r Hom ^{leaky} ,Thr ⁻	كلوكوز كلوكوز خلات	39 57 75
ميثايونين L	<i>C. glutamicum</i> KY9276	Thr ⁻ Eth ^r Met Hx ^r	كلوكوز	2
الاورنثين L	<i>C. glutamicum</i>	Arg ⁻	كلوكوز	26
الفنيل-النين L	<i>C. glutamicum</i>	Tyr ⁻ PEP ^r PAT ^r	كلوكوز	9
البرولين	<i>Brev. flavum</i>	Ile ⁻ SG ⁻ DHP ⁺	كلوكوز	229
الثريونين L	<i>Brev. flavum</i>	Met ⁻ AHV ^r	كلوكوز	18
الثريونين L	<i>Brev. flavum</i>		خلات	27
الثريونين L	<i>E. coli</i> K12	زيادة في جرع الجينات	سكروز	57
الالنين L	<i>Strep. coelicolor</i>	نوع طبيعي	كلوكوز	9
الالنين DL	<i>Microbacterium ammoniphilum</i>	ArgHx ⁻	كلوكوز	60
ارجينين L	<i>Brev. flavum</i>	Gua ⁻ TA ^r	كلوكوز	35
حامض الكلوتاميك L	<i>C. glutamicum</i>	نوع طبيعي	كلوكوز	100

98	خلات	نوع طبيعي	<i>Brev. flavum</i>	حامض الكلوتاميك L
82	n- Alkanes	نوع طبيعي	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	حامض الكلوتاميك L
12	كلوكوز	Phe ⁻ Tyr ⁻ 5MT ^r 6FT ^r 4MT ^r PAP ^r TyrHx ^r PheHx ^r	<i>C. glutamicum</i> Px	التربتوفان L
18	كلوكوز	Phe ⁻ PEP ^r PAP ^r	<i>C. glutamicum</i> Pr-20	التايروسين L
31	كلوكوز	TyrHx ^r	<i>Brev. lactofermentum</i> 487	الفالين L

مختصرات الواسمات الوراثية :

AEC:S- (β – amino ethyl) – L- Cysteine

AHV : α –amino-β-hydroxyvaleric acid

ArgHx : arginine hydroxamate

DHP : 3,4 –dehydroproline

Eth : ethionine

MetHex: methionine hydroxamate

4MT : 4- methyl tryptophan

5MT : 5 – methyl threonine

PAP : P – Amino phenylalanine

PAT : P- aminotyrosine

PEP :P- fluoro phenylalanine

PhenHx : phenylalanine hydroxamate

SG : sulfaguanidine

SM : selenomethionine

TA : 2- thiazolalanine

TyrHx : tyrosine hydroxamate

وتتأثر العمليات الانتاجية بعوامل تكون متخصصة بالسلالة المنتجة .

ويمكن ان تنتج الحوامض الامينية من التحولات الحيوية اتي تجري على المركبات الوسطية في حالة توفرها ، وطريقة التخمير هي الافضل لانها تنتج النظير اليساري وذلك لقابلية الاحياء على مزامرة الحوامض . وتكون عمليات التحول الحيوي اقل كلفة من عملية التخمير ويمكن ان تتم باستعمال الانزيمات الملائمة او الخلايا الكاملة (الهاجة) ويفضل ان تكون العوامل المحولة مقيدة . وتوجد العديد من الانزيمات التي تنتمي الى اصناف مختلفة تقوم بالتحول الحيوي حسب الحامض او المركب الوسطي المراد تحويله والنتائج المطلوب .

انتاج مركبات النكهة

تحتاج عمليات التصنيع الغذائي الى اضافة النكهات لزيادة تقبل المستهلك للاغذية ، اذ تساعد على اخفاء النكهات غير المرغوب فيها ولكن يجب ان تستعمل بكميات قليلة لا تتجاوز 0.01 % وان لا تضاف لاختفاء عيوب الغذاء . وتختلف مركبات النكهة فيما بينها فبعضها تكون مركبات عضوية قليلة الوزن الجزيئي واخرى تكون حوامض امينية او نيوكلوثيريدات . وبعض المركبات تنتج تجاريا والاخر ينتج من قبل الاحياء المجهرية المستعملة كبرادى او توجد كملوثات في المواد الاولية . ومن اهم مواد النكهة :

- املاح حامض الكلوتاميك Monosodium glutamate التي تضاف الى المواد الغذائية لاعطاء نكهة الصويا او غيرها من النكهات ، وتنتج من البكتريا *C. glutamicum* بمستوى الاطنان .

- نيوكلوثيريدات النكهة ومنها النيوكلوثيريدات البيورينية ومن اهمها 5'- IMP (5'- inositol) و 5'-GMP (5'- guanosine monophosphate) وغيرها من النيوكلوثيريدات ، وتنتج هذه المجموعة من مركبات النكهة بعمليات التخمير باستعمال الاحياء المجهرية مثل بكتريا *B. subtilis* والتي تعد المنتج الاول وتستعمل ايضا البكتريا *C. glutamicum* او بكتريا *Brevibacterium* . والسلالات المنتجة تكون طفرات عوز غذائي لمكونات النيوكلوثيريدات مثل الادنين او تكون مقاومة لبعض المركبات او تنقصها بعض الانزيمات العاملة في مسارات تخليق الحوامض النووية وذلك وللوصول الى الانتاج المفرط يتم التأثير على عمليات تنظيم هذه المواد التي هي مواد ايض اولي والتي تكون عمليات تنظيمها صارمة . كما يمكن الاعتماد على عمليات التخمير لانتاج مركبات معينة ثم تجرى عليها التحويلات الكيماوية لانتاج المركب النهائي وكل هذه المركبات تم تضخيمها باستعمل تقنيات DNA المتأشب (rDNA) . وتنتج المركبات ايضا من تحليل الحوامض النووية مثل تحليل RNA انزيميا .

• مركبات النكهة الاخرى

ثنائي الاستيل وهو مركب النكهة الاساسي في الزبد المنضج ، المركب ذو فعالية تثبيطية قوية ضد عدد كبير من الاحياء المجهرية الملوثة للاغذية خاصة الاحياء المحللة للدهون . ينتج من سلالات خاصة من بكتريا حامض اللاكتيك منها *Lactococcus lactis ssp cremoris* او افراد من جنس *Leconostoc* مثل *Le. citrovorum* , *Le. dextranicum* . وينتج في الحليب المضاف اليه السترات او الاوساط الغذائية الحاوية على السترات التي تعد المواد الاساس لانتاجه بعد ان تحول الى المركب الوسطي البايروفات .

وهناك مركبات اخرى تعطي نكهات مختلفة تستعمل الاحياء المجهرية وخاصة الفطريات في

انتاجها كما موضح في الجدول (50) .

جدول 50 : مركبات النكهة المنتجة من الاحياء المجهرية المستعملة في الاعذية وغيرها من الاعراض

الكائنات المنتجة	التركيب الكميائي	النكهة
<i>Trichoderma viride</i>	6-pentyl-pyrone	نكهة الكاكاو
<i>Ascoidea hylacoeti</i>	β -phenylethanot-furan-2- carboxylate	نكهة الفواكه والورد
<i>Ceratocystis moniliformis</i>	3-Methylbutyl acetate , Gerniol, Nerol , Linalol , Citronellol	نكهة الموز نكهة العرموط والورد
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Linalol , Citronellol , Gerniol	نكهة الفواكه ، الورد
<i>Pen. decumbens</i>	3-Octanone, Thujopsene ,	نكهة الصنوبر
<i>Trametes odorata</i>	Methyl phenylacetate . Nerol , Gerniol , Citronellol	نكهة العسل ، الورد ، الفاكهة
<i>Inocybe corydalina</i>	Cinnamic acid methyl ester	نكهة الفواكه ، الياسمين

انتاج الملونات الغذائية

تنتج الاحياء المجهرية الصبغات كوسائل دفاعية . واكثر الصبغات المنتجة للتصنيع الغذائي هي من الطحالب التي تنتج على نطاق تجاري في دول الشرق . وهناك بعض الخمائر او الفطريات يمكن ان تستعمل لهذه الاعراض مثل الخميرة *Phaffia rhodozyma* والفطر *Monascus purpureus* التي تستعمل لانتاج الصبغات الحمراء للاستعمال في الاعذية . وتستعمل خميرة *C. utilis* لتخمير مستخلص الشوندر (Beet) الأحمر ليستعمل الناتج بعد تركيزه في تلوين الاعذية .

انتاج المكوثرات الحيوية

وتأتي السكريات المكوثرة والصموغ في مقدمتها . وتنتج للتصنيع الغذائي من النباتات والادغال والطحالب البحرية . وهناك مجموعة من الاحياء المجهرية تنتج هذه المواد واصبحت تنافس المصادر الاخرى التقليدية . وتستعمل المكوثرات في الاعذية لعدة اغراض فهي قد تكون مثبتات او مثخنات او عوامل جلتنة او مواد رابطة او مواد استحلاب وغيرها .

وتستعمل في عمليات التحليل والتنقية وكذلك في تقييد الانزيمات او الخلايا الميكروبية ، واكثر هذه المواد تفرز الى خارج الخلايا . ويوضح جدول (51) اهم السكريات المكوثة والاحياء المنتجة لها والمستعملة في مجال التصنيع الغذائي .

وتستعمل الهندسة الوراثية لتغيير مواصفات المكوثرات الحيوية لتلائم التطبيقات التي تحتاجها الاعذية ، وكذلك تستهدف التغييرات الوراثية امكانية نقل الجينات من الاحياء المنتجة الى احياء اكثر ملائمة وفي هذا المجال امكن نقل الجينات المسؤلة عن β - glucan - احد مكونات جدار الخميرة الى *E. coli* باستعمال النواقل الموكية . ومن اهم المكوثرات :

جدول 51 : بعض المكوثرات الحيوية من الأحياء المجهرية المستعملة في الأعذية

المكوثر الحيوي	الكائن المنتج	الاستعمال
الاجينات	<i>Azotobacter vinelandii</i>	تقييد الانزيمات
كلوكان خميرة الخبز	<i>S. cerevisiae</i>	تحسين الشعور الفموي بالاعذية
Biozan	<i>Alcaligenes</i>	اغراض مختلفة
سليولوز	<i>Acetobacter agrobacterium</i>	اغراض مختلفة
Chitosan	<i>Mucor spp</i>	اغراض مختلفة
Curdlan	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Agrobacterium</i>	عوامل مثخنة ومثبتة
الدكستران	<i>Lactobacillus</i> , <i>Leconostoc mesenteroides</i> <i>Streptococcus</i>	اغراض مختلفة
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>	مادة مستحلبة
صمغ الجيلان	<i>Sphingomona elodea</i>	بدائل الاكر
Pullullan	<i>Aureobasidium pullulans</i>	بدائل عن اللدائن العادية
Scleroglucan	<i>Sclerotinum rolfsii</i>	مادة معلقة ، مادة مغلفة ، عامل تكوين الهلام
صمغ الزانثان	<i>Xanthomonas campestris</i>	عامل مثخن

الزانتان Xanthan

ينتج من البكتريا *Xanthomonas campestris* بعمليات التخمير الهوائي في مزارع الدفعة الواحدة (Batch culture) ، وقد امكن زيادة كفاءة السلالات المنتجة باستعمال الكلونة الجينية . ونظرا لمواصفاته الخاصة فهو يستعمل لاغراض عدة في الاغذية في مقدمتها كمادة مثخنة وكذلك كمادة مشتتة او مثبتة اعتمادا على العملية التصنيعية .

الالجينات

وهي املاح حامض Alginic acid وتمثل احدى التراكيب الجدارية المهمة في شعبة الطحالب البنية ، والمركب من السكريات المكوثة المتباينة ويحوي على β - 1,4 - L-gluronic الذي يعد مهما في تحدد قابلية المادة على تكوين الهلام وتنتج بشكل رئيس من الطحالب ، وينتج ايضا من البكتريا *Azotobacter vinelandii* وكذلك من بعض سلالات *Ps. aeruginosa* ، ويمكن ان ينتج باوازن جزيئية مختلفة وحسب الحاجة . وتستعمل المادة في تقييد الانزيمات او الخلايا الميكوربية لاجراء عمليات التحول الحيوي .

Curdulan

مكوثر يتكون من وحدات متجانسة مرتبطة باصرة خاصة β - D - linked (1-3) glucose ، بعد انتاجه وافرازه الى خارج الخلايا يؤدي الى جعل الوسط قاعدي التفاعل وهذا يساعد في عمليات الفصل اذ تتم معادلة الوسط بعد ازالة الخلايا المنتجة ليترسب المكوثر بشكل غير ذائب ويفصل ويجفف . يستعمل لاغراض مختلفة في صناعة الزيوت والدهون وغيرها من الصناعات وينتج من انواع من الجنس *Acetobacter* , *Alcaligenes* .

Gellan gum

صمغ الجيلان ينتج من انواع من البكتريا *Pseudomonas* البحرية التي غيرت تسميتها الى *Sphingomona elodea* ، والمكوثر يفرز الى خارج الخلايا وينتج تحت الظروف الهوائية . وقد اجريت وتجري العديد من الدراسات على هذه المادة لانه يراد بها استبدال مادة الاكر Agar المنتج من الطحالب البحرية *Gellidum* والذي تكون أسواقه ونوعيته غير ثابتة وتعتمد على الظروف البيئية .

Pullulan

من المكوثرات المتباينة وله تركيب خاص ويستعمل كمادة لاصقة او مواد مغلفة للاغذية المعدة للوجبات السريعة او اغذية الطوارئ . المركب غير سام وغير ناضج للاوكسجين لذلك

يقلل من تلف الاغذية المحفوظة فيه وذلك بتقليل او انعدام الاكسدة . ينتج المركب على نطاق تجاري من البكتريا *Azotobacter pullulans* .

Scleroglucan

المادة تكافىء النشأ من ناحية السرعات الحرارية ووجد ان يخفض الكولسترول في افراخ الدجاج والفئران لذلك يمكن ان يدخل في تركيب الاغذية المعدة للاغراض الصحية اضافة الى الاغراض الاخرى التقليدية .

واضافة الى ما ذكر أعلاه فهناك العديد من المكوثرات الحيوية ذات الصفات الريولوجية الملائمة للتصنيع الغذائي والتي تنتج من البكتريا بشكل خاص .

انتاج بروتين الخلية الواحدة

يقع منتج البروتينات هذا ضمن مواد الايض للاولية . ويعد منتج الكتلة الحيوية منتجا يمكن ان يتوزع على اغراض شتى منها انتاج خميرة الخبز وانتاج الطحالب البحرية التي تستخدم لانتاج الكحول بالتخميرات وكذلك انتاج المبيدات الحيوية .

اما بروتين الخلية الواحدة Single cell protein (SCP) فيعد شكلا خاصا من انتاج الكتلة الحيوية . وقد ازدهرت هذه الصناعة في سبعينات القرن الماضي وكان المؤمل ان تستعمل كمصدر اساسي للبروتين ولكن تعثرت الصناعة لعدة اسباب من اهمها :

- الاحياء المجهرية المستعملة سريعة النمو وتحوي على مستويات عالية من الحوامض النووية خاصة RNA الذي لا يمكن للجسم استهلاكه وتمثيله وتغييره ولا التخلص منه لذلك يؤدي الى مشاكل صحية .
- المنتجات التي يتم انتاجها من الهيدروكربونات والتي تعد افضل المواد من حيث الانتاجية لانها مواد مختزلة جدا ، ولكنها تساعد الاحياء على انتاج الامينات المسرطنة جدا .
- ارتفاع اسعار النفط المفاجيء عام 1973 وهي فترة ازدهار الصناعة جعل عملية الانتاج غير اقتصادية .

ولهذه الاسباب انكمشت هذه الصناعات وحولت الى الاستعمال لإنتاج العلف الحيواني ، وحولت بعض عمليات انتاج الكتلة الحيوية الى اغراض بعيدة مثل انتاج الكتلة الحيوية لمعاملة الفضلات او عمليات التعدين او انتاج المبيدات الحيوية .

وفي محاولات للابقاء على الصناعة قائمة تم التوجه الى استعمال مواد محددة مثل استعمال الاحياء المستهله للميثان او الكحولات البسيطة أي الميل لاستعمال مواد بسيطة قليلة الوزن الجزيئي لضمان انتاج مواد بروتينية خالية من المواد المؤذية والابتعداد عن المواد المعقدة مثل فضلات الزراعة وغيرها من المصادر .

ومع كل هذه المعوقات لا زالت بعض العمليات قائمة باستعمال مصادر مختلفة واحياء مختلفة والمنتج منها في الوقت الحاضر يجد اسواقا رائجة في صناعة الأعلاف ، والبعض منها موضح في الجدول (52) .

جدول 52 : انتاج بروتين الخلية الواحدة SCP باستعمال المخلفات العضوية

المادة الأولية	الاحياء المستعملة
فضلات صناعة الألبان (اللاكتوز)	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Trichosporon cutaneum</i> <i>Candida curvata</i>
مخلفات زراعية (سليولوزات واشباه السليولوزات)	<i>Chaetominum cellulolyticum</i>
فضلات صناعة الحبوب والسكر (كاربوهيدرات مختلطة)	<i>C. guilliermondi</i> <i>Debaryomyces kloeckeri</i> <i>Hansenula anomalc</i> <i>S. cerevisiae</i>
سكروز ، كلوكوز ، فركتوز ، رافينوز	<i>C. utilis</i> <i>S. cerevisiae</i>
النشا	<i>Aspergillus spp</i> <i>Cephalosporium spp</i> , <i>Rhizobus spp</i> , <i>Penicillium spp</i> , <i>Trichoderma spp</i> , <i>Gliocledium spp</i>
فضلات صناعة الفواكه والخضار (سكريات مختلفة وحوامض عضوية)	<i>C. utilis</i> <i>S. cerevisiae</i> , <i>Pichia spartina</i> , <i>S. rouxii</i> , <i>Asp. foetidus</i> , <i>Lb.bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>T.virdis</i> , <i>Gliocladium deliquescens</i>
فضلات صناعة الحوم (الكولاجين)	<i>B. megaterium</i>

ولكل مادة اولية احياء خاصة ومعاملات وظروف خاصة بها ويتضح من الجدول ان راس القائمة هو استخدام مخلفات صناعات الالبان وخاصة الشرش الذي يحوي على حوالي 5 % لاكتوز والذي يعد من المواد الملوثة ان ترك في البيئة ، وتستخدم خميرة *Kluyveromyces fragilis* اضافة الى انواع اخرى من الخمائر والتي يستخدم بعضها في انتاج الدهون من الشرش . واهم ميزات العمليات الإنتاجية انها تتم تحت التهوية نظرا للحاجة الى الطاقة في مثل هذه العمليات لبناء الكتلة الحيوية ولذلك فهي تتم باستعمال المزارع المستمرة .

ونظرا لما تعانيه هذه الصناعة من معوقات فالمحاولات جارية للتخفيف منها :

- ادخال جينات تنتج الانزيمات التي تحلل الحوامض النووية تستحث عند زيادة تركيز الخلايا لتخفيض مستوى الحوامض النووية قبل حصد الخلايا وانتخاب سلالات يمكن ان تتحسس زحام الخلايا وتصمم بحيث يتم التخلص من الحوامض النووية خاصة RNA .
- تعديل المنتج النهائي وتخليصه من الحوامض النووية وتعديل محتواه من الحوامض الامينية ومواد النكهة .
- يمكن باستعمال الهندسة الوراثية تحسين العلاقة بين تركيب البروتينات المنتجة ووظائفها .
- استعمال الهندسة الوراثية لانتاج سلالات تستهلك مواد اولية لا تجد لها اسواق منافسة .

اما العمليات الانتاجية للبروتينات من احياء اخرى مثل الطحالب *Spirulina* والعروهن *Agaricus* فهي تنتج منذ قديم الزمان ولا زالت وقد طرأت عليها العديد من التطورات كما حصل في جوانب عمليات التصنيع الغذائي . اذ لا زال ينتج العروهن *Mushroom* على نطاق تجاري . اما انتاج الكمأ *Truffels* فلا توجد عمليات انتاجية صناعية له على الاقل في الدول العربية والشرقية ويكون الاعتماد على الظروف البيئة وتساقط الامطار ووقت سقوطها وذلك لانه ينتج ضمن علاقة *Mycorrizae* المعقدة جدا بين بعض الفطريات الكيسية ونباتات صحراوية خاصة وتدعى في العراق جريدة الكمأ .

والعمليات التصنيعية للفطريات في هذا المجال تعتمد على انتاج *Mycoproteins* من الفطر *Fusarium graminearum* وهو من فطريات التربة وهافاته دقيقة وتشبه الياف اللحوم . ينمى الفطر للحصول على الكتلة الحيوية ثم يعرض لمعاملات لإزالة RNA اما بالطرق الكيماوية مثل استعمال هيدروكسيد الصوديوم او باستعمال انزيمات RNases الذاتية التي تكون مقاومة للحرارة ، لذا تعرض الكتلة الحيوية الى صدمة حرارية للقضاء على معظم الانزيمات الخلوية الداخلية ثم تترك الكتلة لتمارس الانزيمات المذكورة فعاليتها للتقليل من RNA ويسوق المنتج على نطاق ضيق .

انتاج الحوامض العضوية

للحوامض العضوية اهمية كبيرة في التصنيع الغذائي ، واغلب الحوامض العضوية يمكن الحصول عليها من المنتجات النفطية ولكن لتذبذب اسواق الاخيرة ولوجود اسواق قائمة لها ، كان لابد من الانتاج الحيوي المتجدد للتصنيع الغذائي . واغلب حوامض دورة الحوامض ثلاثية الكربوكسيل TCA يمكن ان تنتج بتخميرات الميكروبات ، وتمثل الصناعات الغذائية السوق الأوسع لهذه الحوامض . ومن اهم الحوامض :

• حامض الستريك Citric acid

او حامض الليمون ، ويعد الانتاج الميكروبي هو المعتمد من الناحية التجارية . ويمثل الحامض مادة ايض اولية ولكن توجد بعض السلالات التي يمكن ان تنتجها بكميات كبيرة تفرز الى الوسط الغذائي المحيط ومنها سلالات من الفطر *Asp. niger* وينتج ايضا من انواع من الفطر *Penicillium* وغيرها من الخمائر والبكتريا . ويتم انتاجه بالتخميرات الهوائية باستعمال مواد اولية متعددة تناسب السلالات المستعملة ، وبطبيعة الحال تصل الانتاجية حدودها المثلى عند تطبيق الظروف المثلى . ويمكن انتاجه بطرق تخمرات المواد الصلبة خاصة عند استعمال الفطريات الخيطية ويستعمل الحامض في صناعة المشروبات الغازية وفي الاغذية يستعمل لتحسين النكهة ، ويستعمل في صناعة الحلويات اذ يقوم بتحليل السكروز ويمنع تبلوره .

• حامض اللاكتيك

او حامض اللبن يعد من المنتجات الاساسية في صناعات الألبان وينتج من بكتريا حامض اللاكتيك ويستعمل في منتجات غذائية متعددة . ينتج تحت الظروف اللاهوائية ويعد من الناحية الايضية مغطسا للهيدروجين لإعادة تكوين NAD ، اذ تسحب ذرات الهيدروجين وتضاف الى البايروفات للحصول على NAD ، وينتج من قبل احياء اخرى غير بكتريا حامض اللاكتيك .

• حامض الخليك

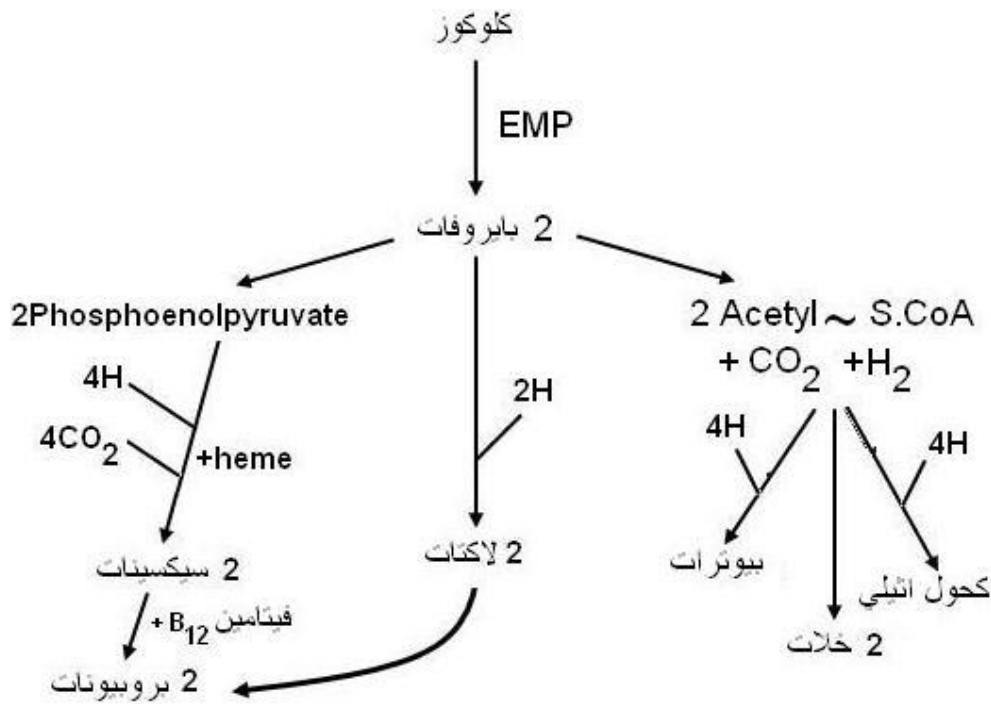
للحامض استعمالات في الاغذية ، ينتج على نطاق تجاري بواسطة البكتريا *Gluconobacter* , *Acetobacter* ، ويمثل الخل Vinegar المستعمل في تخليل الخضر محلول مائي لحامض الخليك بنسبة 4 % . واهم ما يميز عمليات انتاجه انها تحتاج الى تهوية شديدة لأكسدة الكحول الايثيلي عند استعمال الاحياء الهوائية . وينتج بتقييد الخلايا المنتجة على مواد سائدة ثم يمرر الكحول الايثيلي بمعدل انسياب واطىء ووجود كميات كافية من الاوكسجين .

اما الانتاج اللاهوائي ويعد الأكفأ اذ انه يتيح استعمال مواد اولية كثيرة غير الكحول الايثيلي . وينتج من قبل انواع تابعة للجنس *Clostridium* مثل *Cl. formicoaceticum* , *Cl. aceticum* .

• انتاج الحوامض العضوية الاخرى

تنتج حوامض عضوية اخرى لها علاقة بالتصنيع الغذائي وصناعات اخرى مثل حامض الكلوكونيك وينتج من قبل البكتريا *Gluconobacter suboxydans* , *Bervibacterium* , *Pseudomonas* , وتستعمل الفطريات في الانتاج مثل *Asp. niger* و انواع من جنس *Penicillium*

حامض البروبيونيك وحامض البيوتيريك : تنتج هذه الحوامض بشكل مترافق مع حوامض عضوية اخرى تحت الظروف اللاهوائية من تخمر الكلوكونز وفق المخطط التالي شكل (78) ، وينتج من احياء عديدة من جنس *Propionibacterium* , *Clostridium* .



شكل 78 : مسارات تخليق حوامض البروبيونيك والبيوتريك تحت الظروف اللاهوائية

تصنيع الفواكه والخضر

تصنع الفواكه والخضر بطرق مختلفة ولأغراض مختلفة ، وما يهم في مجال التقنية الحيوية هي عمليات التخمر ، اذ يمكن لكل من الفواكه والخضر ان تحفظ بعمليات التخمر التي تشارك فيها العديد من الاحياء المجهرية منها العصيات اللبنية و *Pediococci* , *Leconostocs* التي تستعمل في تخمير الخيار والزيتون واللهانة ومسحوق الصويا لإعطائها النكهات المرغوبة . وتعمل الهندسة

الوراثية بشكل نشط في المجال للحصول على بواقي كفاءة لهذه التخمرات . وتستعمل في هذا المجال الإنزيمات أيضا مثل الإنزيمات المحللة للنشا والبكتين وكذلك البروتيازات و Glucose oxidase ، وهذه الإنزيمات تستعمل في مراحل مختلفة مثل الهرس والتسييل والترويق ، ومن أهم الأمثلة في هذا المجال :

اللّهانة المتخمرة Sauerkraut

وهي إحدى المنتجات الغذائية المتخمرة التي زاد الاهتمام بها عالميا لما لها من فوائد صحية وعدت من الأغذية العلاجية وعلى هذا الأساس تسوق في العديد من الأسواق العالمية .

والمنتج يحضر من اللّهانة (الملفوف) *Brassica oleracea var capitata* وهي تصنع منذ قديم الزمان . وتخضع المواد الأولية لعملية تخمر لأكتيكي تحت ظروف لا هوائية ويعد التخمر بمثابة عملية حفظ حيوي ، والعملية من التخمرات المختلطة وتتأثر بالعديد من العوامل .

وتحصل عملية التخمر بسلسلة من التخمرات المتباعدة والمتجانسة تؤدي إلى التغيير في البيئة المحيطة بالخلايا ، والعملية هي عملية تخمر تلقائي معتمدة على الفلورا الطبيعية الموجودة على أوراق اللّهانة ، وتحتاج فقط إلى تهيئة الظروف الملائمة من درجة حرارة حضن ملائمة وكبس أوراق اللّهانة المقطعة في وعاء بعد إضافة الملح على أن لا يتجاوز 2 % ، وعملية تقطيع الأوراق تسمح للمواد الغذائية بالخروج من أوراق النبات ويمكن تقسيم عملية التخمر إلى مراحل :

● المرحلة الأولى ويبدأ فيها التخمر بعد إعداد وتهيئة الظروف وتبدأ المرحلة بفعاليات الأحياء المجبرة هوائيا مثل *Pseudomonas* spp , *Flavobacter* spp , *Acinetobacter* spp وتتلاشى هذه الأحياء بعد استهلاك الأوكسجين وتحول الظروف إلى لا هوائية نتيجة لفعاليات الأحياء وكذلك نتيجة لتنفس خلايا الأوراق النباتية الحية ونشاط الأحياء اللاهوائية المختارة ، وتستمر المرحلة لمدة ويكون استنزاف الأوكسجين مرافقا لإنتاج الحوامض العضوية مثل حامض الخليك واللاكتيك والفورميك وغيرها .

● المرحلة الثانية ويحصل فيها انخفاض الرقم الهيدروجيني وتحول الظروف إلى اللاهوائية وانخفاض جهد الأكسدة والاختزال وهذه الظروف إضافة إلى وجود الملح ، كل هذه الظروف تسمح لبكتريا حامض اللاكتيك الموجودة بشكل طبيعي بالنمو على أوراق اللّهانة وتصبح هي السائدة ، وتبدأ الأحياء *Le. mesenteroides* و *Le. faltar* غير المتحملة لتراكيز عالية من الحوامض العضوية وتحت ظروف ملائمة يصل تعدادها إلى 10^8 وحدة تكوين المستعمرات / غم بعد مرور 12 – 14 ساعة من بدأ التخمر .

والبكتريا تنتج المزيد من الحوامض وتخفف الرقم الهيدروجيني أكثر وتنتج ثنائي اوكسيد الكربون لأنها متباينة التخمر ويقوم ثنائي اوكسيد الكربون بالإحلال محل ما تبقى من الهواء ، وهذه الظروف تساعد في ثباتية فيتامين C في المنتج وكذلك ثباتية اللون للمنتج .

وبعد اكتمال نمو البكتريا أعلاه تبدأ العصيات اللبنة متباينة التخمر مثل *Lb. brevis* وغيرها والتي تكون أكثر تحملا للحموضة والملوحة من البكتريا التي قبلها (*Leconostoc*) . واعتمادا على درجة الحرارة فان المرحلة الأولى والثانية يمكن ان تستغرق 3 - 6 أيام ويكون حامض اللاكتيك عند نهايتها حوالي 1 % .

• المرحلة الثالثة وفيها يكون التخمر بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك متجانسة التخمر وتصبح هي السائدة نظرا لكون الظروف لاهوائية والحموضة مرتفعة ووجود نسبة من الملح . ومن الاحياء المشاركة في المرحلة مكورات مسبحية *Streptococci* والمكورات المعوية *Enterococci* وأفراد من البكتريا *Pediococci* ولكن تكون هذه المجاميع بنسب ضئيلة تصل الى 10 % من تعداد بكتريا حامض اللاكتيك الكلي ، اما النسبة الباقية فهي *Lb. plantarum* (*Streptobacteria*) وتصل نسبتها الى 30 - 80 % وتوجد في هذه المرحلة بكتريا اخرى مثل *Lb. curvatus* , *sakei* ، وتصل الحموضة الى 1.5 - 2 % وتعبا للهانة عندما يصل الرقم الهيدروجيني 3.8 - 4.1 .

ويمكن ان تقوم بعض الاحياء بتخمير سكريات أخرى مثل الزايلوز والارابينوز وتصبح هي السائدة في المراحل النهائية .

الأمينات الحيوية : عند عدم ملائمة الظروف او عدم العناية بظروف التخمر فان الاحياء الموجودة خاصة البكتيرية السالبة لصبغة كرام من العائلة المعوية يمكن ان تولد بعض الأمينات (كما في حالة تخمر اللحوم) والتي توجد في بداية التخمر ولكن تتلاشى بالتنافس مع بكتريا حامض اللاكتيك .

والأمينات الحرة والتي هي بمثابة قواعد عضوية يمكن ان تسبب التسمم ، ويحدث التسمم بشكل عادي بواسطة الهستامين عندما تصل نسبته الى 50 ملغم / 100 غم من الهانة ، والهستامين يوجد في اوراق الهانة الطبيعية بحدود 12 - 78 ملغم / كغم لهانة . ومن أعراضه الحساسية مثل العطاس والصداع النصفي (داء الشقيقة) وصعوبة في التنفس وأعراض أخرى .

ومن الأمينات الأخرى Putrescine الذي يمكن ان يصل تركيزه في بعض الحالات الى 146 ملغم / كغم لهانة ، و Tyramine يصل الى 174 ملغم / كغم لهانة وكذلك Cadaverine يصل الى 50 ملغم / كغم وقد يتولد Spermidine . ويمكن تقليل هذه المستويات بالعناية بالتصنيع والتبريد بعد انتهاء التخمر . ويمكن تقليل ظهور الأمينات بإضافة البوادي مثل *Lb. plantarum* ذات الفعالية المنخفضة لإنزيمات Amino acid decarboxylases .

الفوائد الصحية للمنتج

لهذا المنتج فوائد صحية كثيرة ، بداية تكون اللهانة مصدرا جيدا للفيتامينات مثل فيتامين C وأملاح المعادن والألياف . كما ان اللهانة تعود الى العائلة الصليبية التي تحوي على تراكيز عالية من Glucosinolates التي تصل الى 1 % من الوزن الجاف ، وتعاني هذه المركبات من التحلل بواسطة الإنزيمات مثل Myrosinase وتنتج الاندولات و Isothiocyanates وهي من المثبطات القوية للسرطانات ، اذ تمنع الانقسام الخيطي وتشجع الاستماتة في خلايا الورم البشرية ، وتؤثر ايضا على التحولات الإنزيمية للطور الاول والثاني للمواد المسرطنة لذلك تكون ذات علاقة وثيقة بالعديد من عمليات التسرطن بالكيماويات مثل عمليات الايض للمطفرات الأولية Promutagens وعمليات ارتباط الكيماويات الى DNA وكذلك تثبيط إنزيمات Cyt. P450 والتي تكون عاملة في تنشيط عمليات التسرطن ، اضافة الى احتواء اللهانة المخمرة على بكتريا حامض اللاكتيك التي تعد من الاحياء العلاجية متعددة الأغراض (يراجع الفصل الثامن) .

صناعات الألبان

يكاد يكون قطاع صناعات الألبان صناعة حيوية الا بعض الاستثناءات القليلة جدا ، اذ تنتج معظم منتجات الألبان بالتخمير وفيها تتحول المواد المبدؤ بها الى منتجات ذات قيمة غذائية عالية وذات مواصفات حسية جديدة . وقد تم مناقشة مشاركة منتجات الألبان كأغذية علاجية في موقع اخر (يراجع الفصل الثامن) .

وتستعمل الاحياء المجهرية في صناعات الألبان لأغراض عدة منها إعطاء النكهة وإنضاج المنتجات وإطالة مدة صلاحيتها والحصول على منتجات ذات قيمة غذائية عالية . وتستعمل الانزيمات ايضا في صناعة الألبان مثل الرنين الميكروبي واللاييزات والبروتيزات وانزيمات تحلل اللاكتوز وغيرها . وتضطلع بكتريا حامض اللاكتيك بالقسط الأكبر في هذا القطاع الصناعي ثم تليها بكتريا حامض البروبيونيك ، وبدرجة اقل الفطريات والخمائر كما موضح في الجدول (53) .

جدول 53 : بوائى بكتريا حامض اللاكتيك في صناعات الالبان

المنتج	البوائى
الاجبان الزرقاء	3، 2
جنن الكمبريت	Pen. cadidum + 4، 3، 2
جبين الشدر	5
جبين الكوتج	5 ، 3
الجبنة الدهنية	3 ، 2 ، 1
زبد منضج	2
حليب خض الزبد	3 ، 2

3 ، 2 ، 1	جبين الايدام ، جبين الكودا
5 ، 3	جبين الفتة ، جبين ابيض
4	حليب محمض
3 ، 2 ، 1	Sour cream

المجموعة الاولى (1) *Lc. cremoris* , *Lc. lactis* , *Lc. lactis ssp diacetylactis*
المجموعة الثانية (2) *Lc. lactis* , *Lc. lactis ssp diacetylactis* , *Lc. cremoris*
, *Le. cremoris*
المجموعة الثالثة (3) *Lc. cremoris* , *Lc. lactis* , *Le. cremoris*
المجموعة الرابعة (4) *Bifidobacterium spp* , *Lb. acidophilus* , *Lb. bulgaricus* ,
St. thermophilus
المجموعة الخامسة (5) *S. cremoris* , *Lc. lactis*

وتتوفر بوائى الألبان بعدة أشكال منها :

- مزارع خزينة سائلة وهي الأكثر استعمالا .
- مزارع مجفدة .
- مزارع مركزة مجمدة .

ومن أهم منتجات الحليب المخمرة هو اللبن الذي يحضر من حليب مركز اذ يضاف الى الحليب الطبيعى مسحوق الحليب المجفف منزوع الدهن (Skim milk) لتصل نسبة المواد الصلبة فيه الى 10 % ويخمر ببائى خليط من *St. thermophilus* , *Lb. bulgaricus*

مواصفات بكتريا حامض اللاكتيك

بكتريا موجبة لصبغة كرام ، تضم أجناس عسوية الشكل او مكورات ، اغلبها مجبرة على التخمر ولا تستطيع الحصول على الطاقة بطريقة الفسفرة التاكسدية لغياب مركب البروفيرين Proferin . اغلب الصفات المهمة للخلايا هي صفات بلازميدية ومنها تخمر اللاكتوز وفعاليات تحلل البروتينات وإنتاج البكتريوسينات ومنها النايسين Nisin (المستعمل كمادة حافظة على نطاق واسع في العديد من الاغذية) ، وكذلك صفة مقاومة العاثيات واستهلاك السترات لإنتاج مركبات النكهة وغيرها من الصفات . لذلك اهتم بدراسة بلازميداتها ووضع الخرائط لها .

وتعرضت هذه المجموعة من البكتريا للعديد من الدراسات والتعديل باستعمال الهندسة الوراثية واستعملت تواليات DNA والصفات الجزيئية لتشخيصها وتمييز السلالات المختلفة . وتستعمل السلالات بشكل بوائى مفردة او مختلطة وفق العمليات الإنتاجية ، والعلاجية منها تستعمل على شكل مستحضرات صيدلانية مختلفة . ومن اهم المجاميع التي تضمها :

المكورات المسبحية Streptococci

المجموعة الخاصة بالألبان هي N- group حسب تصنيف لانسفيلد المعتمد اساسا على التفاعلات المصلية ، وقد غيرت التسمية الى *Lactococcus* (مكورات لبنية) ما عدا البكتريا *Streptococcus thermophilus* . ودرست المجموعة من الناحية الوراثية بشكل مفصل نظرا لأهميتها الاقتصادية . واستعملت طرق الهندسة الوراثية لتغيير بعض مواصفاتها لأنها أكثر طواعية للتغييرات الوراثية مقارنة بالعصيات اللبنية .

واهم المشاكل التي تعالجها الهندسة الوراثية هي مقاومة الإصابة بالعائيات التي تشكل مشكلة كبيرة أمام صناعات الألبان خاصة إنتاج الجبن . وقد تم الحصول على سلالات مقاومة للإصابة بالعائيات او طفرات غير حساسة للعائيات التي يطلق عليها BIM (Bacteriophage insensitive mutants) .

وأكثر الدراسات الوراثية ركزت على المكورات اللبنية *Lactococci* مقارنة بالمكورات الأخرى نظرا لأهميتها ، اذ حضرت لها العديد من النواقل المشتقة من بلازميدات صامتة او بلازميدات اخرى مثل البلازميد Wg2 الخاص بالبكتريا *Lc. lactis ssp lactis* وهو من مجموعة النواقل التي يطلق عليها pWVO1 . اما عمليات التنبيغ فتعتمد على العائيات المعتدلة التي توجد في الخلايا . ويكون إدماج الجينات المدخلة مع الكروموسوم تحت سيطرة *rec* ، اما اندماجها مع البلازميدات فلا تعتمد عليه .

الطرق المستعملة لتحويل افراد الجنس تتم اغلبها بعملية التحول وكذلك استعمال اندماج الجيبلات Protoplast fusion بمساعدة PEG (Polyethylene glycol) . وقد أمكن نقل معظم الصفات بين سلالات جنس المكورات اللبنية ، ولتنبيت الصفات تم إدماج قطع DNA او البلازميدات مع كروموسوم الخلية . ومن الصفات التي نقلت بنجاح :

- زيادة إنتاج النايسين .
- مقاومة الخلايا للعائيات .
- تطوير سلالات لتحويل الشرش الى منتجات مسوقة بعد تعديل النكهة .
- تحضير سلالات ملائمة لتحضير مزارع قابلة للتجميد والتجفيد واخرى ملائمة للتجفيف بالرداذ .
- انتاج سلالات ذات فوائد علاجية للانسان .

واستعملت خلايا الجنس كمضيف لنقل الصفات من أحياء اخرى والتعبير عنها ومنها :

- ◆ إنتاج مركبات النكهة مثل نكهة الموز ، الخوخ ، أناناس ، والفراولة او الفريز .
- ◆ إنتاج بروتينات التحلية أي الحلوة المذاق .
- ◆ استعملت كمضاييف لإنتاج البروتينات العلاجية .

العصيات اللبنية Lactobacilli : تستعمل أفراد المجموعة في العديد من العمليات الإنتاجية مثل إنتاج الألبان والمخللات والسايلاج ، وتحتوي على مجاميع متباينة التخمر وأخرى متجانسة التخمر . تنتج حامض اللاكتيك من تخمر اللاكتوز ، إضافة إلى إنتاج مركبات نكهة متطايرة مثل الاستالديهايد وثنائي الاستيل والكحولات ، ويعد الاستالديهايد أهم مركبات النكهة في اللبن وثنائي الاستيل هو مركب النكهة الرئيس في الزبد المنضج .

درست المجموعة بإسهاب لأهميتها الصناعية والعلاجية ، ومعظم صفاتها بلازميدية بما فيها تخمير اللاكتوز . وباستعمال الطرق الوراثية أمكن تحضير النواقل البلازميدية من بلازميدات صغيرة صامتة موجودة في أفراد المجموعة وكذلك حضرت نواقل موكية اعتمادا على البلازميد pBR322 . واستعملت معها طرق التطفير التقليدية في إجراء التحويلات الوراثية . وتستعمل مع المجموعة طرق نقل الصفات الوراثية التقليدية مثل التحول أو الاقتران أو التنبيع .

ومن أهم الصفات التي أمكن تغييرها بالطرق الوراثية هو التقليل من إنتاج الحامض بالسيطرة على مسارات تحلل السكريات لتلافي إنتاج الحموضة المفرطة Over acidification التي تحصل بعد اكتمال تخمر اللبن ، إضافة إلى :

- ◆ إنتاج سلالات ذات تغذية أولية Prototroph لأغراض خاصة .
- ◆ إنتاج سلالات من *Lb. plantarum* لا تنتج ثنائي أوكسيد الكربون الذي يؤدي إلى طفو الخضر عند تحضيرها بطرق التخمر اللاكتيكي .

بوادئ الجبن

عمليات تصنيع الجبن تؤدي إلى تركيز بروتينات الحليب وحفظها من التلف بدون تغييرات كبيرة فيها . وتستعمل أنواع من جنس المكورات اللبنية والعصيات اللبنية لإنتاج أنواع كثيرة جدا من الأجبان ، إذ أن محتويات خلايا البادئ من إنزيمات تحلل الدهون والبروتينات وغيرها تؤدي إلى إعطاء نسيجة ونكهة مرغوبة ، فمثلا في جبن الشدر تقوم الإنزيمات المحللة للدهون بالتأثير الرئيس على نكهة الشدر وأدت عمليات التطفير الوراثي إلى إدخال ألجين المسئول عن الإنزيم Prochymosin من معدة المجترات إلى *E. coli* وخميرة الخبز وبعض الفطريات لتكون مصادر جيدة لمنفحة الجبن Rennet . في *E. coli* كان إنتاج الإنزيم على شكل تجمعات من الأجسام الاشتمالية وهذا يعني الحاجة إلى استخلاصها ومسحها لغرض الإذابة ثم إزالة المسخ لاستعادة الفعالية . أما إنتاجه في الفطريات فكان باستعمال الفطر *A. nidulans* وذلك باستعمال 4 بلازميدات تحمل مناطق سيطرة لعمليات الانتساخ والترجمة أما السيطرة على الإفراز فكانت من مكونات الفطر ، كل هذه العناصر ربطت مع cDNA الخاص بـ Prochymosin أو Preprochymosin .

تصنيع الشرش

يعد الشرش من النواتج العرضية التي تحتاج الى معالجة ناجعة ، ونصف الشرش المنتج عالميا تقريبا يجد له استخدامات منها :

- ◆ إنتاج حامض اللاكتيك وإنتاج الكحول بالتخميرات .
- ◆ إنتاج اللاكتوز او مكوناته من الكلوكوز واللاكتوز .
- ◆ استعمال نواضح الشرش Permeates الحاوية على العديد من المعادن والفيتامينات والمعادن النادرة وغيرها من المواد التي تعد مثالية لنمو الاحياء المجهرية لذلك تستعمل في تنميتها وإنتاج الكتلة الحيوية المستعملة لأغراض مختلفة .
- ◆ إنتاج الخميرة بعد اختيار السلالات الملائمة او اتخاذ الخطوات اللازمة لتحويل سكر الحليب لان معظم الخمائر لا تستطيع استهلاكه ، ويكون ذلك باستعمال بكتريا حامض اللاكتيك لتحويل اللاكتوز الى حامض لاكتيك تحت ظروف لا هوائية ورقم هيدروجيني حوالي 4.5 وبدرجة حرارة 45° م . ثم استعمال الحامض لتنمية الخمائر مثل *C. utilis* , *C. krusei* , *K. fragilis* وهي الأكثر استعمالا . وتفضل الخميرة *Kluyveromyces* لانه يمكن تحويلها وزيادة معدلات نموها وكذلك زيادة نسبة البروتينات فيها وتقليل الحوامض النووية فيها وإلغاء عملية تكوين الابواغ والصفات الجنسية الاخرى وهذه التحويلات غير ممكنة في خمائر جنس *Candida* .

وقد امكن نقل الجينات الخاصة بتخمير اللاكتوز الى البكتريا *Xanthomonas campestris* لإنتاج الصمغ من الشرش .

اما خميرة الخبز فقد نقلت اليها الجينات العاملة في استهلاك اللاكتوز وكلها بسيطرة بلازميدية لغرض تحويل اللاكتوز الى كحول ايثيلي عند استعمال الشرش .

واستعملت في هذا المجال ايضا تقنية دمج الجبيلات اذ أدمجت جبيلات الخميرة *K. fragilis* المخمرة لسكر اللاكتوز مع جبيلات طفرات عوز غذائي لخميرة الخبز المتحملة للكحول الايثيلي وكانت الأفراد الناتجة ذات تغذية أولية وتستطيع استهلاك اللاكتوز وتنتج الكحول الايثيلي من الشرش بنسبة تصل الى 13 % من الشرش المستعمل .

ومن الاستعمالات الأخرى للشرش استعماله لإنتاج كحول البيوتانول وكذلك استعماله لإنتاج مركب ثنائي الاستيل بعد إزالة اللاكتوز منه اما بالتبلور او التخمير .

ويستعمل لاكتوز الشرش في انتاج حامض الاسكوربيك (فيتامين C) بعدد من الخطوات .

المواد المضادة للميكروبات

تنتج بواى الألبان المتمثلة ببكتريا حامض اللاكتيك عددا كبيرا من المواد المضادة للميكروبات مما تجعل منتجات الألبان المتخمرة آمنة الاستهلاك . وتقسم المواد التي تنتجها الى :

♦ مواد غير بيبتيديية وتشمل الحوامض العضوية مثل حامض اللاكتيك والخليك بشكل رئيس وحوامض دهنية قصيرة السلسلة . وتنتج مركبات النكهة المذكورة اعلاه والتي لها تأثيرات قاتلة للعديد من البكتريا خاصة المقاومة للمضادات الحيوية ، وكذلك تنتج بيروكسيد الهيدروجين . كما انها تنتج بعض المواد كمركبات وسطية ذات تأثير قاتل للاحياء المجهرية مثل Reuterin وهو من المركبات واطئة الوزن الجزيئي 3-hydroxypropionaldehyde الذي ينتج من إزالة جزئية ماء من الكليسرول ، وهو مركب واسع المدى في التأثير فهو يؤثر في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وعددا من الخمائر والفطريات وكذلك الابتدائيات وتنتج البكتريا *Lb. reuteri* .

♦ المواد البيبتيديية ومن أهمها البكتريوسينات والتي تنتج منها العشرات بل المئات وقد عرفت على انها " مواد بروتينية او بيبتيديية تظهر فعل قاتل للبكتريا الحساسة لها " . ونظرا لطبيعتها البروتينية فهي حساسة للبروتيازات وتقسم البكتريوسينات الى عدة أصناف :

الصف الاول

ويمثل بيبتيديات صغيرة لا يزيد وزنها عن 5 كيلو دالتون وتسمى أيضا Lantibiotics لاحتوائها على على الحامض الاميني غير الطبيعي Lanthionine . وتؤثر على الاغشية الخلوية وثابتة تجاه الحرارة .

الصف الثاني

وتسمى Non- Lantibiotics لعدم احتوائها على الحامض الاميني الموجود في الصف الأول . وتكون اكبر وتصل أوزانها الجزيئية الى حوالي 10 كيلو دالتون ، وتضم مجموعة مضادة للبكتريا الخطرة *Listeria monocytogenes* ، وتكون ثابتة للحرارة .

الصف الثالث

اهم ما يميزه عدم ثباتيته للحرارة .

الصف الرابع

ويضم البكتريوسينات المعقدة اذ تحوي إضافة الى البروتينات مركبات دهنية او كاربوهيدراتية التي تكون أساسية لفعاليتها وتكون ثابتة بالحرارة .

وكل بكتريا من أفراد بكتريا حامض اللاكتيك تنتج البكتريوسينات الخاصة بها لذلك يمكن ان تستعمل في الحفظ الحيوي Biopreservation . ومن اهم البكتريوسينات المستعملة في التصنيع الغذائي هو :

النايسين Nisin

ينتج من المكورات اللبنية *Lc. lactis* وتوجد منه انواع A , B , C , D , E وأكثرهم فعالية النوع A ، يحوي البروتين على الكبريت وله وزن جزيئي 7000 كيلو دالتون ، يوقف عملية تجرثم او إنبات ابواغ البكتريا المنتجة للسموم *Cl. botulinum* (يراجع الفصل الثامن) والتي تكون مهمة في الأغذية المعلبة . ويؤثر البكتريوسين على الأغشية الخلوية بتكوين ثقب تؤدي الى اضطراب الجهد الكهربائي على جانبي الغشاء وتشتت القوة الدافعة للبروتون . يستعمل البكتريوسين في حفظ العديد من الأغذية وقد سمحت الجهات المختصة (WHO / FAO) بمستوى تناول يومي ADI (Acceptable daily intake) من صفر – 33000 وحدة عالمية / كغم وزن الجسم / يوم .

الحقيقة ان هناك قوائم طويلة من البكتريوسينات ، لعل أهمها بعد النايسين هي المؤثرة في البكتريا الخطرة *L. monocytogenes* مثل LactacinB , LactacinF التي تنتج من البكتريا *Lb. acidophilus* و Reuterin المنتج من البكتريا *Lb. reuteri* و Sakacin A المنتج من *Lb. sake* .

ومن البكتريوسينات المهمة المستعملة في صناعة اللحوم هي بكتريوسينات الجنس *Leconostoc* التي تؤثر في البكتريا *L. monocytogenes* ومنها Mesentericin Y105 المنتج من *Le. mesenteroids mesenteroids ssp* والذي يؤثر بشكل فاعل في البكتريا *L. monocytogenes* . وتنتج أنواع الجنس الاخرى بكتريوسينات تعمل ضد احياء مختلفة .

الانزيمات في صناعة الالبان

تستعمل الانزيمات وخاصة المشتقة من الاحياء المجهرية لأغراض مختلفة في هذا القطاع من الصناعة ومنها .

اللايبيزات و Esterases وتستعمل لإعطاء النكهة في الاجبان المنضجة وكذلك تستعمل في صناعة اللبن ، وتغيير دهن الحليب ، وتستعمل في إجراء التحويلات على الحليب المعد للتجفيف وكذلك في إنتاج الزبد المحور .

وتستعمل اللايبيزات المحورة لدهون الحليب في إنتاج الشوربات وبعض الحلويات والمنتجات المخبوزة ومنتجات الغموس Dips ومضافات القهوة .

لذلك فالتقنية الحيوية يمكن ان تساهم في تطوير صناعات الألبان بواسطة تغيير النكهات بشكل أساسي وغيرها من المواصفات الحسية لإنتاج الأغذية Formulated foods .

المحليات الصناعية Artificial sweeteners

وتسمى أيضا بدائل السكر وهي من المضافات الغذائية ، تضاف عادة لتحسين الطعم . وتوجد العديد من المواد الصناعية او الطبيعية التي تفوق حلاوتها حلاوة السكر . وتستعمل كبديل عنه لإعطاء الطعم اما اذا كانت إضافة السكر لأغراض أخرى فيجب ان تعوض بمواد مألوفة Bulking agents لان ما يستعمل منها قليل جدا مقارنة بكمية السكر .

أسواق هذه المواد في اتساع كبير لذلك اهتمت بها منظمات الصحة العالمية لتقييم أضرارها . ومن أكثر البدائل المستعملة هو Aspartame المكون من حوامض امينية - Aspartate - phenylalanine – methyl لذلك تنتج الحوامض الامينية بطرق التخمير الميكروبي لتكون كمادة أولية وتستعمل لتحضير البديل الذي يسوق على نطاق تجاري كبير . ولكن لا يمكن استخدامه بشكل مطلق اذ لا يمكن استعماله للمصابين بالبييلة الكيتونية Phenylketone urea . وتستعمل المحليات الصناعية في حالات قد تكون ضرورية في كثير من الأحيان ومن هذه الحالات :

- تستعمل من قبل مرضى داء السكري لغرض الحفاظ على مستوى السكر في الدم فهي تعد احد العوامل المساعدة .
 - تستعمل من قبل العديد من الناس للمحافظة على الأسنان وذلك لأنها لا تخمر من قبل فلورا الفم وبالتالي لا تؤثر على صحة الأسنان .
 - تستعمل لتقليل الوزن اذ ان حلاوتها عالية ولكن سعراتها قليلة وهي تستعمل بكميات قليلة جدا .
 - تستعمل للأشخاص المصابون او اللذين يعانون من هبوط السكر الفعال Reactive hypoglycemia وذلك لان هؤلاء الأشخاص عند تناولهم للأغذية الحاوية على السكريات يزداد إفراز الأنسولين عندهم بشكل كبير مما يؤدي الى هبوط حاد في سكر الدم لذلك تستعمل المحليات الصناعية للحصول على الطعم الحلو مع أغذية معتدلة أخرى .
- ومن اهم المحليات الطبيعية هي البروتينات ومنها بروتين Thaumatin وهو بروتين ينتج من ثمار النبات *Thaumatococcus danielli* وحلاوته تعدل حلاوة السكر 2500 - 3000 مرة ، تم إنتاجه في عدد من الاحياء المجهرية منها البكتريا *E. coli* , *B. subtilis* وكذلك نقلت جيناته الى خميرة الخبز والكائن *Streptomyces lividans* ويؤمل ان يسوق المهندس منه قريبا .
- وإضافة الى ما ذكر هناك محليات بديلة كثيرة اغلبها من البروتينات والجدول (54) يوضح البعض منها ومقدار حلاوتها .

جدول 54 : المحليات الصناعية

المركب	درجة حلاوته نسبة للسكر وطبيعة المركب
Brazzein	800 ، بروتين
Fructose	1.7 ، سكر
Glycyrrhizin	50
Glycerol	0.6 ، مركب عضوي
Mabinlin	100 ، بروتين
Monellin	3000 ، بروتين
Pentadin	500 ، بروتين
Thaumatin	2500 ، بروتين

التقنية الحيوية الميكروبية والصناعة

الصفحة	الموضوع
594	المشتتات الحيوية
615	الإنزيمات القلوية
623	إنتاج خيوط العنكبوت
626	اللدائن الحيوية
629	منتجات أخرى

التقنية الحيوية الميكروبية والصناعة

علاقة التقنية الحيوية بمجالات الصناعة علاقة تنافسية في اغلب جوانبها . اذ ان العديد من المواد او معظمها تنتج بالتصنيع الكيماوي وخاصة الصناعات النفطية . وبما ان أسواق الصناعات الكيماوية قد بدأت منذ مدة بعيدة فهي قد استقرت في تجهيزاتها و طورت العديد من الطرق بحيث أصبحت ذات جدوى اقتصادية كبيرة ، إضافة الى دايناميكية تحركها ومرونة عملياتها . ولكن من الجانب الثاني أدت الى إتلاف البيئة على كافة الأصعدة ، مما جعل العودة الى الصناعات الحيوية ضرورة لابد منها لإنقاذ ما تبقى من البيئة ومعالجة ما دمر .

ويمكن ان تساهم التقنية الحيوية في تسخير بعض الصناعات الكيماوية للتقليل من أضرار المواد الكيماوية مثل الصناعات النفطية بالتزويد بالمشتتات والمستحلبات الحيوية ، او في مجال التصنيع الغذائي من عمليات تغليف والتزويد بالملونات والنكهات الطبيعية ، وكذلك يمكن ان تقوم التقنيات الحيوية بواجبات أكفا كما في استعمال الإنزيمات . وسيتم تناول بعض الجوانب لأنه لا يمكن الإلمام بكل الجوانب مطلقاً .

المشتتات الحيوية Biosurfactants

وهي المواد التي تقلل من الشد السطحي وتعد عمليات المنافسة بين الصناعات الكيماوية والحيوية في هذه المنطقة ساخنة جدا . والمشتتات او المستحلبات الحيوية مواد تعمل عند سطوح الأطوار المادية مؤدية الى تقليل الشد السطحي ، وتقلل الشد السطحي عند تلاقي سطوح الأطوار المختلفة من المواد خاصة الكارهة والمحبة للماء وتساعد على امتزاجها .

واغلب الاحياء المنتجة هي من مستهلكات الهيدروكربونات والتي تكون قليلة الذوبان في الماء . اذ يبلغ ذوبان بعضها مثل Decane 10×3 مول⁻⁷ ، و Dodecane 10×1.7 مول⁻⁸ ، و Tetradeccane 10×9.8 مول⁻¹⁰ ، ومثل هذه لا يمكن للأحياء استعمالها الا اذا انتقلت الى الطور المائي ثم تنقل الى الخلايا ، وتوجد بعض الاحياء التي تنمو على السكريات والكحول الايثيلي ومواد اخرى وتستطيع ان تنتج المشتتات . والمشتتات الحيوية تعمل على التجزئة بين سطوح المواد المختلفة بدرجات مختلفة من القطبية والأواصر الهيدروجينية مثل سطوح تلاقي الزيت مع الماء او الهواء مع الماء .

هذه الصفات أدت الى جعل المشتتات او المواد المقللة للشد السطحي قادرة على تقليل الشد السطحي وتكوين المستحلبات Microemulsion وبمساعدهتها يمكن إذابة الهيدروكربونات والزيوت في الماء وبالعكس .

مزايا المشتتات الحيوية

لهذه المواد بعض الصفات الجيدة والتي يمكن ان تتفوق بها على نظيراتها الكيماوية ومنها :

- قليلة السمية .
- قابلة للتحلل الحيوي .
- ملائمة للبيئة ولا تسبب التلوث البيئي .
- تكون رغوة اكبر من المشتتات الكيماوية .
- لها انتقائية عالية ، وتكون متنوعة كثيرا .
- لها فعالية عالية عند تطرف الظروف مثل درجات الحرارة والأرقام الهيدروجينية والملوحة العالية .
- يمكن إنتاجها بطرق التخمير من مواد متجددة .
- تستعمل بتراكيز واطئة جدا .
- لذا يكون لها أسواق واسعة ويتوقع ان تزداد في المستقبل .

تركيب وتصنيف المشتتات الحيوية

تصنف المشتتات الحيوية اعتمادا على التركيب والأصل الميكروبي لها، اما المشتتات الكيماوية فيعتمد التركيب فقط في تصنيفها . والمشتتات الحيوية مركبات او جزيئات امفوتيرية أي جزيئات هجينة مكونة من اجزاء متباينة وبشكل عام تتكون من :

0 جزء محب للماء ويتكون من حوامض امينية او بيبتيديات موجبة او سالبة الشحنة او من سكريات أحادية او ثنائية او مكوثررة .

0 جزء كاره للماء ويتكون من مواد تحوي حوامض دهنية مشبعة او غير مشبعة مثل الدهون السكرية ، او بيبتيديات دهنية ، او دهون فوسفاتية او حوامض دهنية .

ويمكن ان تستعمل طبيعة المركبات في التصنيف ، فالبعض منها جزيئية Particulate . وتستعمل صفة قوة الجزء المحب للدهون والمحب للماء على سطح الجزيئية وهذه تعرف كما تم تبيانها في فصول اخرى بـ HLB (Hydrophile - lipophile balance) (يراجع الفصل السابع) وقيمها توضح فيما اذا كانت المادة ستؤدي الى انتشار الماء في الزيت او الزيت في الماء ، وذلك بمقارنتها بمشتتات معروفة فمثلا HLB للـ Oleic acid هي 1 وللـ Na- oleate تساوي 20 ، لذلك فان المستحلب المحب للدهون تكون قيم HLB واطنة أي أوطأ من المحب للماء .

فالقيم الأقل من 6 تؤدي الى تشتيت الماء في الزيت ، أما القيم 10 – 18 فلها تأثير معاكس وتؤدي الى استحلاب الزيت في الماء . وتكون قيم HLB لها علاقة بطول سلسلة الهيدروكربون (أي الجزء الكاره للماء) الذي تعمل عليه .

وبعض الأحيان تكون سطوح الخلايا بمثابة مشتتات حيوية وتؤدي الى تغير حالة استحلاب الأنظمة نظرا لتعقيد السطوح الخارجية والتي تكون فيها جزيئات محبة للماء وأخرى محبة للدهون ، فهي تحوي على بروتينات ودهون فوسفاتية وسكريات مكوثره دهنية ومستلمات للعائيات ومواقع التصاق وكل هذه تكون بمثابة حواجز أمام انتشار بعض المركبات . فمثلا سطوح الخلايا *Zymomonas mobilis* يكون توازنها HLB مساوي 22.5 ، والبكتريا *B. subtilis* يساوي 13.2 ، والبكتريا *Corynebacterium fascians* مساويا 4 .

وتقاس تراكيز المشتتات بحساب CMC (Critical micelle concentration) ، وتحسب القيمة من إضافة تراكيز متزايدة التي يرافقها انخفاض في الشد السطحي الى ان تصل الى قيمة حرجة تتكون جزيئات Amphiphilic أي تكون الفتيئات Micelle . وتنتج العديد من الاحياء المختلفة انواع مختلفة من المشتتات ضمن أصناف كيميائية مختلفة كما موضح في الجدول (55) .

جدول 55 : انواع المشتتات الحيوية الميكروبية

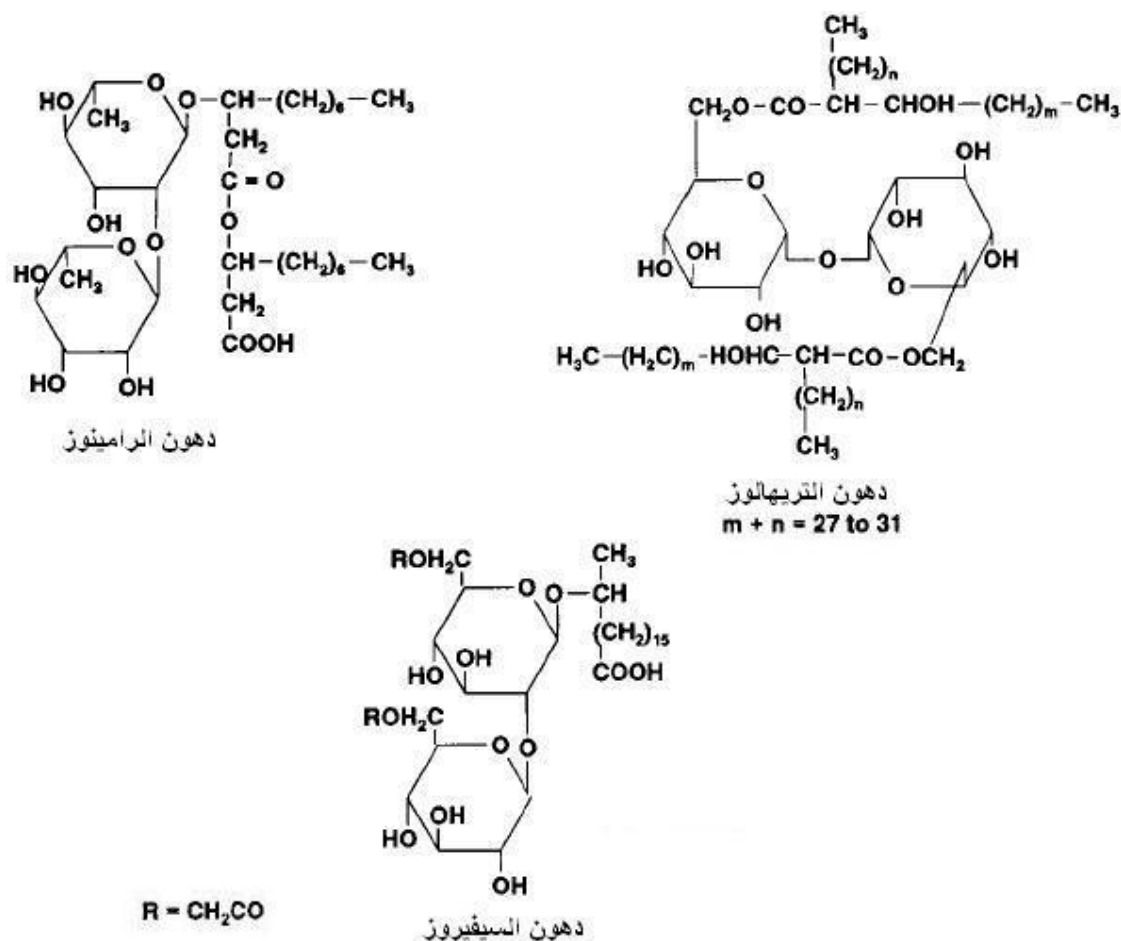
المشتت	الكائن المنتج	الشد السطحي (ملي نيوتن /متر)	التركيز الحرج CMC	الشد عند تلاقي الاطوار (ملي نيوتن /متر)
الدهون السكرية				
دهون الرامينوز	<i>Ps. aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	29 30 - 25	10 - 0.1	0.25 1
دهون التريهالوز	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Mycobacterium</i> sp.	36 - 32 30 38	4 20 0.3	17- 14 3.5 15
دهون السفيروز	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>T. apicola</i> <i>T. petrophilum</i>	33 30		1.8 0.9
دهون السيليبايوز	<i>Ustilago zaeae</i> , <i>U. maydis</i>			
الببتيدات والبروتينات الدهنية				
Peptide-lipid	<i>B. licheniformis</i>	27	- 12	- 0.1

0.3	20			
		33 – 28	<i>Serratia marcescens</i>	Serrawettin
	150	26.5	<i>Ps. fluorescens</i>	Viscosin
1	160 – 23	32 – 27	<i>B. subtilis</i>	Surfactin
			<i>B. subtilis</i>	Subtilisin
			<i>B. brevis</i>	Gramicidins
			<i>B. polymyxa</i>	Polymyxins
مشتتات الدهون				
2	150	30	<i>Corynebacterium lepus</i>	حوامض دهنية
3		230	<i>N. erythropolis</i>	دهون متعادلة
			<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	دهون فوسفاتية
المشتتات المكوثة				
			<i>A. calcoaceticus</i>	Emulsan
			<i>A. calcoaceticus</i>	Biodispersan
			<i>Candida tropicalis</i>	Mannan-lipid-protein
			<i>Candida lipolytica</i>	Liposan
	10	27	<i>Ps. fluorescens</i>	Carbohydrate-protein-lipid
			<i>Debaryomyces polymorphus</i>	
			<i>Ps. aeruginosa</i>	Protein PA
المشتتات الجزيئية				
<i>A. calcoaceticus</i>				الحوصلات والخمل Fimbrae
انواع مختلفة من البكتريا				الخلايا الكاملة

ومن أصنافها :

الدهون السكرية

من أكثر المشتتات المعروفة وهي كاربوهيدرات متصلة بسلسلة طويلة من الحوامض الاليفاتية او Hydroxyaliphatic acid والمستعمل منها بكثرة دهون الرامينوز Rhamnolipids ودهون التريهالوز Trehalolipids ودهون السفيروز Sophorolipids الموضحة تراكيبيها في الشكل (79) .



شكل 79: تركيب بعض المشتقات من الدهون السكرية المنتجة من الاحياء المجهرية

دهون الرامينوز

وتتكون من جزئية واحدة او اثنتين من سكر الرامينوز مع جريئة واحدة او اثنتين من β -hydroxydecanoic acid. وتنتج من جنس *Pseudomonas* ومنها *Ps. aeruginosa* تنتج نوعين منه. وتستطيع المادة تقليل الشد السطحي لخليط من n-hexadecane من 30 الى 25 والشد السطحي عند تلاقي السطوح او الأطوار الى حوالي 0.25، وكذلك تقلل من الشد السطحي لل-Alkanes وتشجيع النمو، وعند فقدان البكتيريا لإنتاج هذه المواد يقل نموها على الهيدروكربونات او ينعدم.

دهون التريهالوز

ويرتبط الجزء الدهني او الكاره للماء وهو حامض المايكولييك Mycolic acid الموجود في بكتيريا السل و *Nocardia* و *Corynebacterium* الى الذرة السادسة من احدى جزيئتي السكريات الأحادية المكونة له. وحامض المايكولييك المرتبط هو سلاسل طويلة من الحوامض الدهنية

المتفرعة كما موضح في الشكل أعلاه . وتختلف الاحياء في إنتاج المشتت اعتمادا على الجنس فمثلا *Rhodococcus* تنتج انواعا تختلف عن تلك المنتجة من *Arthrobacter* ويمكن ان تختلف المشتتات باختلاف المواد الأولية المستعملة للإنتاج وكذلك باختلاف ظروف التنمية الاخرى .

دهون السفيروز

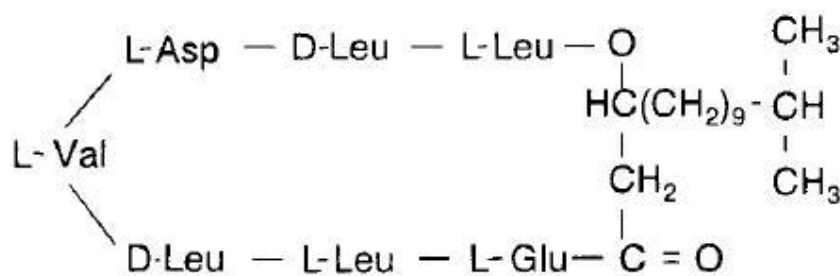
تنتج هذه المجموعة من الخمائر بشكل رئيس مثل *T. apicola, T. petrophilum, Torulopsis bombicola* ويتكون من جزيئيتين من سكر السفيروز مرتبطة بسلسلة طويلة من الحوامض الدهنية وهي خليط من 6 - 9 من Hydrophobic sophorosides المختلفة . وتوجد انواع اخرى في المجموعة تكون ذائبة في الماء تنتج من الخميرة *Candida bogoriensis* . والخميرة *T. petrophilum* لا تنتج دهون السفيروز عند نموها على الكلوكرز وإنما تنتج عوامل استحلاب تحوي على البروتينات وهي حالة استثنائية اذ ان المشتتات تنتج لاستهلاك المواد غير الذائبة في الماء .

البروتينات والبيبتيدات الدهنية

وتضم العديد من المشتتات :

- البيبتيدات الدهنية الحلقية ، منها مضادات حيوية مثل مضادات Gramicidins (بيبتيدات عشريّة) تنتج من *B. brevis* والبيبتيدات الدهنية مثل المضادات Polymyxins التي تنتجها *B. polymyxa* ولها صفات تقليل الشد السطحي .
- توجد انواع تحوي على الحامض الاميني الاورنثين تنتجه *Ps. rubescens* وكذلك تنتجه *Acidithiobacillus thiooxidans* . وتوجد مواد اخرى مثل Cerilipin وهي دهون تحوي على الاورنثين و Taurine وتنتجه *Gluconobacter cerinus* . اما البكتريا *Ag. tumefaciens* فتنتج مشتت يحوي على اللايسين .
- وتنتج *Serratia marcescens* مشتت يسمى Serratamolide يؤدي الى زيادة محبة الماء لسطوح الخلايا بغلقه المواقع الكارهة للماء .

ولعل اهم افراد هذه المجموعة من المشتتات هو Surfactin وهو من المشتتات القوية جدا وهو بيبتيد دهني حلقي تنتجه *B. subtilis* ويقلل من الشد السطحي للماء الطبيعي البالغ 72 ملي نيوتن / متر الى 29 بتراكيز واطنة جدا تصل الى 0.005 % ، وتركيبه موضح في الشكل (80) والذي يحلل كريات الدم الحمر لدم اللبائن لذا يمكن الكشف عنه في أوساط اكر الدم .



شكل 80 : تركيب المشتت Surfactin
(بستيد دهني حقيقي)

وتنتج البكتريا *B. licheniformis* 86 مشتتات تعمل بشكل متآزر عند درجات حرارية وأرقام هيدروجينية مختلفة فمثلا BL-86 يقلل الشد السطحي للماء الى 27 ملي نيوتن / متر ويتكون من خليط من الببتيدات الدهنية بوزن جزيئي 979 - 1091 دالتون . إضافة الى إنتاج Lichenysin A الذي يقلل الشد السطحي الى 28 عند CMC 12 مايكرو مول .

والاختلاف بين Surfactin و Lichenysin A ان الأول يحوي على الليوسين في النهاية الكربوكسيلية والثاني يحوي على الايزوليوسين ، كما ان الأول يحوي على حامض الاسبارتيك بدلا من الاسباراجين Asparagine .

الحوامض الدهنية والدهون الاخرى : ينتج عدد كبير من البكتريا والخمائر الحوامض الدهنية والمشتتات من الدهون الفوسفاتية عند نموها على Alkanes ومنها Phosphatidylethanolamine ينتج في حويصلات غنية به في البكتريا *Acinetobacter* ويساعد في استحلاب دقيق للالكينات في الماء . وينتج المركب ايضا من *R. erythropolis* عند نموها على الالكينات مؤديا الى تقليل الشد بين التقاء أطوار الزيت مع الماء الى اقل من 1 وبتركيز CMC يصل الى 30 ملغم / لتر .

ومن الاحياء المنتجة للدهون الفوسفاتية انواع من جنس الفطريات *Aspergillus* والبكتريا *Ps. aeruginosa* والبكتريا *At. thiooxidans* وبعض سلالات من *Arthrobacter* والاخيرة يمكن ان تجمع الدهون الى تراكيز تصل الى 40 % من وزن الخلايا عند نموها على Hexadecane وتجمع حوالي 80 % عند نموها على زيت الزيتون .

المشتتات المكوثة أفضل ما درس من هذه المجموعة هو Emulsan . وتحوي المجموعة على مشتتات اخرى مثل Liposan و Mannoproteins ومعقدات من البروتينات مع السكريات المكوثة .

: Emulsan

ويدعى ايضا Bioemulsan ينتج من البكتريا *A. calcoaceticus* RAG-1 اضافة الى انتاجه من عدد كبير اخر من الاحياء . العمود الفقري للمشتت سكريات مكوثره متباينة ، تحوي على مكررات من N- acetyl - D- galactosamine (25 %) و N- acetyl Dideoxy-diaminohexose بنسبة 25 % ويحوي في تركيبه galactosaminouronic acid بنسبة 25 % و 3- hydroxydodecanoic acid بنسبة 10 % و 2- hydroxydodecanoic acid بنسبة 10 % والباقي ماء ورماد . وترتبط السكريات المكوثره مع الحوامض الدهنية بأواصر استريه (O - ester) ، وهو مشتت قوي للهيدروكربونات حتى عند تراكيز واطئة تصل الى 0.001 - 0.01 % ويقاوم ارتفاع نسبة الماء الى الزيت 1 : 4 . ويقوم بفصل الخليط عند إضافته الى طبقة علوية غنية بالدهون عند تركه لمدة طويلة ، وتسمى الطبقة العلوية Emulsanosol وتحوي على 75 % من الزيت ، ويكون متخصصا في فعاليته فهو لا يشتمل المركبات الاليفاتية النقية او المركبات الحلقية ولكنه يشتمل خليط منهم ويعمل بمدى واسع من الأرقام الهيدروجينية ويحتاج الى الايونات الثنائية الموجبة .

يمكن إنتاجه من السلالة أعلاه باستعمال الكحول الايثيلي بنسبة 2 % كمصدر للكربون والطاقة و 80 % منه يطلق من الخلايا عند طور الاستقرار .

ومن أنواعه الاخرى المهمة Emulsan BD4 الذي ينتج من السلالة BD4 Ac. *calcoaceticus* وتنتجه على شكل مواد عليية Capsular materials كثيرة تطلق من الخلايا . وهو مكون من سكريات مكوثره مع البروتينات . وكل من الجزأين لا يكون فعالا لوحده اذ إنهما يتآزران في الفعالية اذ يرتبط الجزء البروتيني الكاره للماء مع الهيدروكربون في البداية بشكل غير قابل للرجوع ثم ترتبط السكريات وتساعد في تشتيت الزيت في الماء .

Biodispersan

نوع من المشتتات له وزن جزيئي 51400 دالتون . مكون من سكريات متباينة سالبة تنتجه البكتريا *A. calcoaceticus* A2 ، غير قابل للدليزة وسكرياته هي 6-methylaminohexose ، Glucosamine و Galactosamine uronic acid وسكريات امينية . وهو من مشتتات التراكيب الصخرية Lime stone اذ يرتبط الى مسحوق كاربونات الكالسيوم ويغير من صفاتها مما يجعلها تشتت في الماء لذلك يستعمل اثناء سحق الصخور .

Aasan

مشتت يتكون من سكريات متباينة ومواد بروتينية ويعد غير طبيعيا اذ يحوي على الحامض الاميني الالنين المرتبط تساهميا . تنتجه البكتريا *A. radioresistens* . تزداد فعاليته الى 2.5 - 3

مرات عند تسخينه الى درجة حرارة 100° م تحت الظروف القلوية والمعتدلة ، يفقد فعاليته عند إزالة الجزء البروتيني منه ، وذلك لان الجزء ألبروتيني له الدور الرئيس في تحديد الفعالية والجزء البروتيني يتكون من ثلاثة أجزاء بأوزان جزيئية 16 ، 31 ، 45 كيلو دالتون والأخير يشبه البروتين الموجود في الغشاء الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة كرام OmpA واليه تعزى الفعالية وإزالته تؤدي الى اختفاء فعالية التشيت . اما الجزء السكري فيعتقد انه مسئول عن إطلاق الجزء البروتيني الى الوسط وحمائته من الانزيمات المحلل للبروتينات ، اذ وجد ان الجزء البروتين (45 كيلو دالتون) النقي يتحلل بالتربسين ولكنه لا يتأثر عندما يكون مرتبطا بالسكريات .

ويظهر المشتت تصرفات مختلفة تجاه الحرارة فعندما تكون الحرارة اقل من 50° م تزداد لزوجته لكن قابليته على التشيت لا تتأثر . اما عند رفع درجة الحرارة من 50 الى 90° م تقل اللزوجة وتزداد فعالية التشيت الى 5 أضعاف وذلك يكون معتمدا على تداخل الجزء البروتين والجزء السكري . والتركيز الحرج CMC 200 مايكرو غرام / مليلتر وهذه وان كانت قليلة الا أنها تؤثر بشكل كبير في تشيت الزيت في الماء .

Liposan

مشتت ينتج خارج خلايا الخميرة المنتجة له *C. lipolytica* ، يذوب في الماء ويتكون من 83 % كاربوهيدرات و 17 % بروتينات . والجزء الكاربوهيدراتي يتكون من سكريات متباينة هي Glucosamine , Galactouronic acid والكلكتوز والكلوكوز .

Mannoproteins

تنتج هذه المركبات بكميات كبيرة من خميرة الخبز ولها فعالية تشيت قوية تجاه عدد من الزيوت والهيدروكاربونات والمذيبات العضوية ، يتكون من 44 % سكر المانوز و 17 % بروتين . وتنتج احياء اخرى مشتتات تحوي على Erythritol والمانوز مع الدهن مثل *Schizonella malanogramma* و *Ustilago maydis* .

تنتج العديد من البكتريا المشتتات عند نموها على النفط تحوي على الحوامض الامينية مثل السيرين والثريونين مع الدهون والكاربوهيدرات ، وتنتج بعض سلالات بكتريا *Acinetobacter* سكريات مكثرة خارجية عند نموها على الكحول الايثيلي تسمى Ethapolan .

المشتتات عالية الوزن الجزيئي

وإضافة الى ما ذكر اعلاه فتننتج بعض الانواع مشتتات ذات أوازن جزيئية عالية كما في سلالات *Acinetobacter* سواء عزلت التربة او عزلت المستشفى .

ومن الاحياء الاخرى المنتجة لمشتتات عالية الوزن الجزيئي *Rhodococcus spp* تشتت الزيت في الماء ، وكذلك تنتج البكتريا *Halomonas eurihalina* مشتت عالي الوزن الجزيئي حاوي على السكريات المتباينة الحاوية على الكبريت .

وتنتج *Ps. tralucida* مشتت عالي الوزن الجزيئي Acetylated polysaccharide الذي يستعمل في استحلاب المبيدات الحشرية .

وقد تكون المشتتات عالية الوزن الجزيئي مكونة من البروتينات فقط كما في البكتريا *Methanobacterium thermoautotrophium* التي تنتج معقدات بروتينية ذات أوزان جزيئية عالية وتعمل بمثابة مشتتات .

وقد تكون المشتتات المنتجة خليط من البروتينات والسكريات المكوثره والدهون التي تترتب بشكل معقدات كما في المشتت الذي تنتجه البكتريا *B. stearothermophilus* .

المشتتات الجزيئية Particulate biosurfactants

وهذه تكون موجودة في حويصلات غشائية على سطوح الخلايا . تقوم بتشيت الهيدروكربونات لتسهيل قبطها الى داخل الخلايا ، فمثلا الحويصلات المشتق من سلالات *Acinetobacter* يصل قطرها الى 20-30 نانومتر وكثافة طفوية تصل الى 1.16 غم / ملتر ، تتكون من البروتينات والدهون الفوسفاتية والسكريات الدهنية . وهذه الحويصلات تحوي على دهون فوسفاتية تصل الى خمسة أضعاف محتوى الأغشية الخلوية للكائن نفسه وتحوي على سكريات مكوثره تصل الى 350 ضعف .

دور المشتتات في فسلجة الخلايا

ان فعالية تقليل الشد السطحي للأحياء التي تستخدم الهيدروكربونات وكذلك الاحياء المرضية تعزى الى بعض التراكيب الموجودة على سطوح الخلايا مثل M protein و Lipotechoic acid في حالة المكورات المسببية مجموعة A ، وكذلك الى وجود البروتين A الموجود على سطوح *Staph . aureus* او الطبقة A في البكتريا *Aeromonas salmonicida* والصبغة الحمراء Prodigiosin في أنواع من جنس *Serratia* . وبعض المضادات الحيوية المرتبطة الى السطوح مثل Gramicidin على سطوح الابواغ مثل البكتريا *B. brevis* ، كما ان بعض التراكيب الأخرى مثل الخمل Fimbriae يمكن ان تساعد في استحلاب وتشيت المواد الكارهة للماء لتساعد الخلايا على استهلاكها كما في البكتريا المذكورة أعلاه *A. calcoaceticus* RAG-1 وغيرها .

والمشتتات تنتج من قبل العديد من الاحياء وهي اما ان تبقى مرتبطة الى سطوح الخلايا بشكل دائم اثناء النمو على مواد غير قابلة للامتزاج بالماء او تفرز الى خارج الخلايا الى الوسط المحيط والاحياء الفاقدة لها لا تستطيع النمو الا في حالة إضافة المشتتات الى الوسط الغذائي ومن وظائفها :

- تساهم المشتتات في المساعدة في نقل المواد الغذائية الى داخل الخلية .
 - تساهم في زيادة قابلية الخلايا على الالتصاق وفك الارتباط . وتعطي ثباتية أكثر للخلايا في البيئات القاسية وتزيد من ضراوة الممرضة منها .
 - تساعد الخلايا في فك ارتباطها من موقع والذهاب الى موقع بيئي آخر أكثر ملائمة لها .
 - تساهم في تضاد الاحياء المنتجة لها مع الاحياء الأخرى التي تشاطرها البيئة .
- ولذلك يلاحظ ان الخلايا تكون هذه المواد نظرا للحاجة والا فعند عدم الحاجة فان الجينات والأنظمة الوراثية تفقد قابليتها على التعبير عن الجينات التي هي في غنى عن منتجاتها وقد تتلاشى هذه الجينات والأنظمة بواسطة الطفرات والانتخاب على مدى طويل .

التخليق الحيوي وتنظيمه

ذكر في مستهل الموضوع ان المواد المشتتة تحوي على طرف كاره للماء وآخر محب للماء وهذا يعني وجود طريقتين : **الاول** لتخليق الجزء الكاره للماء **والآخر** لتخليق الجزء المحب للماء من الطلائع والمواد السابقة ، وكل مسار تشترك فيه إنزيمات معينة . وبالرغم من تنوع المواد هناك بعض المظاهر المشتركة في التخليق والتنظيم ومنها :

- في بعض الاحياء يخلق الجزء الكاره والمحب من جديد *de novo* بواسطة مسارات تخليقية غير معتمدة على بعضها .
 - في بعض الاحياء يخلق الجزء المحب للماء من جديد والجزء الكاره للماء يتم حثه ب مواد الأساس
 - قد يكون الجزء الكاره للماء هو الذي يتكون بدون حث والجزء المحب للماء هو الذي يتم حثه ب مواد الأساس .
 - يكون تخليق الجزء الكاره للماء والمحب للماء متأثرا بوجود مواد الأساس .
- وقد تم إثبات وجود كل الآليات المذكورة .

التنظيم

يتم تنظيم تخليق المشتتات الحيوية بطرق التنظيم الشائعة مثل الحث والكبح ، وتشارك في التنظيم مستوى كميات النتروجين مما يوضح العلاقة بين استهلاك النفط والذي يكون فقيرا بالمواد النتروجينية والفوسفات ، وكذلك يتأثر بوجود الايونات متعددة التكافؤ . والمشتتات التي هي بيبتيديات دهنية يمكن ان تحث بواسطة وجود الحوامض الدهنية طويلة السلسلة او الهيدروكربونات او الكليسيريدات الثلاثية .

اما الكبح فيتم بإضافة الكلوكوز ، او الكليسرول وحامض البالميتيك او بعض الحوامض العضوية مثل حوامض TCA . ولكن هذه القاعدة قد لا تكون عامة فمثلا البكتريا *Ps. aeruginosa* التي

تنمو على الكلوكوز ويضاف اليها حامض الاولييك يمكن ان تنتج المشتتات عند انتهاء الكلوكوز من الوسط الغذائي .

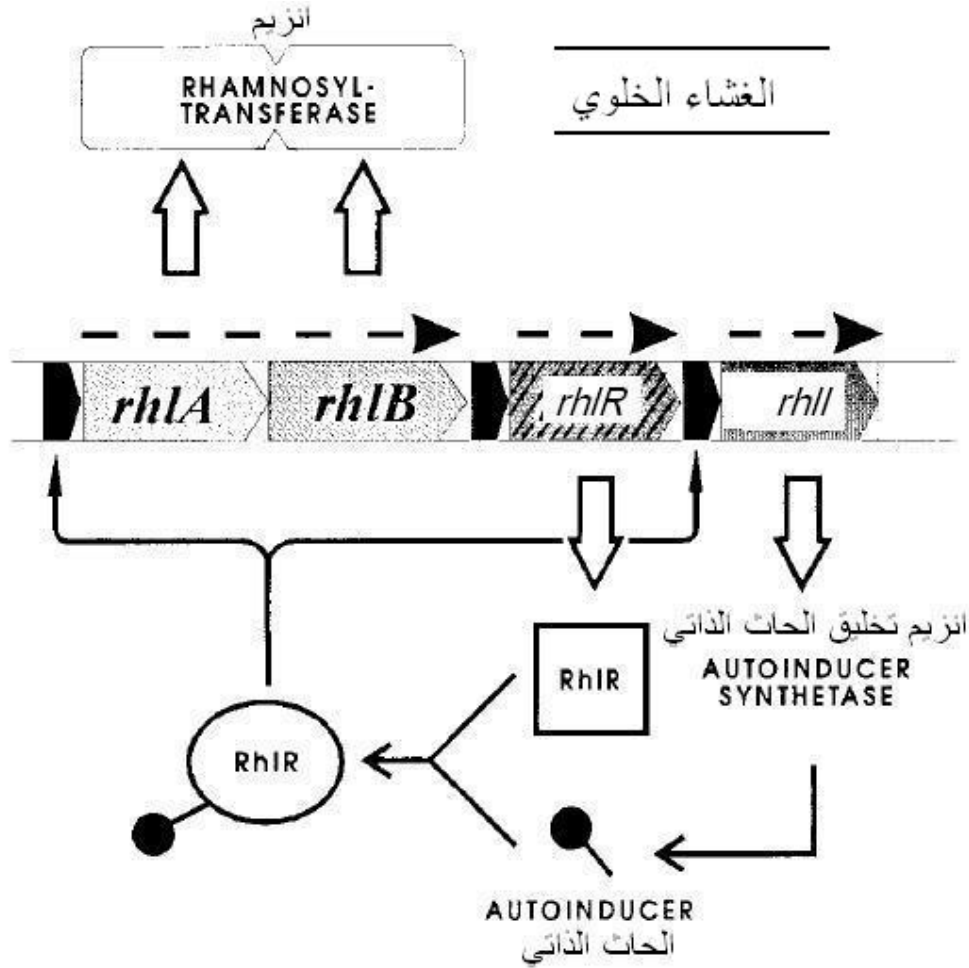
وتكون الايونات والنروجين من العوامل المهمة في التأثير على التنظيم كما ذكر ، ففي البكتريا المستعملة كنموذج دراسي في هذا المجال وهي *Ps. aeruginosa* تقوم بتخليق دهون الرامينوز عند استنزاف النروجين خاصة في طور الاستقرار ويتوقف إنتاجها عند إضافة النروجين للخلايا الهاجعة . ويعود ذلك الى علاقة تخليق المشتت (دهون الرامينوز) بالإنزيم Glutamine synthetase ، فوجود DL- glutamine و Glutamic acid والامونيا تلعب دورا مهما في تنظيم عمليات التخليق ، وعند استهلاك الكلوتامات والامونيا يؤدي الى نقص مصادر النروجين مما يؤدي الى حرف الايض من النروجين الى الكربوهيدرات وإنتاج دهون الرامينوز . وتتحكم هذه الظاهرة في إنتاج العديد من المشتتات في أحياء مختلفة .

ويتحفز إنتاج المشتتات ايضا عند قلة المعادن متعددة التكافؤ مثل أملاح المغنيسيوم والكالسيوم وكذلك البوتاسيوم والصوديوم والمعدن النادرة ، كما ان قلة الحديد تؤدي الى تحفيز الإنتاج في العديد من البكتريا .

ودرس التركيبية الوراثية للماكينة المختصة بإنتاج المشتت مثل دهون الرامينوز في النموذج الدراسي *Ps. aeruginosa* فوجد ان هناك مجموعة من الجينات هي *rhlABR* هي المسؤولة عن التخليق وتنظيمه كما موضح في الشكل (81) .

وإضافة الى هذه المجموعة من الجينات يوجد إنزيم Rhamnosyl transferase وهو معقد موجود في الغشاء الخلوي كما يظهر من الشكل ، ويكون بشكل معقد مع بروتين ناتج من قطعة DNA بحجم 32.5 كيلو دالتون هي ناتج الجين *rhlA* ويكون حاويا على توالي الإشارة . اما البروتين *rhlB* وحجمه 47 كيلو دالتون فيوجد في منطقة الفسحة المحيطة ويحوي على جزأين تشغل الغشاء الخلوي . اما الجين *rhlR* فهو يشفر لمنشط الانتساخ اذ ينتج بروتين بوزن 28 كيلو دالتون يعود الى العائلة *LuxR* وهو ينظم تخليق المشتت بشكل إيجابي .

إضافة الى ذلك يوجد الجين *rhlI* على يمين (Down stream) العنقود *rhlABR* ويشترك في عملية التنظيم . وفي البكتريا المدروسة يوجد تداخل بين وظيفة *hrlR* و *hrlI* ، اذ يقوم الأخير بتخليق مادة حاتة ذاتية تؤدي الى تحفيز إنتاج دهن الرامينوز .



شكل 81: أوبرون تنظيم إنتاج دهون الرامينوز في البكتريا *Ps. aeruginosa*

اما Surfactin فينظم بواسطة جينات كروموسومية هي *Sfp*, *SrfA*, *ComA*, *ComP* ففقدان الخلايا للجين *ComA* يؤدي الى فقدان قابلية الخلايا على الإنتاج وان كانت حاوية على الجينات الاخرى. و *ComA* يتم تنشيطه بعمليات الفسفرة من قبل *ComP* – histidine kinase الذي يكون بمثابة بروتين تحسس على الغشاء الخلوي. ففسفرة بروتين *ComA* يؤدي الى ارتباطه بقوة الى مهاد *SrfA* ويؤدي الى زيادة الانتساخ (أي انه جين مستحث على الاقل في البكتريا *B. subtilis*) بمساعدة عدة مواقع قريبة من الجين. والجين *SrfA* هو مسئول عن إنتاج عامل بيبتيدي فرموني الذي يكون مسئولا عن بداية عملية التبوغ في جنس العصيات لذلك فان هذه الفرمونات و Surfactin تكون لها مركبات وسطية مشتركة.

وتتأثر المركبات الوسطية لانتاج Surfactin بمنتجات الجين *Sfp* والمناطق القريبة منه ، اذ ينتج الجين بيبتيدي مكون من 224 حامض اميني تكون مسئولة عن تحويل المركبات الوسطية الى المشتت ، اضافة الى ان البيبتيد (224 حامض اميني) يكون مسئولا عن تنظيم انتساخ الاوبرون *SrfA* اما الجينات المسئولة عن تنظيم الجينات *ComA* و *ComP* فتقع في الاوبرون *SrfB* على الكروموسوم اذ تنتج بروتينات تعمل معقدات وتكون بمثابة منظمات ايجابية لعمل *SrfA* استجابة لمستويات الكلوكوز والكلوتامين .

قياس الفعالية وطرق التحري

تعتمد طرق البحث والتحري على قياس الفعالية بتحديد الشد السطحي للسوائل وأكثرها استعمالا الماء . وتتأثر الطرق بالعديد من العوامل والظروف . وتسفر هذه الطرق عادة عن تحديد قيم التوازن HLB والتركيز الحرج CMC (والتي تعرف بقابلية ذوبان مادة في الطور المائي لمعرفة كفاءتها) وتحتاج عمليات البحث او التحري الى طرق سريعة ، ومن الطرق المستعملة :

- الطرق اللونية وفيها يتم مفاعلة المشتتات السالبة مع دلائل موجبة ليتكون مركب ملون يمكن قياسه .

- طريقة تحليل شكل القطرة (Axisymmetric drop shape analysis) ADSA وفيه يتم وضع قطرة من مزرعة الكائن المنتج على سطوح أغشية خاصة Fluoroethylene - propylene surface ثم يحدد نسق القطرة بواسطة آلة تسجيل خاصة ، فالأحياء المنتجة هي التي تظهر نقص في الشد السطحي .

- طريقة انهيار القطرة السريع Rapid drop collapsing test وفيه توضع قطرة او عالق الخلايا على ورق مزيت ، فالنماذج الحاوية على المستحلبات تنهار او تنفوض القطرة ويتغير شكلها ، اما غير الحاوية على المستحلبات فعادة لا يتغير شكل القطرة .

- استعمال طريقة الاستشراب Chromatography .

- قياس معامل الاستحلاب Emulsification index ويكون بخلط حجوم متساوية من المزرعة مع الكيروسين (النفط الأبيض) ورج النموذج جيدا ثم تقاس النسبة المئوية للاستحلاب بعد 24 ساعة بطرق خاصة .

- يمكن قياس الشد السطحي عند تلاقي الأطوار مثل مزرعة خلوية مع الزيت واستعمال جهاز

قياس الشد Tensiometer

- استعمال الكشف عن تحلل الدم على الأطباق الحاوية على الدم كما في الكشف عن بعض مشتتات دهون الرامينوز .

وبهذه الطرق يمكن تحديد قيم التوازن HLB وقيم CMC . ولقياس CMC يتم تخفيف نموذج المستحلب عدة مرات ويقاس الشد السطحي لكل تخفيف لحساب CMC . ويمكن قياس فعالية المواد بالاعتماد على تكوين العتمة ، اذ ان هذه المواد عندما تشتت احد الأطوار السائلة وتجعله بشكل قطيرات صغيرة في الطور الآخر تنتج عتمة من القطيرات المتكونة ويكون ذلك باستعمال مواد محددة مثل الكيروسين في نظام او طور مائي الذي يكون شده السطحي القياسي 72 ملي نيوتن / متر . ويمكن للمواد المشتتة ان تزيل الاستحلاب ويمكن قياس هذه الفعالية وتقارن بمستحلبات صناعية معروفة .

عمليات الإنتاج

تعتمد عمليات الإنتاج على السلالات المنتجة ولكن هناك عدة طرق عامة منها :

- الإنتاج المرتبط بالنمو وفي هذه الحالة يكون انتاج المشتتات مرتبطا بعلاقة متوازية مع النمو واستهلاك مواد الأساس . وتكون مختلفة بين السلالات والمواد المراد إنتاجها واهم المشتتات المرتبطة بالنمو هو Emulsan الذي ينتج من البكتريا *A. calcoaceticus* RAG-1 ولكن تحت ظروف محددة . وهذه البكتريا تنتج مواد مشابهة للـ Emulsan تتراكم على سطوح الخلايا أثناء الطور اللوغاريتمي ثم تطلقها الى الوسط المحيط عندما تقل عمليات تخليق البروتينات .
- الإنتاج تحت ظروف نمو محددة ، بعض المواد يزداد إنتاجها عندما تصل المزارع الى طور الركود والاستقرار نتيجة لقلة النتروجين والفسفور او الحديد ومنها المواد المنتجة من *Nocardia* وبعض الخمائر .

ويكون التأثير معتمدا على الخلايا المنتجة فمثلا في بعض انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام يكون نقص الفوسفات محفزا للإنتاج عند نموها على الكحول الايثيلي . اما ايونات الصوديوم والمغنيسيوم والحديد وكذلك الفوسفات تكون من المحفزات في البكتريا *Rhodococcus* . ويؤثر الحديد على انتاج دهون الرامينوز في البكتريا *Ps. aeruginosa* بشكل كبير فتزداد الكمية الى ثلاثة الضعاف عند تقليل تركيز ايونات الحديد الى النصف دون التأثير على الكتلة الحيوية .

- الإنتاج بواسطة الخلايا الساكنة او المقيدة وفي هذه الحالة لا يحصل نمو للخلايا ولكنها تستمر في استهلاك المواد الأولية لغرض إنتاج المشتتات الحيوية وتستطيع العديد من البكتريا والفطريات والخمائر سلوك طريقة الإنتاج هذه . وتكون الطريقة مهمة من الناحية الاقتصادية ، اذ تقلل من تكاليف الحصول على المنتج وذلك بفصل مرحلة النمو وتكوين الكتلة الحيوية عن طور الإنتاج .
- إضافة الطلائع الى مزارع الخلايا مما يؤدي الى حصول تغييرات في العمليات الإنتاجية ، ففي بعض الخمائر يمكن ان يزداد الانتاج الى 120 – 150 غم / لتر عند اضافة مواد محبة للدهون ،

ونتائج مشابهة يمكن الحصول عليها مع احياء اخرى عند اضافة الكربوهيدرات او السكريات الملائمة الى وسط النمو .

العوامل المؤثرة على الانتاج

هناك بعض العوامل التي تؤثر على العملية الإنتاجية والتي يمكن ان تجعلها عملية اقتصادية او غير ذلك ومنها :

مصادر الكربون

بصورة عامة تزداد الإنتاجية عند إضافة الألكينات (n- alkanes) وزيت الزيتون مقارنة بإضافة مصادر الكربون الذائبة في الماء . والمصدر الكربوني يؤثر على نوعية وتركيب المنتج وطول سلسله في العديد من الاحياء المنتجة . وهو بصورة عامة يعكس طول السلسلة في الهيدروكربون المستعمل للإنتاج .

اما عند وجد الكلوكوز فان الخلايا تكون المشتتات في طور الاستقرار، ولو ان بعض الأحياء تنتج المشتتات عند نموها على الكلوكوز ولكن تبقى مرتبطة بالخلايا ويمكن ان تطلق بواسطة Hexadecane ، لذلك يمكن ان تنتج الكتلة الحيوية في المرحلة الأولى ثم تزود بالهيدروكربونات لبدأ عمليات إنتاج المشتتات .

ويمكن ان تصل مستويات الانتاج الى 80 – 90 غم / لتر في ظروف التنمية العادية وهذا يعني ان حوالي 37 % من الكربون المستعمل يذهب لتصنيع المشتتات عند استعمال المزارع المتقطعة المغذاة Fed-batch ويمكن ان يزداد ما يصب من الكربون الى 40 % في تصنيع المشتتات ويصل الإنتاج الى 120 غم / لتر فيما اذا اخذ بنظر الاعتبار ان الإنتاجية تتأثر بمصادر الكربون المستعملة .

مصادر النتروجين

وتعتمد على السلالة المستعملة فبعضها يزداد الإنتاج فيها عند استعمال مصادر لا عضوية من النتروجين مثل أملاح الامونيوم او استعمال اليوريا . في حين ان احياء اخرى تفضل النترات واخرى تفضل الحوامض الامينية مثل حامض الاسبارتيك وحامض الكلوتاميك او الاسباراجين او الكلايسين ، وتؤثر الحوامض الامينية على تركيب وكمية المنتج .

فإضافة حامض الكلوتاميك يزيد من انتاج A Lichenysin من البكتيريا B. licheniformis فمثلا اضافة الاسبراجين تؤدي الى زيادة تصل 4 اضعاف .

اما في سلالات Pseudomonas فتكون قلة النتروجين مشجعة لإنتاج المشتتات وتؤثر على طبيعة تركيب المشتت الناتج .

اما نسبة الكربون الى النتروجين فهي لا تؤثر في معظم السلالات ما دام النتروجين موجود بشكل غير مؤثر على الإنتاج والخلايا مستمرة في إنتاج الكتلة الحيوية .

الظروف الأخرى

وهي الرقم الهيدروجيني والحرارة وتوفر الأوكسجين وكلها تؤثر في الإنتاج نظرا لتأثيرها على نمو وفعاليات الخلايا ، وتأثيرها يمكن ان يعتمد على المصدر الكربوني ، ولكن يمكن ان تؤثر على تركيبيه المشتت بعد الانتاج فبعض المشتتات لا تتأثر بارتفاع درجة الحرارة اذ يمكن ان تبقى ثابتة بدرجة 120 °م لمدة 15 دقيقة عند استعمال المؤصدة Autoclave .

وتتأثر المشتتات بعمليات الرج والخلط نتيجة وجود قوى القص . فيقل المشتت المرتبط بالخلايا عند زيادة قوى القص كما في بعض السلالات مثل *B. subtilis* ويزداد إنتاجها من Surfactin عند زيادة التهوية والرج .

اما الأملاح فيؤثر تركيزها المرتفع على الإنتاج بشكل غير مباشر وذلك بتأثيرها على فعاليات الخلايا وبصورة عامة فان معظم السلالات لا يتأثر إنتاجها عند ارتفاع تراكيز الأملاح الى 10 % وان يحصل تأثير على CMC للمشتتات الناتجة .

إنتاج المشتتات بالتحويل الحيوي

زاد الاهتمام بإنتاج المشتتات الحيوية بعمليات التحويل الحيوي وما شجع ذلك وجود تشابه بين أسترات السكرور Sucrose esters الموجودة في المشتتات التجارية والمشتتات الحيوية من مجموعة الدهون السكرية ، ويتم التحويل بالحصول على الجزء الكاره للماء من المصادر الحيوية والجزء المحب للماء من المشتت التجاري ثم ربطهم إنزيميا لإنتاج مشتتات تجارية ، اذ ان الإنزيمات تكون متخصصة جدا وتعمل بظروف اعتيادية . وقد أمكن تحويل ليسثين فول الصويا الى مشتت جديد باستعمال الإنزيم Phospholipase المستخرج من البكتريا المكورة المسبحية *Streptococcus chromofuscus* .

وتعد انزيمات تحلل الدهون Lipases , Phospholipases هي الأكثر اهمية لهذه الأغراض التجارية ، فيستعمل الإنزيم الحال للدهن المستخلص من الفطر *Rhizopus delemar* لإنتاج دهون فوسفاتية مختلفة في درجة التشبع من الدهون الفوسفاتية لفول الصويا وزيت الأسماك . ويستعمل إنزيم الخميرة *C. cylindracea* لإنتاج مشتتات من السكرور والكلوكوز والفركتوز والسوربيتول مع الحوامض الدهنية مثل الأوليك والستياريك وكانت كفاءة التحول 80 % ويمكن تحضير المشتتات من زيت السلجم Rapeseed باستعمال إنزيمات مختلفة المنشأ .

استخلاص المشتتات الحيوية

تعد عملية الاستخلاص من مراحل التصنيع والإنتاج المهمة ويمكن ان تصل كلفتها الى 60 % من الكلفة الإجمالية وتعتمد عمليات الاستخلاص على :

- موقع المشتت من الخلية .
- شحنة المشتت .
- قابلية الذوبان في الماء .
- الطبيعة الكيماوية للمشتت .

والجدول (56) يوضح اهم الطرق الممكن استعمالها في الاستخلاص .

جدول 56 : الطرق المستعملة لفصل المشتتات الحيوية

المشتت	الطريقة
الطرق المتقطعة	
Emulsan Biodispersan	الترسيب بكبريتات الامونيوم
Surfactin	الترسيب بالحامض
دهون التريهالوز دهون السفيروز Liposan	الاستخلاص بالمذيبات
دهون السليبايوز الدهون السكرية	التبلور
الطرق المستمرة	
الدهون السكرية	الطرد المركزي
دهون الرامينوز البينيتيدات الدهنية الدهون السكرية	الامتزاز
Surfactin	فصل الرغوة وترسيبها
مشتتات مختلفة	الترشيح المماسي
دهون سكرية	ترشيح فائق

وأكثر الطرق شيوعا هو الاستخلاص بالمذيبات . ويمكن الاستخلاص بأكثر من طريقة وبشكل خطوات متتابعة وكذلك يمكن الاستخلاص بالطرق المستمرة او المتقطعة كما في استخلاص Surfactin .

ويمكن الاستخلاص من الرغوة بعد تجميعها وتحميضها الى رقم هيدروجيني 2 بحامض الهيدروكلوريك (HCl) ثم يرسب المشتت بمادة مناسبة او يسلط هواء على الرغوة وتجمع وتفصل موادها بالطرد المركزي ثم يستخلص الراسب بمواد ملائمة مثل استعمال الأسيتون .

ويمكن فصل المشتت بالترشيح المماسي او غيره من طرق الترشيح . وقد يتم الاعتماد على خاصية تجمع جزئيات المشتت لذلك تفصل باستعمال أغشية خاصة وبهذه الطريقة يمكن استخلاص 98 % من دهون الرامينوز وهذه توفر طريقة سهلة ولكن يجب العناية باختيار الأغشية المستعملة .

التطبيقات العملية

دراسة المشتتات الحيوية يوفر فرصة لفهم عمليات نمو الاحياء المجهرية على مواد غير ذائبة . فخلط المشتتات للمواد في الماء يهيأ الفرصة لعمليات كثيرة في مجالات الصناعات الغذائية واستخلاص النفط ومجالات الصحة والبيئة .

صناعات النفط

وتستعمل المشتتات في مجالات شتى في هذه الصناعة (يراجع الفصل السابع) ، وفيها لا يشترط ان يكون المشتتات على درجة عالية من النقاوة لذلك يمكن استعمال مزارع الاحياء مباشرة . وتحتاج الصناعة الى كميات قليلة جدا مقارنة بالمشتتات الصناعية او الكيماوية ، اذ تصل CMC المستعملة الى 10 مايكروغرام / لتر وهي اقل 10 - 40 مرة من المواد الصناعية وعند استعمال Emulsan في معاملة النفط الثقيل يؤدي الى تقليل اللزوجة من 200000 سنتي بوايز (cp) الى 100 وبذا يمكن ضخه بسهولة الى مسافات بعيدة في حين تفشل المشتتات الكيماوية في هذه العمليات . وتستعمل المشتتات الحيوية في معاملة حمأة النفط الحاوية على كميات كبيرة من الطين ويمكن الحصول على 90 % من النفط المخلوط بالوحل . وتستعمل في معالجة البيئة من تلوث النفط ومشتقاته التي تنتشر نتيجة الحوادث و تترسب في المياه وتلوث السواحل ، وتساعد المشتتات الاحياء المنتجة لها على استهلاك الهيدروكربونات في البيئات الملوثة وتعطي الاحياء المنتجة نتائج أفضل من الاحياء غير المنتجة المستعملة لمعالجة البيئة الملوثة .

الصناعات الغذائية

يعد استعمال المشتتات الحيوية في الصناعات الغذائية من أوسع مجالات التطبيق (يراجع الفصل العاشر) ، وفي هذه الصناعة يمكن استعمال انواع مختلفة من المشتتات ، وتستعمل كمواد تحور التبلور او مستحلبات ، او منظفات او مواد مرطبة ، وتستعمل في إنتاج الرغوة وفي عمليات التزييت وغيرها من العمليات ومما يساعد او يشجع استعمالها كونها مواد قابلة للتحلل الحيوي . وهي يمكن ان تدخل كاحد المكونات الغذائية لتساعد في :

- منع ظاهرة التجلد Staling في منتجات العجين .

- التقليل من وقت تبلور السكريات .
- تساعد في إذابة زيوت النكهة .
- تمنع ظاهرة تناثر زيوت ودهون الطبخ عند الطبخ الحراري .
- تستعمل لإزالة الطبقات الخارجية والأغطية من الفواكه والخضر .
- تستعمل في التنظيف والتعقيم وإزالة المبيدات .
- تستعمل كمضافات غذائية لإضفاء بعض الصفات على الأغذية ، ومنها ما يستعمل كمواد سائدة في تصنيع تلبيسات السلطات مثل المشتت المنتج من الخميرة *C. utilis* .
- تستعمل في إنتاج بروتين الخلية الواحدة SCP من الهيدروكربونات مثل n- paraffin لاستعمالها كمدعمات غذائية .

حماية البيئة

إضافة الى ما ذكر من قابليتها للتخلص من التلوث بالنفط ، فالمشتتات الحيوية تساعد في التخلص من التلوث بالمعادن الثقيلة مثل التخلص من اليورانيوم والكاديوم والرصاص وكذلك تساهم في تعدين هذه المعادن . ويمكن ان تساعد في تخليص البيئة من المواد السامة ضمن فعاليات المعالجة الحيوية (يراجع الفصل السابع) .

المجالات الصحية

تستعمل المشتتات الحيوية في أغراض كثيرة لهذا المجال منها الصناعات الصيدلانية وتشكيل الأدوية وصناعة مواد التجميل .

تستعمل دهون السفيروز كمرطبات للجلد ، كما ان عددا كبيرا من مواد التجميل تحضر من تحويل الجزء الكاره للماء بواسطة الإنزيمات الحالة للدهون . لذلك تكون مجالا واسعا لتحضير مواد التجميل الحيوية Biocosmetics ، اذ تدخل مع المكونات الأخرى مثل الكولاجين ومواد تحمل الماء لمنع جفاف الجلد وتجعبه . ومثل هذه المستحضرات تحوي على الدكستريانات الحلقية Cyclodextrins والصبغات ذات الأصل الحيوي ويطلق على بعضها بمستحضرات التجميل العلاجية Cosmeceutics التي تشارك فيها المشتتات الحيوية مشاركة فاعلة جدا .

ونظرا لان مواد التجميل تحتاج الى مدة صلاحية تصل الى 3 سنوات لذا يفضل استعمال مجاميع أسيل مشبعة على المجاميع غير المشبعة لذا تفضل دهون السفيروز .

ويفضل في بعض الأحيان استعمال المشتتات من نوع Monoglycerides والحقيقة هي الأكثر استعمالا في صناعة مواد التجميل لذلك تحضر الأخيرة باستعمال طريقة التحول الحيوي باستعمال إنزيم اللايباز من البكتريا *Ps. fluorescens* .

بعض المشتتات الحيوية يكون لها تأثير المضادات الحيوية او هي بالأحرى مضادات حيوية مثل Gramicidins و Polymyxins كما ذكر سابقا . وهناك بعضها تمنع ارتباط فيروس الايدز الى خلايا الدم البيض التي يصيبها .

ومن التطبيقات الأخرى هو إنتاج المشتت الرئوي Pulmonary surfactant بطرق الهندسة الوراثية والتخمير ، والمشتت معقد بروتيني مع الدهون الفوسفاتية ونقصانه يؤدي الى فشل عمليات التنفس عند المواليد الخدج لذلك عزل الجين المسئول عنه وتم التعبير عنه في البكتريا وأصبح بالإمكان إنتاجه .

وتنتج *R. erythropolis* مستحلب مشتق من دهون التريهالوز Succinyl – trehalose lipid يثبط فيروسات الهربس Herpes simplex وفيروسات الأنفلونزا بتركيز تصل الى 10 – 30 مايكروغرام / مليلتر .

وللمشتتات مجالات اخرى للاستعمال منها :

- تستعمل في معالجة إصابات النباتات مثل استعمال 1 % من دهون الرامينوز لمعالجة نبات *Nicotina glutinosa* المصاب بفيروس التبغ الموزائيكي (Tobacco mosaic virus) TMV وكذلك في السيطرة على الأمراض الفيروسية التي تصيب البطاطا (Potato virus X disease) . وتستعمل لأغراض زراعية اخرى مثل تحضير المخصبات .
- تستعمل في صناعة الورق وتحضير لب الأشجار .
- تستعمل في صناعة الأنسجة .
- تستعمل في صناعة الفحم .
- تستعمل في صناعة السيراميك .

تحسين العمليات الإنتاجية

تعاني صناعة المشتتات الحيوية من الكلفة المرتفعة للإنتاج لذلك يكون مردودها الاقتصادي محدود او سلبي ولذلك تحاول الجهات المهمة والعاملون إيجاد الحلول منها :

- استعمال المواد العرضية والفضلات الصناعية او الزراعية للإنتاج ولكن تحت شروط وذلك لتأثير المواد الأولية على تركيب المشتت ، كما يجب حساب كلفة المعاملات الأولية للفضلات وإدخالها ضمن موازنة العملية الإنتاجية .

وفي هذا المجال أمكن إدخال اوبرون اللاكتوز الى سلالات بكتريا *Pseudomonas* المنتجة لدهون الرامينوز وأمكن إنتاج الاخير من الشرش الذي يمثل اهم المواد العرضية لصناعات الألبان . ويمكن استعمال بقايا صناعة فول الصويا والبطاطا وبقايا دهون اللحوم والدجاج وفضلات المياه للأغراض الإنتاجية .

- التلاعب بظروف الإنتاج مثل الحرارة والرقم الهيدروجيني وغيرها من المؤشرات وكذلك دراسة أفضل حالات الإنتاج باستعمال المزارع المستمرة أو المغلقة أو الحالة الوسط بينهما .
 - استعمال مزارع مختلطة يمكن ان يؤدي الى انتاج مشتتات غير متخصصة .
 - استعمال تخمرات المواد الصلبة للإنتاج .
 - العناية بعمليات الاستخلاص .
- ومما يزيد في الحصول على المشتتات استعمال أنظمة تخمير ثنائية للأطوار السائلة ، حيث تفصل الخلايا المنتجة عن المواد التي تعمل عليها بواسطة أغشية أو غيرها من الوسائل أو ترتيب المفاعلات الحيوية بحيث تكون الخلايا مفصولة عن المواد التي تنتجها وهذا يؤدي غرضين :
- ◊ عدم الحاجة الى فصل الخلايا من وسط التخمر أو المشتت الحيوي .
 - ◊ بعد المنتجات عن الخلايا يؤدي الى إلغاء حالة التثبيط بالمنتجات .
- استعمال الهندسة الوراثية لإنتاج سلالات ذات إنتاجية مفرطة وذلك ممكنا بوجود طرق الكشف السريعة المذكورة أنفا ، وبذلك يمكن ان تصمم سلالات تنتج كميات كبيرة تغطي الكلفة .
 - إجراء عملية التعويض فمثلا مواد التجميل والصناعات الصيدلانية تكون صناعات صغيرة الحجم غالية الثمن ويمكن بالاعتماد عليها امتصاص الكلفة العالية لإنتاج المشتتات الحيوية .
- وتحاول الشركات الخاصة إنتاج إنزيمات تعمل في الأطوار اللامائية لإنتاج مستحلبات حسب الطلب وهي توجهات حديثة تحاول ضخ المشتتات الحيوية للسوق للتخلص من التلوث بالدرجة الأولى

الإنزيمات القلوية

مر في فصل علاقة التقنية بالأغذية مناقشة الإنزيمات واستعمالاتها التي تعد أوسع المجالات تطبيقا لاستعمال الإنزيمات . ولكن هناك بعض الجوانب الصناعية التي تحتاج الى استعمال الإنزيمات . وتتصف الإنزيمات المستعملة في مجال الصناعة بمواصفات خاصة مثل العمل في ظروف متطرفة من الأرقام الهيدروجينية والحرارة وتركيز الأملاح . وأكثر الإنزيمات التي تجد لها تطبيقات صناعية هي الإنزيمات القلوية .

الإنزيمات القلوية : الإنزيمات التي تعمل بأرقام هيدروجينية مرتفعة مثل 11.5 منها البروتيز السيريني ، واغلب الإنزيمات يمكن ان تعمل بدرجات حرارية مرتفعة فمثلا البروتيز السيريني يمكن ان تبقى 75 % من فعاليته عند رقم هيدروجيني 13 وبدرجة حرارة 60 °م . ويمكن لإنزيمات أخرى ان تتحمل حرارة 80 °م وبرقم هيدروجيني 12 – 13 ، والبعض منها تعمل بوجود 10 % من Sodium dodecyl sulphate (SDS) او بوجود 8 مول من اليوريا ، وهذه الإنزيمات تنتج عادة

من الإحياء المحبة للقلوية Alkaliphiles ، لذا سيتم التطرق الى بعض مواصفات هذه المجموعة من الاحياء .

اولا الاحياء المحبة للقلوية

الأحياء التي تنمو بشكل امثل او بشكل جيد جدا عند رقم هيدروجيني أعلى من 9 وعادة يكون بين 10-12 ، ولا تستطيع النمو او النمو بشكل بطيء جدا عند الأرقام الهيدروجينية المتعادلة (6.5 - 7) . واستعملت الاحياء منذ القدم لإنتاج البروتينات القلوية او القاعدية وكذلك الاميليزات القاعدية والسلييزات القاعدية . وتقسم الاحياء الى مجموعتين رئيسية :

- الاحياء المحبة للقلوية Alkaliphiles .

- احياء المحبة للقلوية والملوحة Haloalkaliphiles .

ومثلما ذكر ان الاحياء المحبة للقلوية تحتاج الى رقم هيدروجيني أعلى من 9 ، اما المجموعة الثانية فهي تحتاج ايضا الى رقم هيدروجيني أعلى من 9 إضافة الى حاجتها الى تراكيز عالية من كلوريد الصوديوم تصل الى 33 % وهي توجد في البحيرات القلوية Soda lakes ، وتضم الاحياء المحبة للقلوية مجاميع فسلجية مختلفة منها :

احياء محبة للقلوية هوائية : وتوجد انواع منها تعيش مع العدلات Neutrophiles او توجد في بيئات متطرفة القلوية . تعزل عادة على أوساط غذائية مرتفعة الرقم هيدروجيني حوالي 10 ، ويتم رفع الأرقام الهيدروجينية باستعمال كاربونات الصوديوم نظرا لحاجتها لايونات الصوديوم . ويصل تعدادها في الترب المتعادلة الى $10^2 - 10^5$ / غم تربة ، أي يصل تعدادها الى 1 : 100 - 1 : 1000 من تعداد العدلات . وتنتشر هذه الاحياء ايضا في البحار اذ عزلت من عمق 11000 متر وتشمل أنواعا من الأجناس Streptomyces Bacillus , Micrococcus , Pseudomonas ، والبعض يعود الى مجموعة الاركيا واخرى تعود الى حقيقيات النواة مثل الخمائر والفطريات التي عزلت من بيئات مختلفة .

احياء محبة للقلوية لا هوائية : واغلب أفراد هذه المجموعة يعود الى جنس Clostridium مثل Cl. thermohydrosulfuricum و Cl. paradoxum وهي من الاحياء المحبة للحرارة وتعيش برقم هيدروجيني 7.6 - 9.8 وتشمل ايضا الجنس Anaerobranca horikoshii الذي يكون الرقم هيدروجيني الامثل لها 8.5 وحرارة 60 م° .

ومن الاركيا Thermococcus alcaliphilus وهي اركيا محبة لحرارة متطرفة وتنمو على الكبريتات المتعددة برقم هيدروجيني 10.5 وحرارة تتراوح بين 56 - 90 م° وعزلت من مناطق البراكين وتقوم باستعمال الكبريتات المتعددة وعنصر الكبريت وتخزنهم الى كبريتيد الهيدروجين

ثانياً المحبة للقلوية والملوحة

توجد هذه المجموعة من الاحياء في الصحاري القلوية والبحيرات المتطرفة مثل البحيرة Magadi في كينيا وبحيرة وادي النطرون في مصر والتي تعد من اكثر البيئات ثباتاً على الأرض ويتراوح الرقم الهيدروجيني فيها 10.5 – 12 اعتماداً على الموقع . وتعزل من هذه البيئات :

◊ **الاراكيا** : التي تمتاز بوجود فجوة خلوية في الخلايا التي هي في طور الاستقرار . والاراكيا التي عزلت منها *Natronobacterium vacuolata* التي تنتج مستعمرات وردية اللون ومحتواها من GC حوالي 62.7 % ، واخرى *Na. magadii* التي عزلت من بحيرة كينيا وتمتاز المجموعة باحتوائها على مشتق لسكر التريهالوز 2- sulfotrehalose كاحد التنافذيات المهمة (يراجع الفصل السادس) والذي يزداد تركيزه بازدياد تركيز الملح ، وقد أعيد تصنيف وتسمية هذه الأحياء لأنها تعود الى مجموعة الاراكيا . وعزلت اراكيا اخرى اطلق عليها *Natronorubrum* التي تحتاج الى 12 % من كلوريد الصوديوم وهي خلايا سالبة لصبغة كرام متغيرة الأشكال ، غير متحركة وهوائية مجبرة وتعيش برقم هيدروجيني 8 – 11 وعزلت ايضا *Tindallia magadii* من بحيرة كينيا .

◊ **مولدات الميثان** : وتحوي المجموعة المحبة للقلوية والملوحة بعض أفراد مجموعة المولدة للميثان تحتاج الى كلوريد الصوديوم بتركيزات تتراوح بين 0.5 – 2.5 مول ورقم هيدروجيني متعادل وبعضها يحتاج الى رقم هيدروجيني 10 . وقد عزلت الاراكيا المولدة للميثان المجبرة للعيش في ظروف قلوية وهي *Methanosalsus zhilinaeae* ويسمى الجنس بعض الاحيان *Methanohalophilus* وهذه لا تحتاج الى الكلوريد وإنما تحتاج الى ايون الصوديوم والكربونات الهيدروجينية (HCO_3^-) وتنمو في رقم هيدروجيني 8 - 10 .

◊ **مجموعة البكتريا المزرقية** : وتوجد بأعداد كبيرة في البحيرات او البيئات المذكورة ولكن لم تسجل لها استعمالات صناعية لحد الآن . ومنها جنس *Synechocystis* وتستهلك المجموعة نظام النقل المتعاكس لنقل ايونات الصوديوم Na^+ / H^+ antiport .

◊ **الاحياء الاخرى** : تحوي البيئات القلوية المتطرفة على مجاميع من الاحياء الاخرى منها :

- 1- البكتريا المؤكسدة للكبريت مثل *Desulfonatronovibrio hydrogenovorans* .
- 2 - بكتريا مختزلة للكبريتات والتي تعتمد على الصوديوم ولا تنمو بأرقام هيدروجينية متعادلة وإنما تنمو برقم هيدروجيني امثل 9.5 – 9.7 والحد الأعلى لها 10 وتحتاج تركيز كلوريد الصوديوم 3 %

ثالثاً الحلزونييات Alkaliphilic spirochetes وتحوي المجموعة على عدد من الأجناس عزلت من بحيرات كينيا ومناطق قلوية اخرى .

النواحي الفسلجية وتركيب محبات القلوية

يكون الرقم هيدروجيني داخل الخلايا بحدود 8 بغض النظر عن ارتفاعه خارج الخلايا ، وهذا يعني ان مهمة المحافظة على الرقم الهيدروجيني الداخلي تقع عند الحدود الخارجية للخلايا . ويمكن تحديد الرقم الهيدروجيني الخلوي بعدد من الطرق منها :

- ◊ قياس الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليات إنزيماتها الداخلية المعزولة من الخلايا .
 - ◊ دراسة المحلول الخلوي الناتج من تكسير الخلايا والذي يكون خاليا من الخلايا وفعاليتها مثل عمليات تخليق البروتينات .
 - ◊ دراسة توزيع القواعد الضعيفة بين داخل وخارج الخلايا والتي لا تنقل بالنقل الفعال .
- والجدول (57) يوضح الأرقام الهيدروجينية الداخلية لبعض أنواع جنس العصيات المحبة للقلوية
- #### الجدار الخلوي

جبيلات سلالات جنس العصيات المحبة للقلوية لا يمكن ان تعيش في الظروف القلوية مما يشير الى دور الجدار الخلوي في الحفاظ على الخلايا من الظروف القلوية . وبمقارنة تركيب جدران الخلايا المحبة للقلوية ونظيراتها من العدلات يكون المكوثر أجداري البييتيدوكلايكان مختلفا اذ يكون في الاحياء المحبة للقلوية غنيا بالمكوثرات الحامضية الخاصة مثل Galacturonic acid وحوامض الكلوكونيك والكلوتاميك والاسبارتيك والفوسفوريك ، إضافة الى وجود بعض المركبات الخاصة في أحياء من غير جنس العصيات ، وقد يكون وجود الشحنات السالبة على هذه المكوثرات التي تعود للبييتيدوكلايكان مساعدا في دفع ايونات الهيدروكسيد وتساعد على امتزاز ايونات الصوديوم وايونات Hydronium وبذا تستطيع النمو في البيئات القلوية .

نقل ايونات الصوديوم

البكتريا التي تعيش في أرقام هيدروجينية عالية (9 - 11) تحتاج ايون الصوديوم للنمو اذ يساعدها في نقل المواد خلال الاغشية الخلوية . واعتمادا على نظرية الضخ الكيماوي فان القوة الدافعة للبروتون pmf التي تتكون نتيجة لضخ البروتونات عبر الاغشية والتي تجبر البروتونات على الدخول ثانية والذي يكون دخوله مرافقا لتخليق ATP (يراجع الفصل الثاني) . وفي الاحياء التي تعتمد على ايون الصوديوم فان Na^+ تستبدل مكان H^+ بواسطة نظام النقل المتعاكس Na^+ / H^+ antiport وبذلك تتكون القوة الدافعة للصوديوم Sodium motive force (smf) ، وفيها يعود Na^+ الى الخلية ويرافق دخوله إدخال المواد الغذائية ، اما الايونات الاخرى مثل البوتاسيوم والامونيوم فلا تؤثر على فسلجة الخلية .

جدول 57 : الأرقام الهيدروجينية الداخلية لبعض الأجناس التابعة للاحياء المحبة للقلوية

الرقم الهيدروجيني الداخلي	الرقم الهيدروجيني الخارجي	الكائن الحي
8.0 7.6 8.6 9.2	8.0 9.0 10.0 11.0	<i>B. alcalophilus</i>
7.7 8.0 8.3 8.9 9.6	7.0 9.0 10.8 11.2 11.4	<i>B. firmus</i>
8.5 7.9 8.1 8.4	7.5 8.5 9.5 10.2	<i>Bacillus strain</i> YN-2000
7.3 7.4 7.6 7.8 7.9 8.1 8.2 8.4	7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5 10.0 10.5	<i>B. halodurans</i> C- 125

وتساعد عمليات ضخ الصوديوم او وجود مضخات الصوديوم في المحافظة على الرقم الهيدروجيني الداخلي ، وتقوم الجدران الخلوية ببعض هذه المهمة كما ذكر اعلاه . وعند الغشاء الخلوي يجب ان تكون الأرقام الهيدروجينية اقل من 8.5 – 9 وذلك لأنها سوف تعاني من التدمير وهذه الأرقام تكون ملائمة لنمو الخلايا . لذلك تقوم مضخات الصوديوم باستعمال أنظمة النقل المتعكس المذكورة .

ان تكون الفرق في الجهد الكهربائي على جانبي الغشاء $\Delta\psi$ (الذي يكون ذات قيم سالبة داخل الخلية) والفرق في الأرقام الهيدروجينية ΔpH تعتمد على نظام H^+ / Na^+ الذي يؤدي الى تكون smf وتساعد في هذه العملية أنظمة النقل المتعكس K^+ / H^+ وكذلك نظام $ATPase - drive H^+$ explosion كلها تؤدي الى جعل الرقم الهيدروجيني داخل الخلية اقل بـ 2.3 – 3 وحدة عن القيم خارج الخلية . وهناك عدة اوبرونات تعمل في هذه الفعاليات منها الاوبرون atp المسئول عن F_1F_0

ATPase synthetase . وبذلك يكون لبروتينات الأغشية الدور الأكبر في الحفاظ على الرقم الهيدروجيني داخل الخلايا عند حدود معينة .

استعمالات الانزيمات القلوية : تمتاز الانزيمات القلوية بقلّة الحوامض الامينية ذات الشحنة السالبة مثل حامض الاسبارتيك والكلوتاميك وكذلك قلّة ثمالات اللايسين ، وتوجد بها زيادة من ثمالات الارجنيين والحوامض الامينية المحبة للماء المتعادلة مثل الهستيدين والاسباراجين والكلوتامين .

البروتيازات القلوية

تعمل في أرقام هيدروجينية مرتفعة وفي اغلب الاحيان بدرجات حرارية مرتفعة ومنها :

◊ إنزيم Keratinase يعمل على الكيراتين وهو من البروتينات غير الذائبة ، وتستعمل الإنزيمات لتحليله في أرقام هيدروجينية تتراوح بين 10.5 – 11.5 ، والانزيم من الانزيمات السيرينية . ويستعمل في تحليل الريش ، كما في استعمال الإنزيم المستخلص من *Streptomyces pactum* الذي يستعمل برقم هيدروجيني 7 – 10 بدرجة حرارة 40 – 70 °م .

◊ بروتيازات Actinomycetes تنتج المجموعة انزيمات يمكن ان تعمل في ظروف متطرفة ومنها *Thermoactinomyces spp* تنتج بروتيازات سيرينية تعمل في رقم هيدروجيني 11 وبدرجة حرارة 70 °م وتزداد فعاليته بوجود ايونات الكالسيوم ويصبح متحملا لحرارة 80 °م وتنتج انواع من *Streptomyces* بروتيازات سيرينية تعمل برقم هيدروجيني 11.5 وحرارة 60 °م .

◊ بروتيازات الاركيا القاعدية تنتج بعض أفراد المجموعة المحبة للقلوية مثل *Natronococcus occultus* التي تنتج بروتيازات في طور الاستقرار من أطوار نموها وتعمل الانزيمات بحرارة 60 °م وبوجود 1 – 2 مول من كلوريد الصوديوم واليوتاسيوم .

استعمالات البروتيازات القاعدية

تستعمل في مجالات كثيرة وخاصة . وتستعمل الانزيمات بدرجات حرارة عالية لذا وجب استخلاصها من أحياء تعيش بدرجات حرارة عالية ومن استعمالاتها :

- تستعمل في المنظفات التي تشكل اكبر أسواقها اذ وصلت نسبتها نهاية القرن الماضي الى 30 % من الاستعمال الصناعي للإنزيمات .
- تستعمل في إزالة الشعر والدباغة برقم هيدروجيني 8 – 10 وتسوق الانزيمات تجاريا لهذا الغرض .
- تستعمل لإزالة الأغشية الجيلاتينية من أفلام الأشعة السنية وبذلك تسمح باستخلاص الفضة منها ، ومنها البروتياز المسوق B18 الذي يعمل برقم هيدروجيني 13 وبدرجة حرارة 85 °م .

الانزيمات المحللة للنشا القاعدية

الانزيمات المنتجة من الاحياء المحبة للقلوية ومنها α - amylase ويحوي الانزيم على 3 أجزاء رئيسية A , B , C ، ويوجد انزيم مقارب له - Cyclomaltodextrin glycosyl transferase (CGTase) يحوي على الاجزاء المذكورة إضافة الى أجزاء أخرى هي D , E . والاميلزات القلوية تنشط في أرقام هيدروجينية 9 – 11.5 وأعلى فعالية مسجلة عند رقم هيدروجيني 10 – 10.5 ، والانزيمات تنتج السكريات وعند استعمالها مع النشا وتحول 70 % منه الى كلكوز ومالتوز وسلاسل ثلاثية المالتوز .

والاحياء المنتجة للاميلزات القلوية تنتمي الى مجاميع مختلفة منها المحبة للبرودة وأخرى محبة للحرارة والملوحة . وأكثر الإنزيمات أهمية من الناحية الصناعية من المجموعة هو CGTase وينتج من سلالات تعود الى جنس العصيات التي تنتج 3 انواع منه ، الإنزيم ألحامضي ويعمل برقم هيدروجيني 4.6 ، والنوع المتعادل ويعمل برقم هيدروجيني 7 والنوع القاعدي الذي يعمل برقم هيدروجيني 8.5 . اهم استعمالاته في تحضير الدكستريانات الحلقية Cyclodextrins ، وتحضر باستعمال انزيمات معزولة من احياء محبة للحرارة وأخرى محبة للبرودة البعض منها معزولة من أعماق البحار .

تستعمل الانزيمات لانتاج الدكستريانات الحلقية من مختلف الأنواع α , β , γ من نشا الذرة وأكثر الأنواع إنتاجا هو β سواء باستعمال الانزيمات الحرة او المقيدة ، والمقيدة تكون أفضل وتؤدي الى تبلور الدكستريانات الناتجة من المحلول دون الحاجة الى عمليات تنقية معقدة وبذلك تقلل من الكلفة بالنسبة للنوع β بنسبة 99 % و 98 % بالنسبة للنوع α وتستعمل الدكستريانات الناتجة في الصناعات الغذائية والكيمائية والصيدلانية .

ويتم استعمال الانزيمات بشكل مقيد في مفاعلات حيوية محورة مثل وضع أغشية فاصلة لتقليل تأثير النواتج على الانزيمات ، او تقييد الانزيمات على اغشية شعرية تستعمل في المخمرات وهذه الانواع من التحوير تسمح باستعمال CGTase في عمليات مستمرة .

انزيمات Pullulanases

الإنزيمات التي تعمل بدرجة حرارية 55°م ورقم هيدروجيني 8.5 – 9 تستعمل في صنع منظفات الأواني اما التي تعمل بدرجات حرارة واطنة فتستعمل في التصنيع الغذائي .

انزيمات تحلل السليلوز Cellulases

المتوفر منها والمستعمل على نطاق تجاري هو ليس من الانزيمات القاعدية وانما من الإنزيمات التي تعمل برقم هيدروجيني 4 – 6 . ولكن على النطاق المختبري توجد سلالات من جنس العصيات

تنتج CMCases (Carboxy methyl cellulose) تعمل بمدى واسع من الأرقام الهيدروجينية 5 – 10 . وتوجد سلالات تعمل أنزيماتها برقم هيدروجيني امثل 9 .

وقد امكن تحضير Chimeric CMCase يعمل بمدى واسع من الأرقام الهيدروجينية 6 – 10.5 ويستعمل في مضافات مساحيق الغسيل ، وهو لا يثبط بالمعادن ، والمستحضرات تحوي أيضا على مواد خلاصة و Surfactin وبروتينات اخرى . واكثر الاحياء المنتجة لهذه الانزيمات هو جنس العصيات ولكن توجد انواع من جنس *Streptomyces* تنتج هذه الانزيمات ولكن أنزيماتها لا تلاؤم التطبيقات الصناعية .

وقد امكن اجراء التحوير الوراثية على جنس العصيات للحصول على سلالات مفرطة للإنتاج باستعمال البلازميد pHSP64 الذي يحمل الجينات المسؤولة عن تخليق النظام الإنزيمي وكانت السلالات الناتجة تنتج الإنزيم بحدود 30 غم / لتر .

وتستعمل الانزيمات في العديد من الصناعات غير صناعة المنظفات ومنها صناعة الأنسجة اذ تتم عملية إزالة الغرى من الأنسجة (Desizing) للقطن بواسطة الاميلزات ، اما الأنسجة المقصورة فيتم حكها بالحجر قليلا لتبدو بالية ولكن هذه تؤثر على الأنسجة لذلك تستعمل مستحضرات تحوي على الانزيمات المحللة للسليولوز وتستعمل على مناطق محددة ليبدو القماش قديم وبالي ولكن بطرق حيوية . اضافة الى استعمالها في التلميع الحيوي Biopolishing للأنسجة .

الانزيمات المحللة للدهون

تستعمل هذه الانزيمات في صناعة المنظفات ايضا واهم منتجاتها جنس *Pseudomonas* مثل *Ps. fragi* , *Ps. nitroreducens* وتعمل برقم هيدروجيني امثل 9.5 وهي تثبط بأملح الصفراء مثل Na- taurocholate , Na – deoxycholate , Na –cholate بتركيز تصل الى 0.25 % . ومن الاحياء الاخرى المنتجة جنس العصيات التي تنتج انزيمات محللة للدهون تعمل برقم هيدروجيني 9.5 ودرجة حرارة 60° م .

وتنتج الانزيمات من بعض سلالات خميرة *Candida* بطريقة تخمرات المواد الصلبة وتعمل الانزيمات برقم هيدروجيني 8.5 وحرارة 40° م وهي تنشط بايونات النيكل والكالسيوم ولكنها تثبط بايونات الحديدوز والحديدك .

الانزيمات المحللة للخشب Xylanases

تستعمل في صناعات الأخشاب مثلا في عمليات القصر الحيوي Biobleaching بدلا من استعمال الكلور . تنتج بشكل رئيس من جنس العصيات مثل *B. halodurans* . وتوجد سلالات او أنواع من جنس العصيات تنتج هذه الانزيمات مع الانزيمات المحللة للسليولوز التي تعمل في ظروف قلوية تصل الأرقام الهيدروجينية فيها الى 10 وبدرجات حرارية 50° م .

وتنتج *B. stearotherophilus* انزيمات هذه المجموعة التي تعمل برقم هيدروجيني 9 وحرارة 65°م وتستعمل في قصر عجينة الورق ولا تؤثر على السليلوز .
ومن المجاميع الأخرى التي تنتج انزيمات محللة للخشب افراد من جنس *Streptomyces* مثل *S. thermoviolaceus* التي تستعمل في القصر الحيوي وتكون ثابتة بدرجة حرارة 65°م .
وبشكل عام فإن الانزيمات يمكن ان تستعمل كمساعدات للقصر بالكلور اذ يمكن ان تقلل من الكلور المستعمل على شكل اوكسيد الكلور بنسبة 35 % .

الانزيمات المحللة للبكتين Pectinases

تنتج انزيمات هذه المجموعة من جنس العصيات ومنها الإنزيمات *Endopolygalacturonate lyase* ، *Endopolygalacturonase* اللذان يعملان برقم هيدروجيني امثل 10 . وتوجد انزيمات أخرى إضافة للمذكورة .
تستعمل الانزيمات الحالة للبكتين في :

- صناعة الورق .
- إنتاج أوراق فاخرة لا تعتمد على الخشب كموايد أولية .
- تستعمل في إزالة الصمغ من الألياف والأنسجة .
- تستعمل في تعطيل الألياف Retting .

الانزيمات المحللة للكايتين Chitinases :

تنتج الانزيمات القلوية منها من جنس العصيات وكذلك من *Nocardiosis albus* . والإنزيم المنتج من العصيات يعمل برقم هيدروجيني 7.5 – 9 وحرارة 45 – 55°م .
ولا يوجد تطبيقات تجارية لها في الوقت الحاضر ولكن الحاجة يمكن ان تجد طريقها ، فهي يمكن ان تستعمل في المبيدات الحيوية للحشرات والفطريات والخمائر لوجود الأهداف التي تعمل عليها في هذه الاحياء .

إنتاج خيوط العنكبوت

تتصف خيوط العنكبوت بمواصفات عدة تجعلها أكثر ملائمة للصناعة من العديد من الألياف الأخرى . فالخيوط أقوى الألياف قطرها يصل الى 1 : 10 من قطر شعرة رأس الانسان ، ، وتنتج العناكب الخيوط التي يهتم بها من ناحية التقنية الحيوية الانواع *Araneus diadematus* و *Nephila clavipes* والأخيرة تسمى الغزالة الذهبية ، وتنتج العناكب نوعين من الخيوط وهي خيوط السحب او السدى Dragline silk وهي التي تكون دعائم الشبكة العنكبوتية وهي خيوط غير لزجة . والنوع الآخر خيوط اصطياد الحشرات فتكون لزجة . وبشكل عام تعتمد طبيعة الخيوط

على تغذية العنكبوت . والخيوط الناتجة تكون مكوثرات بروتينية تنتج من الخلايا الطلائية لغدد متخصصة في العنكبوت مكونة من مكررات للحمضين الامينية الالنين والكلايسين .

وتنتج الخيوط بشكل خليط من بروتينات ذائبة ثم تنتظم في تركيب يتكون من جزء بلوري غني بالحمض الاميني الالنين (ASAAAA) المسؤولة عن الوظيفة الميكانيكية للخيوط ، وتكون مطمورة في أرضية غير منتظمة غنية بالكلايسين (GGYGPG) المسؤولة عن مرونة الخيوط .

صفاتها واستعمالاتها

تمتاز خيوط العنكبوت وخصوصا خيوط السدى التي يهتم بها بالاتي :

- مواد قابلة للتحلل الحيوي .
 - قوية جدا ورقيقة جدا ولها نسبة عالية من القوة نسبة الى الوزن لذلك فهي أقوى من الفولاذ بالنسبة للوزن ، وتكون أقوى 5 أضعاف من قوة الفولاذ المساوي في القطر .
- ونظرا لكون الخيوط مكونة من مكررات متشابهة أي انها متجانسة التركيب لذا تكون مفيدة في الصناعات التي تكون فيها النوعية ضرورية حيث لا يحصل التغير بين وجبة وأخرى .
- وللخيوط قابلية تمدد كبيرة اذ يمكن ان تتمدد الى الضعف دون ان تتكسر أي انها خيوط مرنة وتصل مرونتها ضعف مرونة النايلون ، وبذا تكون أقوى واخف من الألياف والأنسجة المستعملة في صناعة ألبسة الجنود . لذا يرام استعمالها في صنع ألبسة وقبعات الجنود التي تصنع من عدة طبقات تصل الى 13 طبقة من الانسجة الخاصة لتكون واقية من الرصاص وكذلك يرام استعمالها في صناعة الدروع . ونظرا لقوتها وخفتها فيمكن ان تستعمل في صناعة مظلات وحبال القفز من الطائرات ، إضافة الى إمكانية استعمالها في صناعة هياكل الطائرات ، وكذلك في صناعة شبكات الصيد البحري نظرا لمقاومته للماء . ولرفع الليف وقلة قطره فيمكن استعماله في العمليات الجراحية في العيون وغيرها من مواقع الجسم .

الحقيقة ان هذه الاستعمالات استنبطت من الاستعمالات الطبيعية والعفوية التي تمارس في المناطق التي تتوفر فيها الخيوط فهي تستعمل في بعض البلدان الآسيوية في صناعة الشباك نظرا لمقاومتها للماء ، كما انها تستعمل في لف وتغليف الجروح لوقف النزيف .

الهندسة الوراثية لخيوط العنكبوت : كل الصفات أعلاه ترشح الخيوط كمادة تستحق الاهتمام بها . ولكن لعدائية العناكب وصعوبة تربيتها لم تستغل مثل دودة القز (دودة الحرير) . والبروتين بسيط وتم تحديد الجينات المسؤولة عن تخليقه ففي العنكبوت *A. diadematus* تحوي على جينين 4- ADF-3 وفي العنكبوت الآخر *N. clavipes* فالجينات المسؤولة *Masp I* و *Masp II* ، وتم تحديد تواليات القواعد النروجينية فيها .

وقد نقلت الجينات في *E. coli* التي تستعمل في إنتاج العديد من البروتينات العلاجية والمواد الصيدلانية ، ولكن هذه الخطوة واجهتها المشاكل ومنها ان الخلايا تجمع كل من الالنين والكلايسين من الوسط المحيط ويمكن ان تموت ولكن هذه لا تعد مشكلة كبيرة ، وانما كان البروتين الناتج قد تجمع في الخلايا بشكل غير ذائب من التجمعات والتكتلات ، والخيوط المهندسة كانت اقل كفاءة وتحتاج الى عمليات معقدة للاستخلاص . فضلا عن ان الإنتاج في البكتريا يكون قليلا وغير اقتصادي .

وإدخال الجينات الى الخمائر أعطى نتائج غير مشجعة ايضا ، لذلك تم التفكير باستعمال احياء اخرى مثل النباتات او الحيوانات . ووضعت الجينات في خلايا لبائن مزروعة وهي الخطوة التي تلت استخدام الاحياء المجهرية . واستخدمت لهذا مزارع خلايا لبائن خاصة وأنتجت الخلايا التي استلمت الجين *ADF-3* بروتين بوزن جزيئي 60 كيلو دالتون ولكن النتائج لم تكن مشجعة ايضا .

ولم تلاق عملية الإنتاج النجاح الكبير عند نقل الجينات الى النباتات حيث استعملت لهذا الغرض نباتات التبغ والبطاطا . لذلك كانت اخر المحاولات هو استعمال الحيوانات اللبونة وبدأ باستعمال الماعز لهذا الغرض لأنها سهلة التربية ولا تحتاج الى مكان كبير، كما انها منتجة للحليب وهو الأهم . وحققت الجينات في الغدد اللبنية لإنتاج الحليب الحاوي على بروتينات الخيوط ، وقد أعلنت إحدى الشركات الكندية المهتمة عن انتاج الخيوط في حليب الماعز واطلق عليه الفولاذ الحيوي *Biosteel* . وعندما يراد زيادة الإنتاج يمكن ان يصار الى استعمال الغدد اللبنية للأبقار . وتعد الغدد اللبنية ملائمة جدا لمثل هذه العمليات الإنتاجية اذ يتم التعبير عن الجينات في الخلايا المفترزة للحليب فقط .

ويمكن استخلاص البروتين من الحليب او مزارع خلايا اللبائن بفصله بالترسيب او الطرد المركزي بعد إزالة بروتينات ودهون الحليب والمواد الاخرى و تفصل البروتينات اعتمادا على الوزن والتي يصل وزنها الى 60 – 140 كيلو دالتون . يلي ذلك إذابة البروتينات في محلول مائي معين ويدخل الى ماكينة التشكيل ويمر خلال ثقب صغيرة ، ويبدأ بالتصلب عند تعرضه للهواء ويغمر في حمام من الكحول لزيادة تصلبه ، ثم تزال الألياف الناتجة من المحلول المائي وتكون بشكل خيوط طويلة يمكن برمها وحياتها .

اللدائن الحيوية Bioplastics

تعد اللدائن عامة من ضروريات الحياة في الوقت الحاضر لكثرة استعمالها وتنشعبه . واغلبها ينتج من النفط ومشتقاته وهذا يؤدي الى تلوث البيئة نظرا لصعوبة تفككها ، وكذلك تصبح غير مجددة نظرا للقفزات الكبيرة في أسعار النفط الخام . لذلك بدأت بعض البلدان بالتوجه الى انتاج اللدائن الحيوية Bioplastics (وتسمى Biopol) وبدا الانتاج في السبعينات بعد أزمة الطاقة التي حصلت . واللدائن الحيوية هي مكوثرات تنتج بشكل رئيس من البكتريا .

طبيعة تركيب اللدائن الحيوية : اللدائن الحيوية مركبات صديقة للبيئة تنتج من مصادر متجددة والمستعمل منها هو PHB (Poly - β - hydroxybutyrate) وهي إحدى المواد التابعة لمجموعة المكوثرات او اللدائن الحيوية الاكبر PHA (Polyhydroxyalkonates) ، وهو بلاستيك حراري Thermoplastics يمكن ان يستخلص من عدد من البكتريا . تتجمع المادة على شكل حبيبات داخل الخلايا وتمثل خزين للكربون والطاقة ويوجد في الساييتوبلازم والبعض يرتبط بالجدران الخلوية وينتج تحت ظروف المجاعة ونقص الأغذية مما يشير الى أهميته الفسلجية للخلايا . وتستعمل المادة في تصنيف البكتريا . وتكون المواد قابلة للتحلل الحيوي .

الاحياء المنتجة : توجد العديد من مجاميع بدائية النواة التي تنتج اللدائن الحيوية منها :

- البكتريا الهوائية التي تقوم بعملية التخليق الضوئي .
- البكتريا الهوائية ذاتية التغذية سالبة او موجبة لصبغة كرام .
- بكتريا متباينة التغذية سالبة او موجبة لصبغة كرام .
- مجموعة من البكتريا المزرقة والزاحفة .
- مجموعة من Actinomycetes .
- البكتريا المؤكسدة للحوامض الدهنية اللاهوائية .
- البكتريا المستهلكة للنفط .
- مجموعة الاركيا .

واهم البكتريا المستعملة للإنتاج التجاري *Alcaligenes eutrophus* التي يمكن ان يصل إنتاجها الى 90 % من الوزن الجاف .

وتستعمل بضع افراد جنس العصيات التي يجمع البعض منها 50 – 70 % من الوزن الجاف عند ملائمة الظروف ومنها *B. subtilis* , *B. megaterium* , *B. firmus* ، والبعض منها تجمعه أثناء عملية التبرغ .

ويكون محتوى الخلايا من PHB معتمدا على ظروف التنمية ، ويمكن لبعض البكتيريا انتاجها من حمأة النفط المنشطة

انتاج اللدائن الحيوية وتحسينها

نظرا لما تتصف به اللدائن الحيوية من جهة واتساع أسواقها في المستقبل القريب فالمتوقع ان تكون أسواق اللدائن الحيوية في اتساع مستمر فيتوقع في عام 2007 ان تشكل اللدائن الحيوية 10 % من أسواق اللدائن العامة البالغة 40 مليون طن في دول أوروبا . فالجهود مستمرة منها ما يهدف للتحري عن احياء منتجة من مصادر مختلفة ، ومنها ما يحاول تحسين العمليات الإنتاجية من الاحياء المنتجة المستعملة ، وهناك توجهات اخرى نحو استعمال الهندسة الوراثية ، وكلها تهدف الى زيادة الإنتاج وتحسينه ، وبعض الشركات تنتج في الوقت الحالي من عمليات التحول الحيوي للسكريات والدهون . وتنتج اللدائن الحيوية او الميكروبية Microbial thermoplastics من أفراد جنس *Alcaligenes* والبعض منها يستخدم لإنتاج PHB ولدائن ومكوثرات مرافقة تحت الاسم التجاري العام Biopol ومن الانواع المستعملة *A. lotus* و *A. eutrophus* .

ومن اهم مشاكل تسويق المكوثرات او اللدائن الحيوية هو ارتفاع كلفة الإنتاج خاصة من ناحية المواد الأولية التي تصل نسبتها الى 40 – 50 % من الكلفة الإجمالية للإنتاج ، وكلفة انتاج PHB من البكتيريا *A. eutrophus* تصل الى 18 ضعف إنتاج Polypropylene الصناعي . لذا يتوقع ان تكون العمليات الإنتاجية باستعمال الهندسة الوراثية مخفضة للكلفة الى حد الربع والتي تكون مقاربة لكلفة انتاج اللدائن الاخرى القابلة للتحلل الحيوي مثل Polylactides .

ويمكن باستعمال الهندسة الوراثية تحديد مواصفات المادة المنتجة او زيادة كمياتها ، وقد امكن تحويل البكتيريا *E. coli* K12 لإنتاج كميات كبيرة من المكوثرات بعد نقل بلازميد متعدد النسخ يحمل جينات تخليق المكوثر من *A. eutrophus* . باستعمال الكوكوز الذي يمكن الحصول عليه من المحاصيل النباتية المتجددة . وعمليات الهندسة الوراثية في مجال اللدائن الحيوية يمكن ان تساعد في :

- زيادة الحاصل .
- تسهيل عمليات الاستخلاص نتيجة لزيادة تركيز المواد المنتجة .
- امكانية انتاج انواع جديدة من اللدائن .

وبهندسة *E. coli* يمكن إتمام عملية الانتاج في 24 ساعة مقارنة بـ 3 ايام عند استعمال السلالة المنتجة الأصلية *A. eutrophus* ، وقد وصلت الإنتاجية تحت الظروف الملائمة الى 90 % من الوزن الجاف للخلايا وهذا يعني ان كمية قليلة من الكربون تذهب لبناء الكتلة الحيوية . وبما ان الخلفية الوراثية لـ *E. coli* معروفة جيدا فهذا يعني إمكانية إنتاج مكوثرات جديدة .

ويرام في اغلب الاحيان انتاج اللدائن ذات طول سلاسل المتوسطة Medium length

chain PHAs (mcl -PHAs) التي وجدت بداية انها تنتج من قبل البكتريا *Ps. putida* GPo1 (سابقا *Ps. oleovorans* GPo1) .

مميزات انتاج PHB في *E. coli* المهندسة وراثيا

- إمكانية استعمال مصادر كثيرة من الكربون مثل اللاكتوز والزايلوز والسكروروز وغيرها ويزيد من إمكانية استعمال مواد أولية رخيصة مثل الشرش والمولاس والمخلفات الزراعية .
- سرعة الإنتاج كما موضح اعلاه .

- تكون عمليات الاستخلاص من الخلايا المهندسة وراثيا أسهل في التنقية و اقل كلفة من عمليات الاستخلاص عند استعمال *A. eutrophus* وذلك لان خلايا *E. coli* المهندسة تصبح هشة نتيجة لتجمع المكوثرات داخلها .

- يمكن التحكم بالوزن الجزيئي للمكوثرات المنتجة في *E. coli* وذلك بالتحكم والسيطرة على الإنزيم PHB synthetase الذي يزداد بازدياد فعالية الإنزيم . ومعدل الوزن الجزيئي المنتج في *E. coli* المهندسة وراثيا هو بحدود 4×10^3 كيلو دالتون في حين ان الوزن الجزيئي للمكوثر المنتج في *A. eutrophus* يتراوح بين 6×10^2 - 1.2×10^3 .

- المكوثرات المنتجة في *E. coli* لا تتفكك نظرا لعدم وجود إنزيم PHA depolymerase الموجود في *A. eutrophus* باعتبار ان المكوثرات تمثل خزين للكربون في البكتريا لذا تفكك بالإنزيم المذكور عند الحاجة .

والنقاط الموضحة تشير الى التأثير على مواصفات المكوثر الناتج وعمليات معالجته وتصنيعه لذلك فان الهندسة الوراثية تمكن من السيطرة على المواصفات المطلوبة .

والمحاولات جارية لهندسة احياء اخرى مثل النباتات لان الكلفة ستكون اقل بكثير وبدأت محاولات إنتاجه في النبات الزيتي السلجم Rapeseed .

ويمكن ان تحول عمليات الانتاج الى استعمال مواد اولية بديلة مثل النفط باستعمال احياء معزولة من البيئات البحرية مثل استعمال البكتريا *Alcanivorax borkumensis* والطفريات المشتقة منها التي تقوم بتفكيك النفط وانتاج PHA بافراط وافرازها الى خارج الخلايا حيث تترسب في البيئة المحيطة خاصة عند نموها على المركبات الاليفاتية التي تعد اهم مكونات النفط .

استعمالات اللدائن الحيوية

تجد هذه اللدائن استعمالات كثيرة لتحل محل اللدائن الصناعية اضافة الى امكانية ايجاد استعمالات جديدة فهي يمكن ان تستعمل بشكل الياف او اغشية في مجالات عدة :

- تستعمل في صناعة الأغذية للزراعة المحمية .
- نظرا لمقاومتها للماء فيمكن ان تستعمل بدائل للـ Latex والأغراض التي يدخل فيها .

- تستعمل للتغليف خاصة المواد الغذائية .
- ونظرا لارتفاع الوزن الجزيئي لبعض المنتجات منها فيمكن ان تستعمل في صناعة الألياف والحبال القوية .
- وبعد الانتهاء من استعمال اللدائن الحيوية يمكن ان تحرق لتوليد الطاقة .

منتجات أخرى

- يمكن للتقنية الحيوية ان تنافس في الكثير من المواد التي تستعمل في الصناعة وتنتج موادا قد تكون أفضل بكثير من المتوفرة بالطرق الكيماوية ومنها :
- انتاج الشموع وهذه تنتج بشكل أساسي من الطحالب التي تنتج انواعا مختلفة منها . وبعضها ينتج من البكتريا مثل *Acinetobacter* spp HO1-N التي تنتج أسترات الشموع عند نموها على n-hexadecane (C16) و eicosane (C20) بدرجات حرارة مختلفة ، وتستعمل الاسترات الناتجة كمزيتات تحت درجات حرارية عالية وضغط عالي . وتعتمد أسترات الشموع الناتجة على المواد الأولية المستعملة .
 - الصبغات وخاصة الكاروتين التي تستعمل في مجالات عدة منها الصناعات الغذائية والصيدلانية وتنتج بشكل أساسي من الطحالب (كما سيأتي ذكره لاحقا) .
 - الحوامض العضوية وقد مر ذكر عمليات إنتاج بعضها (يراجع الفصل العاشر) .
 - الكحولات وتعد من اهم ما تضح به التقنية الحيوية لمجال الصناعة والطاقة ، وتكون المنافسة شديدة في هذا المجال والتي يمكن ان يستعاض ببعضها عن مواد الطاقة النفطية (كما سيأتي ذكره لاحقا) .

التقنية الحيوية الميكروبية والطاقة

الصفحة	الموضوع
630	إنتاج الكحول الايثيلي
635	إنتاج الغاز الحيوي
643	إنتاج النفط الطحلي

التقنية الحيوية الميكروبية والطاقة

تتخذ العلاقة بين التقنية الحيوية الميكروبية ومجال إنتاج الطاقة أشكالاً متعددة تتضارب أحيانا وتتفق أحيانا أخرى . فالعالم اليوم يعتمد على الطاقة الحفرية بشكل رئيس التي تكون أسعارها متذبذبة وما يتبع إدارتها من كوارث إنسانية ، فالطاقة الحفرية نافذة في يومنا ما ، إضافة الى أنها من أكثر المصادر تلويثاً للبيئة وقد أدت الى تغيير البيئة بشكل كبير ووضعت كوكب الأرض على شفا الانهيار وأهمها مشكلة الاحتباس الحراري وتغير الظروف الجوية ، كما ان بدائل الطاقة الحفرية في الوقت الحاضر هي الطاقة النووية والتي لا تقل ضرراً وأذية من الطاقة الحفرية وربما كانت أسوأ . ولذلك توجهت الأنظار كما هو الحال مع مجالات الحياة الأخرى الى التقنيات الحيوية لالتماس الحلول للكوارث البيئية .

وتتمثل الحلول بعدد من الأشكال مثل اللجوء الى الطرق الفيزيائية ومحاولة استغلال الطاقات الميكانيكية للرياح مثلاً للحصول على الطاقة الكهربائية ، او اقتناص الطاقة الضوئية من الشمس وإدخالها للحاجة او غيرها من الوسائل . اما الجوانب الحيوية فتحاول إيجاد بدائل للطاقة والتي اطلق عليها مسميات كثيرة مثل الوقود الحيوي والمتمثل بإنتاج الكحول الإيثيلي لإنتاجه طاقة عالية عند الاشتعال ولا يخلف ملوثات مثل ملوثات النفط او الطاقة النووية ، وكذلك تركز الاهتمامات على إنتاج الغاز الحيوي ، او محاولة استغلال الاحياء التي تنتج الهيدروكربونات مثل بعض النباتات وبشكل اهم بعض الطحالب ، وكلها يمكن ان تنضم تحت مسمى الطاقة السليمة Green energy وكل هذه المحاولات لا زالت لم تأت أكلها لحد الآن وان كان بعضها قد بدا من زمن بعيد .

إنتاج الكحول الإيثيلي

ويعتبر اهم الروافد الواعدة (احتمالاً) في مجال الطاقة وهو ينتج منذ زمن بعيد ويستعمل في تشغيل السيارات بعد خلطه بنسب معينة من المنتجات النفطية ، ولكن يؤمل ان يستعمل بكليته أي بدون خلط كوقود ومصدراً للطاقة وهو يعد اهم وقود حيوي Biofuel يطمح لإنتاجه في الوقت الحاضر على الأقل الاحياء المنتجة

تأتي الخمائر مثل خميرة الخبز *S. cerevisiae* الاختيار الأول في الإنتاج التجاري وتنتجه تحت الظروف اللاهوائية مع القليل من النواتج العرضية .

وتدخل العديد من العوامل في اختيار الاحياء المنتجة فمثلاً تستعمل الخميرة *S. uvarum* لأنها تتلبد بشكل جيد وهذا ما يسهل عمليات الاستخلاص والاسترجاع في نهاية العملية التخمرية .

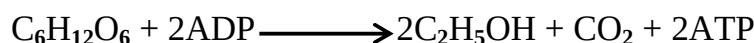
بل وتحتم نوعية المواد الأولية الاحياء الممكن استعمالها فمثلاً المواد الحاوية على السكريات الخماسية تفود الى اختيار احياء تستعمل السكريات الخماسية مثل *C. utilis* . اما وجود السليلوزات

فيحتاج الى استعمال الاحياء التي تفكك السليلوز تحت الظروف اللاهوائية منها استعمال انواع من الجنس *Clostridium* مثل *Cl. thermohydrosulfuricum* , *Cl. thermocellum* ، اما عند استعمال الشرش كمادة اولية للإنتاج فهذا يحتاج الى احياء قادرة على استهلاك اللاكتوز المادة الرئيسية فيه ولذلك تستعمل الخمائر *K. fragilis* , *K. lactis* او خميرة *Torula cremoris* او خميرة *C. pseudotropicalis* .

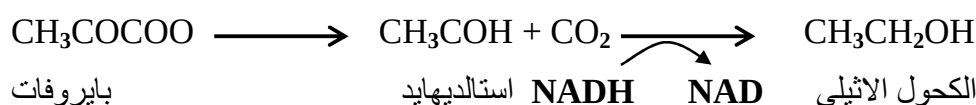
ومن العوامل الاخرى التي تحدد الكائن المستعمل هو درجة الحرارة فعند استعمال درجات حرارية عالية وجب استعمال احياء محبة للحرارة مثل *Cl. thermosaccharolyticus* , *Thermoanaerobacter ethanolicus* . اما عند استعمال الدرجات الحرارية المعتدلة فيمكن استخدام خميرة الخبز التي تنمو بحرارة 28 – 30°م .

التفاعلات الحيوية

إنتاج الكحول الايثيلي من عمليات التخمير اللاهوائي ، فالسكريات تخضع في البداية الى دورة تحلل السكر او ما يسمى ب EMP (يراجع الفصل الثاني) لتنتج البايروفات التي تكون الأساس في الإنتاج ، فالتفاعل العام يتمثل بالمعادلة الاتية :



فالنتيجة النهائية تؤدي الى الحصول على جزيئيتين من ATP . وتمر البايروفات الناتجة من مسار التحلل EMP الى عملية إزالة ثنائي اوكسيد الكربون لتتحول الى استالديهايد ثم يختزل بمساعدة NADH لإنتاج الكحول الايثيلي وفق المعادلة :



فتكون العملية لاهوائية بشكل كامل ولكن العملية الإنتاجية تحتاج الى التهوية في بداية الأمر لبناء الكتلة الحيوية وكذلك تحتاج الاحياء خاصة الخمائر للأوكسجين لبناء دهون الأغشية . اما تحت الظروف الهوائية فان العملية الانتاج تتحول بشكل كامل الى عملية إنتاج الكتلة الحيوية . وتحت الظروف اللاهوائية فان 52 % من الكربون المستعمل يذهب لإنتاج الكحول الايثيلي والباقي يصب في تكوين الكتلة الحيوية ومسارات اخرى .

والمشكلة في العملية الإنتاجية هو ان الكحول المنتج يؤدي الى إجهاد الخلية ويؤدي الى اضطراب الأغشية الخلوية ثم مسخ البروتينات الموجودة فيها مما يؤثر على عمليات نقل السكريات والحوامض الامينية وغيرها من المواد . اذ ان تجمع الكحول بنسبة 4 – 6 % يؤدي الى اضطراب الدهون الفوسفاتية لذلك تقوم الخلايا بإنتاج كميات كبيرة من الدهون الفوسفاتية غير المشبعة لذلك

تتحسن عملية الانتاج عند تزويد الأوساط بطلائع الدهون لتصنيع الاغشية مثل إضافة Ergosterol وبعض المواد الاخرى .

وتعد الأغشية الخلوية اساسية في عملية الانتاج وذلك لان تركيز الكحول داخل الخلايا يكون منخفضا مما يشير الى افرازه الى الخارج ، لان وجوده داخل الخلايا يؤدي الى إتلاف الانزيمات العاملة في الانتاج . واكثر الاجزاء الخلوية تاثرا هي الاغشية الخلوية ، وفي *S. cerevisiae* يبدأ الإجهاد عند تجمع الكحول ووصوله الى 4 – 6 % ، وتحسّس الخلايا وجود الكحول بعدة وسائل ويتداخل تأثيره مع مسارات نقل الإشارات الاخرى في الخلية كما انه يتداخل مع اجهادات أخرى اذ انه يؤدي الى حث استجابات للإجهاد التاكسدي وغيرها من الاجهادات (يراجع الفصل الخامس والسادس) .

تحسين العمليات الانتاجية

نظرا لكون ارتفاع تركيز الكحول يكون ساما للخلايا لذلك يفضل انتخاب احياء او سلالات متحملة للتراكيز العالية فمثلا يمكن استعمال البكتريا *Zymomonas mobilis* التي يمكن ان تتحمل تراكيز 5 – 10 % وبعض السلالات يمكن ان تتحمل تراكيز عالية تصل الى 16 – 20 % عند انخفاض درجات الحرارة لما للعاملين من تأثير على تركيب الحوامض الدهنية في الأغشية الخلوية ولكن صغر حجمها يؤدي الى صعوبة الاستخلاص .

ويساعد في تحسين الانتاج حسن اختيار المواد الأولية لان وجود تراكيز عالية من السكريات في المواد الأولية يؤدي الى انتاج مواد سامة للخلايا عند التعقيم ، وتؤثر نوعية المواد الأولية على العملية الانتاجية فوجود تراكيز عالية من مركبات الكبريت كما في مخلفات الصناعات الورقية التي تكون سامة للخلايا خاصة الخمائر لذا يجب إجراء المعاملات الأولية لخفض مستويات مركبات الكبريت الى مستويات غير سامة اذ ان التراكيز العالية تؤثر على الخلايا او تغير من مسارات التخمر الى انتاج الكليسرول في حالة خميرة الخبز .

ولعل أهم الوسائل التي يمكن إتباعها بعيدا عن الهندسة الوراثية هو الاعتماد على تطبيع الخلايا تجاه ظروف الإجهاد التي تؤدي الى تغيير الفعاليات الخلوية . فالخلايا يمكن ان تطبع على ظروف الإجهاد مثل تعريضها للمجاعات والتي تعمل على حث إمكانيات متعددة أي حصول مقاوّمات متداخلة ، باعتبار ان المجاعة يمكن ان تزيد من مقاومة الخلايا للعديد من الظروف المجهدة ، او الاعتماد على ظاهرة ان تعرض الخلايا للظروف المجهدة يمكن ان يحث الخلايا فائقة التطفر على الظهور او حصول حالة التطبع العابرة او الآنية (يراجع الفصل السادس) . لذلك وجب دراسة النواحي الفسلجية بدقة للخلايا المراد استعمالها مع الأخذ بنظر الاعتبار ان ظروف المختبر لا تمثل واقع الإنتاج التجاري ومن اهمها اختلاف المواد الأولية .

وقد امكن باستعمال الهندسة الوراثية الحصول على سلالات تتحمل تراكيز عالية من الكحول ، كما امكن نقل قابلية تحليل النشا والسليولوز والخشب . اضافة الى الحصول على سلالات تحوي على انزيم Xylose isomerase لمساعدة الخلايا في استعمال الزايلوز في انتاج الكحول . اضافة الى تحويل بعض سلالات خميرة الخبز المتحملة للكحول وجعلها قادرة على استهلاك اللاكتوز بعد نقل الجينات الخاصة من الخميرة *K. fragilis* لغرض استعمالها في انتاج الكحول من الشرش وكانت الخلايا الناتجة قادرة على تحمل وجود 13 % من الكحول .

طرق الانتاج

عمليات الانتاج كما ذكر هي عمليات لا هوائية كما انها لا تحتاج الى عمليات خلط وتقليب وذلك لان الغازات الناتجة تقوم بهذه المهمة .

وتحتاج العمليات الإنتاجية الى وجود الخلايا بتراكيز عالية مثلا 10^8 - 10^9 / مليلتر لتحسس الزحام وحرث العمليات الحيوية من بناء الكتلة الحيوية الى إنتاج الكحول والذي يعد من مواد الايض الأولى الخاصة ويساعد الخلايا في الحصول على الطاقة عند غياب مستلمات الالكترونات الخارجية مثل الأوكسجين باستعمال الفسفرة بمواد الاساس . ومن الطرق المستعملة :

- الطريقة المتقطعة او ما يسمى بطريقة الوجبة او الدفعة الواحدة Batch culture وهي توفر فرصة لزيادة الانتاج والابتعاد عن التلوث وان كانت عمليات تخمر الكحول من التخمرات المحمية ولكن مع هذا يمكن ان تتلوث ببعض الاحياء اللاهوائية . ويفضل فيها استعمال لقاحات من وجبة سابقة اذ تكون الخلايا فيها متطبعة على الظروف التي ستواجهها وتضاف الخلايا بتراكيز عالية حتى لا تحتاج الخلايا لعمليات نمو وانما تبدأ الانتاج بسرعة .

والعملية لا تحتاج الى خلط وتقليب وهذا يوفر الطاقة اللازمة لذلك والاهم بالنسبة للخلايا انه لا يعرضها الى قوى القص والإجهاد الميكانيكي . ويمكن للخلايا وهي الخمائر التي تكون غير متحركة التخلص من البيئات الموضعية حولها بواسطة الغازات الناتجة من التخمر وهذه الغازات يمكن ان تجعل توزيع الخلايا متجانسا في كل المخمر وتمنع ركود الخلايا الى الأسفل . ويمكن بتطبيق الظروف الملائمة الوصول الى نسبة تحويل سكر الى كحول عالية .

- الطرق المستمرة وهذه تستعمل عادة للعمليات الهوائية والتي تكون خاصة بإنتاج مواد الايض الأولى مثل انتاج الكتلة الحيوية ، ولكن يمكن ان تستعمل لإنتاج الكحول اذ يمكن بواسطتها جعل تركيز الكحول اعلى ما يمكن وذلك بسحب الكحول باستمرار ، كما ان الأوساط التي تزود للمخمر يمكن العناية بها وسحب الأوكسجين منها لضمان عدم تأثر العملية التخمرية . ويمكن التحكم بمعدل سريان المواد الغذائية الداخلة وكذلك معدل خروج نواتج التخمر للوصول الى افضل حالة من الانتاج .

وبالعناية بتصميم المخمرات او المفاعلات الحيوية يمكن التخفيف من إجهاد الكحول على الخلايا وذلك بسحب المتكون منه باستمرار من وعاء التخمر بالاعتماد على الصفات الفيزيائية للكحول .
وخلال عمليات الانتاج ومراحلها المختلفة يجب العناية بالمؤشرات العامة مثل الأرقام الهيدروجينية والحرارة لتكون بحدود ملائمة .

واقع انتاج الوقود الكحولي

بالرغم من ان انتاج الكحول كبديل للطاقة الحفرية يمثل توجها ملائما لحل بعض المشاكل المتعلقة لكون الطاقة الحفرية سوق يؤول للنضوب ، إضافة الى ان التخلي عنها سيقفل من مشاكل التلوث البيئي ولكن هناك بعض النقاط التي يجب أخذها بنظر الاعتبار :

- ان النفط ومشتقاته لا تعد مصدرا للطاقة فقط ولكن تقوم عليها العديد من الصناعات الملحقة مثل إنتاج اللدائن وإنتاج المذيبات العضوية والحوامض العضوية والمبيدات الزراعية والآلاف المواد التي لا يمكن إنتاجها عند استعمال الكحول الا اذا تم إيجاد طرق بديلة لسد الفراغ الذي سيتركه التخلي عن النفط ومشتقاته مثل انتاج اللدائن الحيوية والمبيدات الحيوية وإنتاج الحوامض والمذيبات من الاحياء المجهرية وهذا يعني الحاجة الى معامل ومؤسسات كثيرة لسد الفراغ .
- من ناحية المواد الأولية ، فالطاقة الحفرية لا تحتاج الى مواد أولية وانما تكون جاهزة وتحتاج فقط الى استخراج من باطن الأرض والبحار ، في حين ان انتاج البدائل الحيوية يحتاج الى مواد أولية لتحويلها بواسطة الاحياء المجهرية الى مواد وقود ، ونظرا لان المواد الأولية المباشرة مثل الكلوكرز يكون استعمالها غير اقتصادي لذلك يجب استعمال مواد ارخص مثل مخلفات الصناعة والزراعة وغيرها وهذه عادة تحتاج الى جهد ومعاملات أولية لتتحول الى مواد قابلة للتخمر من قبل الاحياء المجهرية وهذه تضاف الى الكلفة الإنتاجية ، لذلك تركز المشاريع العملاقة في هذا المجال الى البحث واستغلال الاحياء التي تحلل المواد النشوية والأفضل الاحياء التي تحلل المواد السليلوزية ولكن هذا يعني :

- سحب المواد الأولية من أسواقها الاعتيادية فمخلفات الزراعة تستعمل كعلف حيواني ، كما يمكن ان لا تتورع بعض الشركات المنتجة من استخدام منتجات المملكة النباتية وسحبها من الاستهلاك البشري لإنتاج الطاقة وترك الأسواق في شحة للمواد الغذائية .
- ان استعمال الكحول في انتاج الطاقة سيؤدي الى سحبه من اسواقه التقليدية مثل استعماله كمذيب في العديد من الصناعات الصيدلانية ومواد التنظيف وصناعات تصب في مجالات الزراعة والأغذية وغيرها .

ولذلك فإن انتاج الكحول كوقود لا يمثل جوانب مشرقة بشكل متكامل وتحتاج عملية التحول من الوقود الحفري الى الوقود الحيوي الى دراسات معمقة ودراسة تأثير كل شاردة وواردة وليس الاعتماد على جانب واحد لتقييم الموضوع .

انتاج الغاز الحيوي Biogas

ويسمى الغاز الطبيعي ويتكون بشكل أساسي من غاز الميثان CH_4 بنسبة 60-70 % مع ثنائي اوكسيد الكربون 25-30 % والباقي تمثل غازات مثل مركبات النتروجين . والغاز الرئيس فيه الميثان قليل الذوبان في الماء مما يسهل عمليات فصله ويمكن ان يضغط الى سائل . ويستعمل كمصدر للطاقة عند احتراقه ويعطي طاقة كبيرة نظرا لكونه مختزل جدا ويستعمل لأغراض عديدة تحتاج الى الطاقة وعمليات انتاجه معقدة جدا .

مصادر الغاز الطبيعي

ينتج الغاز من مصادر مختلفة منها طبيعية واخرى متعلقة بنشاطات الإنسان ومنها :

0 انتاجه من المصادر الحفرية وتعد من أهم مصادر انبعاث الغاز الطبيعي ، فهو يمكن ان يقتنص في ترسبات الفحم لذلك يكثر في مناجم الفحم سواء السطحية او الموجودة تحت الارض ، كما يعد تداول الفحم من المصادر المهمة لانبعاثه . ويكون مرتبطا بالنفط وعليه فان عمليات استخراج النفط وتكريره تعد من المصادر المهمة لانبعاث الغاز .

0 الحيوانات ، وتعد الحيوانات المجترة مثل الأبقار والعجول والأغنام والجمال من المصادر المهمة لانبعاثه ، وينتج من عمليات الهضم في الكرش Rumen ، اذ تقوم الاحياء المجهرية بتخمير العلف وتحويله الى مواد قابلة للاستهلاك من قبل الحيوان في عملية التخمير المعوي ويلفظ الغاز من قبل الحيوان الى الجو ، وينتج من قبل الانسان ايضا ولكن بكميات قليلة جدا ، وينتج الغاز من معاملة ومعالجة فضلات الحيوان خلال عمليات التحلل اللاهوائي للمواد العضوية وهذه الأنظمة قد تكون صلبة او سائلة ، وتستعمل عمليات الكمر الحيوي Biocomposting لإنتاج الغاز للأغراض المنزلية في الأرياف باعتماد فضلات الحيوانات كموا اولية .

0 معالجة فضلات المياه ، ينتج من معاملة فضلات المدن مثل فضلات الصرف الصحي والفضلات الصناعية ، وتجرى المعاملات للتخلص من المواد العضوية الذائبة والمواد الصلبة العالقة والاحياء المرضية والملوثات الكيماوية ، كل هذه العمليات تنتج غاز الميثان اذا تمت تحت ظروف لاهوائية ، ويمكن التخلص من انبعاث الميثان فيما اذ تمت السيطرة على اقتناصه او استبدال عمليات المعالجة بعمليات هوائية .

● زراعة الرز : تحتاج عمليات زراعة الرز الى أراضي مغمورة بالمياه مما يجعلها ملائمة لتحلل المواد العضوية تحت ظروف لا هوائية ، وينتج الميثان الذي تختلف كمياته المنبعثة اعتمادا على ظروف التربة والطقس ويمكن بتطبيق طرق زراعة ملائمة التقليل من انبعاث الغاز .

● الأراضي الرطبة وتساهم هذه المناطق بانبعاث يصل الى 16 % من الانبعاث العالمي اذ ان هذه المناطق توفر ظروف لا هوائية تساعد في تحليل المواد العضوية واستغلالها من قبل مولدات الميثان Methanogenes التي تحتاج الى بيئة خالية من الاوكسجين ورطوبة عالية ومواد عضوية وكلها متوفرة في هذه البيئات .

● حشرات الأرضة او النمل الأبيض Termites وتساهم الحشرات بنسبة انبعاث تصل الى 11 % من الانبعاث العالمي . وينتج الغاز كجزء طبيعي من عمليات الهضم التي تقوم بها الحشرات ، وتختلف الكميات بالاعتماد على نوع الحشرة وكذلك حجم تجمعاتها التي تختلف في مناطق العالم المختلفة .

● المحيطات وتساهم بنسبة 8 % من الانبعاث العالمي من المصادر الطبيعية . اذ تقوم الهائمات او العوالق البحرية والأسماك بعمليات هضم لاهوائي تؤدي الى انتاج الميثان وكذلك تنتج في المحيطات من ترسبات قاع المحيطات التي تمتد الى السواحل .

● مناطق ترسبات المحيطات تساهم بانبعاث يصل الى 5 % من المصادر الطبيعية وهي ترسبات صلبة تتكون من أقفاص او تراكيب مشابه تحوي على الماء وغاز الميثان وتوجد هذه التراكيب في المناطق القطبية وعلى شكل ترسبات في المحيطات في المناطق البعيدة عن القارات وتنتشر في كل أنحاء الارض . ويمكن لهذه المناطق إطلاق غاز الميثان عند تغير درجات الحرارة والضغط وتراكيب الأملاح وغيرها من العوامل . وتشير التقارير الى ان هذه الترسبات تحوي كميات كبيرة من الميثان يمكن ان تطلق عند حدوث تكسرات وتصدعات تقلل من ثباتيتها ، لذلك تجرى البحوث لمعرفة تأثير تغيرات المحيطات على ثباتية الترسبات .

● حرق الكتلة الحيوية الجافة لغرض توليد الطاقة ، وكذلك تساهم أنواع الوقود الاخرى بشكل فاعل في إطلاق الميثان كما في حرائق الغابات وممارسات الانسان .

العوامل المؤثرة على انبعاث الغاز الطبيعي

تختلف العوامل المؤثرة من بيئة الى اخرى ومنها :

- الطقس وتقلباته .
- الانتاج الزراعي والصناعي .
- انواع مصادر الطاقة المستعملة وطرق استعمالها .
- طرق معاملة الفضلات .

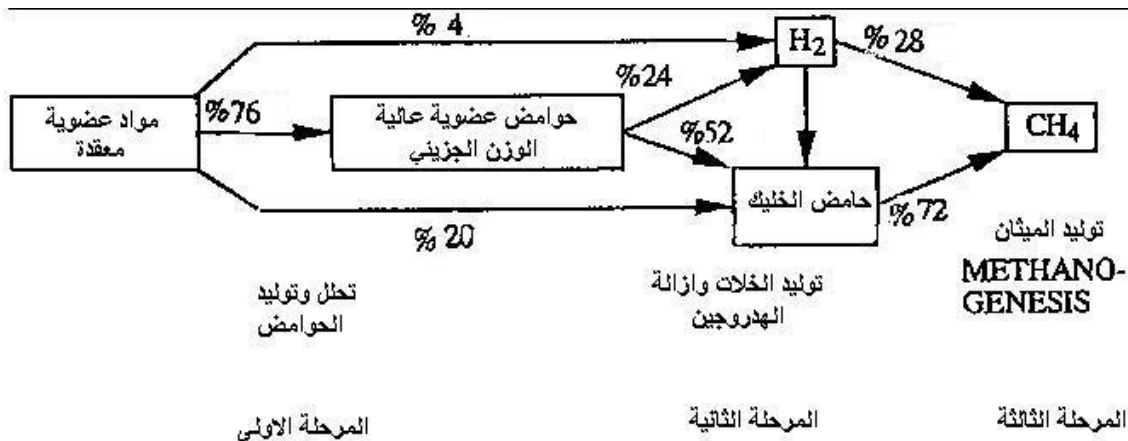
فمثلا الحرارة والرطوبة لها تأثيرات كبيرة على عمليات الهضم اللاهوائي والتي تعد من أهم العمليات الحيوية المنتجة لغاز الميثان ، كما يتأثر الانبعاث بكفاءة التقنيات المستعملة في اقتناص الغاز من المصادر المختلفة مثل مناجم الفحم وأنظمة معالجة الفضلات وعمليات استخراج النفط وتكريره .

الفعاليات الحيوية لانتاج الميثان

ينتج غاز الميثان إضافة الى المصادر المذكورة أعلاه بطرق التقنية الحيوية كاحد البدائل للطاقة الحفرية . وبواسطة التقنيات الحيوية يمكن ان تحول المواد العضوية والمكوثرة منها الى غاز الميثان وثنائي اوكسيد الكربون ، اضافة الى ان عمليات الانتاج تعد احد الوسائل المهمة في المعالجات الحيوية للبيئة للتخلص من الفضلات الصناعية والزراعية وفي هذا المجال تكون أفضل لأنها تتم تحت الظروف اللاهوائية مقارنة بالمعاملات الهوائية . وهي عمليات تحول حيوي معقدة تتعاون فيها اكثر من مجموعة فسلجية من الاحياء المجهرية ، ومن اهم الاحياء المشاركة :

- مجموعة الاحياء المخمرة المولدة للحوامض Acidogens .
- الاحياء المنتجة للهيدروجين .
- الاحياء المولدة للخلات Acetogens .
- الاحياء المولدة للميثان Methnogens .

وهذه الاحياء تعيش بشكل مجاميع متوافقة تتعاون فيما بينها لانتاج المواد المختزلة المتمثلة بشكل اساسي بغاز الميثان ، وتعد الاحياء اللاهوائية مهمة في العملية الانتاجية لأنها تحافظ على ثبات البيئة أثناء عملية انتاج الميثان التي تحتاج الى جهد أكسدة واختزال سالب جدا (200- ملي فولت) ، وهذا يعني وجوب عدم وجود الاوكسجين او بدائله مثل النترات وهي الظروف التي تحتاجها مولدات الميثان في الخطوة الأخيرة من المعاملات . ويمكن تقسيم عملية انتاج الميثان الى ثلاث مراحل كما موضحة في الشكل (82) .



شكل 82 : مراحل انتاج غاز الميثان من قبل البكتريا المولدة للميثان

المرحلة الاولى : وهي التي تتكون فيها الحوامض العضوية (Acidogenesis) من المواد المعقدة وتقوم بها مجموعة من الاحياء القادرة على تحليل المواد المعقدة ، والمواد المعقدة الموجودة تشمل البروتينات والدهون والكاربوهيدرات المكوثة التي تتحلل بواسطة الانزيمات المحللة الخارجية وتؤدي الى انتاج وحدات صغيرة تستخدم من قبل المجاميع الاخرى وتعد خطوة تحليل المكوثر او المواد الاولى مهمة في تحديد معدل وسرعة العملية .

■ تحليل الدهون وتتم بواسطة اللايبيزات التي تحلل الدهون الى كليسرول وحوامض دهنية بسلاسل مختلفة الأطوال ، ويمكن ان يصل تعداد مجموعة المحللة للدهون الى 10^4 - 10^5 / مليلتر ، ومن البكتريا المسؤولة عن تحليل الدهون هي انواع من جنس *Micrococcus* و *Clostridium* وهي أكثر المنتجات لإنزيمات اللايبيز .

■ تحليل البروتينات الى حوامض امينية وبيبتيدات صغيرة وتتم بواسطة عدد من البكتريا منها *Butyrivibrio* , *Fusobacterium* , *Streptococcus* , *Clostridium* , *Bacteriodes* و *Selenomonas* وتستخدم بعض نواتج التحلل في بناء الكتلة الحيوية للاحياء المشاركة والباقي يحول الى حوامض عضوية بعد إزالة النتروجين منها على شكل امونيا ، اما الحوامض المنتجة فتشمل الخللات و البروبيونات والبيوتيرات وتقوم بالمهمة الاخيرة انواع من جنس *Bacteriodes* , *Peptococcus* , *Campylobacter* , *Clostridium* , *Selenomonas* .

■ تحليل الكاربوهيدرات المعقدة منها السليلوزات وتحلل بواسطة Cellulases الداخلية والخارجية ثم يليها في التأثير انزيمات Cellobiases وغيرها من الانزيمات التي تعمل بشكل متآزر ومتتابع لتفكيك التركيب البلوري للسليلوزات وفي النهاية انتاج الكلوكوز .

النشا ويحتاج الى فعالية الاميليزات ومنها الاميليز الفا وبتا وكذلك الانزيمات التي تحلل السلاسل الفرعية والانزيمات المحللة للمالتوز Maltases لتحويل المالتوز الى كلوكوز .
البكتينيات وتحلل بواسطة الانزيمات المحللة للبكتين ومنها Pectinestrases والاخرى المزيلة للمكوثرات Depolymerases .

المواد الخشبية وتحلل بالانزيمات الخاصة بها وهي Xylanases مثل α - endo - Xylanases و انزيمات α - xylosidases التي تؤدي الى انتاج الزيلوز .

عمليات فك المكوثرات اعلاه تؤدي الى انتاج سكريات خماسية او سداسية يمكن استغلالها من قبل الاحياء . وتحول بالطرق العادية مثل مسار EMP او غيره الى مركبات حاوية على ذرتين او ثلاث ذرات من الكربون ، لتعطي في النهاية المركب الاساسي البايروفات كمركب وسطي وبمساعدة NADH تحول البايروفات الى مركبات اخرى مثل اللاكتات والبروبيونات

والخلاات وكحول اثيلي ، وتختلف المسارات المنتجة للمواد المذكورة باختلاف الاحياء والظروف المطبقة .

المرحلة الثانية : وتتمثل بمرحلة تكوين الخلاات Acetogenesis وإزالة الهيدروجين . وتنتج الخلاات بنسبة 20 % و الهيدروجين 4 % في المرحلة الاولى بشكل مباشر ، وتتم انتاج الكميات الأكبر بعملية توليد الخلاات وإزالة الهيدروجين للحوامض العضوية الطيارة التي تكونت في المرحلة الاولى . ومن الاحياء العاملة في هذه التفاعلات البكتريا *Syntrophobacter wolinii* والتي تكون مجبرة على استهلاك وتفكيك البروبيونات والبكتريا *Syntrophomonas wolfei* التي تكون مجبرة على تفكيك البيوتيرات ، وهذه الاحياء تكون صعبة العزل . وتقوم بانتاج الخلاات وغاز الهيدروجين . وانتاج الغاز الاخير يكون مثبطا لنموها لذلك وجب سحبه وهو ما تقوم به البكتريا المولدة للميثان او البكتريا المختزلة للكبريتات . لذلك يعد وجود البكتريا المولدة للميثان ضروريا لاستمرار تفكك الحوامض الدهنية وبالتالي استمرار المعاملات اللاهوائية والعمليات التي تقوم بها الاحياء لإنتاج حامض ألكيك والهيدروجين موضحة في الجدول (58) .

جدول 58 : تفاعلات تكوين الخلاات اثناء عمليات توليد الميثان

الحوامض الدهنية	التفاعل
حوامض دهنية مزدوجة ذرات الكربون	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	$2 \text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2 + \rightleftharpoons + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	$3 \text{CH}_3\text{COO}^- + 4\text{H}_2 + \rightleftharpoons + 4 \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	$4 \text{CH}_3\text{COO}^- + 6\text{H}_2 + \rightleftharpoons + 6 \text{H}_2\text{O} + 3\text{H}^+$
حوامض دهنية مفردة ذرات الكربون	
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \rightleftharpoons + 1 \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{COO}^- + 2 \text{H}_2 + \text{H}^+$
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + 2 \rightleftharpoons + 4 \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{COO}^- + 4 \text{H}_2 + 2\text{H}^+$
حوامض دهنية متفرعة السلاسل	
$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	$\text{CH}_3\text{CHCH}_2\text{COO}^- \rightleftharpoons + 2 \text{H}_2\text{O} + \text{CH}_3\text{COO}^- + 2\text{H}_2 + \text{H}^+ + \text{CH}_3$

المرحلة الثالثة : وهي مرحلة تكوين الميثان وتقوم بها مجموعة البكتيريا المولدة للميثان من ثنائي اوكسيد الكربون والهيدروجين ، ويمكن استعمال الفورمات او الكحول الميثيلي وبعض امينات الميثيل وأحادي اوكسيد الكربون لعملية الانتاج كما موضح في الجدول 59 .

جدول 59 : التفاعلات المختلفة لانتاج الميثان من مواد مختلفة

الطاقة (G° -كيلو جول \ مول مادة اساس)	التفاعل
-130.7	$CO_2 + 4 H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
-135.5	$HCO_3^- + 4 H_2 + H^+ \rightarrow CH_4 + 3 H_2O$
-37.0	$CH_3COO^- + H^+ \rightarrow H_4 + CO_2$
-32.3	$CH_3 COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$
-36.1	$HCOO^- + H^+ \rightarrow 0.25 CH_4 + 0.75 CO_2 + 0.5 H_2O$
-52.7	$CO + 0.5 H_2O \rightarrow 0.25 CH_4 + 0.75 CO_2$
-79.9	$CH_3OH \rightarrow 0.75 CH_4 + 0.25 CO_2 + 0.5 H_2O$
-57.4	$CH_3NH_3^+ + 0.5 H_2O \rightarrow 0.75 CH_4 + 0.25 CO_2 + NH_4^+$
-112.2	$(CH_3)_2NH_2^+ + H_2O \rightarrow 1.5 CH_4 + 0.5 CO_2 + NH_4^+$
-105.0	$(CH_3)_2NCH_2CH_3H^+ + H_2O \rightarrow 1.5 CH_4 + 0.5 CO_2 + ^+H_3NCH_2CH_3$
-170.8	$(CH_3)_3NH + 1.5H_2O \rightarrow 2.25 CH_4 + 0.75 CO_2 + NH_4^+$

ومولدات الميثان احياء لاهوائية مجبرة وتحتاج الى جهد أكسدة واختزال يصل الى 300- ملي فولت للنمو ولذلك تكون عمليات عزلها وتداولها صعبة . ويمكن ان تختص مولدات الميثان بالمواد التي تستعملها فمنها يستهلك الخلايا واخرى تستطيع استهلاك ثنائي اوكسيد الكربون والهيدروجين لتوليد الميثان . ومستهلكات الخلايا تكون قليلة وتتمثل بالـ *Methanosarcina* spp و *Methanothrix* spp (التي غير اسمها الى *Methanosaeta*) وتكون غير قادرة على استهلاك الفورمات ، و 70 % من عمليات الانتاج للميثان الطبيعية تكون من الخلايا . ان تجمع كميات كبيرة من الهيدروجين يؤدي الى تثبيط مولدات الخلايا لذلك يسحب من قبل مولدات الميثان لتقليله في الجو المحيط والذي يؤدي الى استمرار عملية الهضم اللاهوائي .

وتستخدم مولدات الميثان ثنائي اوكسيد الكربون كمستلم نهائي للالكترونات بخطوات متعددة ومشاركة بعض المرافقات الانزيمية الغريبة والخاصة بإنتاج الميثان .

ولا تعد عملية توليد الميثان عملية تخمر لأنه لا توجد ضمن خطواتها عملية توليد ATP بطريقة الفسفرة بمواد الاساس ، كما ان ATP لا يتكون عن طريق pmf نظرا لعدم وجود السايتركرومات والفلافينات والكينونات التي تمثل مكونات السلاسل التنفسية ، لذلك فان مسار تخليق مركبات الطاقة يكون نمطا مختلفا يلعب فيه العامل F_{420} الحاوي على النيكل الدور الاساسي .

وتحوي مولدات الميثان على نوعين من ATP synthetases واحد مرتبط بتدرج البروتونات والآخر بتدرج ايون الصوديوم ، لذلك يعد توليد الميثان نمطا فريدا وغير طبيعي من التنفس اللاهوائي

انتاج الهيدروجين

يعد انتاج الهيدروجين اساسيا لتوليد الميثان وتكون التخمرات المنتجة للهيدروجين ناجحة فقط عند وجود مولدات الميثان التي تستهلكه وتحوله الى ميثان لتخفف من الضغط الجزيئي للغاز . وهناك عدد من المسارات التي تؤدي الى انتاج الهيدروجين أثناء العمليات التي تسبق تكوين الميثان وتقوم بها مجاميع مختلفة من البكتريا منها :

- المجموعة اللاهوائية الاختيارية مثل *E. coli* ومشابهتها التي تنتج الحوامض العضوية والهيدروجين .
- المجموعة الثانية وهي الاحياء اللاهوائية المجبرة مثل اجناس *Selenomonas* , *Ruminococcus* , *Clostridium* ، تولد الهيدروجين عند وجود مولدات الميثان ، اما عندما تنمو لوحدها فهي تكون الكحول الايثيلي وحوامض لا عضوية .
- مجموعة من البكتريا التي تستهلك الكحول الايثيلي او الحوامض العضوية الناتجة من المواد تحت الظروف اللاهوائية وهذا يحدث فقط عند وجود مولدات الميثان لسحب الهيدروجين .
- المجموعة الاخيرة وهي التي تستهلك ما أنتجته المجاميع اعلاه وهي مولدات الميثان التي تسحب الهيدروجين .

المفاعلات الحيوية

تعد المفاعلات ركنا اساسيا لإنجاح عمليات التقنية الحيوية قاطبة ، وكذا الحال مع إنتاج الميثان . وقد بدا انتاج الميثان مطلع القرن المنصرم لمعاملة الفضلات الناتجة من صناعات مختلفة مثل صناعات الكحول وانتاج المضادات الحيوية وانتاج خميرة الخبز وغيرها من الصناعات . والمشكلة القائمة في معاملة الفضلات ان المرحلة أولى وهي مرحلة تكوين الحوامض تكون سريعة وتزيد

حوالي عشرة أضعاف عملية توليد الميثان التي تمثل المرحلة الثالثة أو الأخيرة . فالزيادة تحصل في كميات الهيدروجين والحوامض الدهنية الطيارة VFAs مما يؤدي الى إبطاء أو توقف العملية بالكامل ، لذلك تصمم المخمرات أو المفاعلات الحيوية لتعمل على مرحلتين أو تكون مزدوجة الأطوار الأولى لتكوين الحوامض والثانية لتوليد الميثان .

كما ان العملية قد تكون بطيئة ربما بسبب قلة تركيز الخلايا لذلك تحتاج المواد للبقاء لمدة طويلة ، اضافة الى ان الخلايا تكون حساسة فلا تتحمل أو لا تكون ثابتة تجاه التغييرات التي تحصل في بيئتها والمشاكل أعلاه يمكن معالجتها بزيادة كثافة الخلايا الى الحد الذي تصبح فيه العملية كفوة ومجدية من الناحية الاقتصادية ، اذ يسمح للخلايا بتكوين الجليدات أو الأغشية الحيوية أو يسمح لها بالالتصاق على مواد حاملة في داخل المفاعلات ، كل هذه الإجراءات تزيد من قابلية الخلايا على مواجهة الظروف المتغيرة وتجعلها مقاومة للعديد من الاجهادات (يراجع الفصل الخامس والسادس) . ولإنجاح العملية توجد عوامل أخرى يمكن ان تؤخذ بنظر الاعتبار منها :

- اختيار الطريقة المناسبة لكل نوع من الفضلات والتي على ضوءها يمكن اختيار اللقاحات التي تضاف لتعجل بالعمليات على الأقل في الخطوات الأولى .
 - استعمال الفضلات الحاوية على ايونات الكالسيوم والباريوم Ba^{++} والنيكل وإذا كانت خالية تضاف اليها للمساعدة في تكوين بعض الإنزيمات وضروريات التفاعلات الحيوية .
 - تجنب عمليات الانغلاق لمداخل ومخارج المفاعلات التي يمكن ان تحصل من النمو الخيطي للحياء اذ ان المفاعلات الحيوية لابد ان تحوي على فتحات تنفيس الغازات خوفا من الانفجار .
- وتعد مسألة اختيار الأحياء من الأمور الهامة لذلك تنتخب الأحياء التي تستطيع النمو بتجمعات فمثلا *Methanothrix spp* يمكن ان تنمو على شكل حبيبات كروية وهذا يزيد من فاعليتها في المفاعلات . والأفضل ان تثبت الخلايا على الصخور أو قطع من اللدائن أو حبات من الزجاج أو الخرز - ا ي تقييد الخلايا - فحبات الخرز بقطر 3 - 4 ملم يمكن ان تزيد من تركيز الخلايا الى 200 ضعف خلال 12 - 24 ساعة . وهذه تصلح مع الفضلات الحاوية على تراكيز متوسطة من المواد العضوية مثل الفضلات المائية ، ووجود الخلايا المقيدة مع مواد تقيدها يجعلها في أسفل المفاعل وتقوم بفعاليتها عند القعر وتسهل سحب نواتج الفعاليات مثل الغاز الحيوي والمواد السائلة من أعلى المفاعل .

وتصلح العديد من المواد للتقييد منها اللدائن أو الطين المفخور وأنواع خاصة من الزجاج على ان تكون بأحجام محددة ولا تقل عن 0.5 ملم للمحافظة على المسامية ووجود ثقب ملائمة للسماح للمواد بالحركة .

الميثان والبيئة

ان عمليات إنتاج الميثان يجب ان يكون مسيطرا عليها ويجب اقتناص كل الميثان الناتج والا ساهم في خراب البيئة ضمن ظاهرة تأثير غازات البيوت الزجاجية Greenhouse effect التي تعد اهم مسببات الاحتباس الحراري العالمي (Global warming potentia) GWP ، ويشارك الميثان بنسبة 4 – 9 % من مكونات الغازات المسببة للمشكلة التي تشمل مكونات اخرى منها بخار الماء ويساهم بنسبة 36 – 70 % وثنائي اوكسيد الكربون 9 – 26 % ويأتي الميثان بالمرتبة الثالثة بالإضافة الى مركبات اخرى مثل غازات التبريد .

والظاهرة تعزى الى ان الطاقة الشمسية تمتص من قبل سطح الأرض الذي يكون باردا ثم بعد ذلك يقوم السطح بإشعاع الطاقة الممتصة بأطوال موجية طويلة والتي يمتصها الجو المحيط بشكل أكفأ من امتصاص الموجات قصيرة الأطوال مما يؤدي الى رفع حرارة المحيط . والغازات المذكورة تشع طاقة بطول موجي طويل باتجاه الفضاء وأخرى باتجاه سطح الارض وهو الذي يعرف بتأثير غازات البيت الزجاجي ، والغازات المذكورة مع الغازات الحاوية على الفلور ومنها غازات التبريد كانت محور معاهدة كيوتو Kyoto التي اوجب تطبيقها بشكل إجباري عام 2005 للدول الموقعة عليها .

وأدت الثورة الصناعية الى زيادة غاز ثنائي اوكسيد الكربون بنسبة 31 % في حين زاد الميثان بنسبة 150 % والغاز الأول له القابلية للبقاء في الجو لمدة 200 – 450 سنة بينما الميثان له قابلية البقاء لمدة 12 – 15 سنة لأنه يتحلل الى ماء وثنائي اوكسيد الكربون بتفاعلات كيميائية . ووجود هذه الغازات يؤدي الى استنزاف طبقة الأوزون التي تعد طبقة مرشحة لأنواع الأشعة القادمة الى الأرض من الكون الخارجي ، لذلك تشارك بعض منظمات حماية البيئة في وضع التشريعات للحد من زيادة انبعاث الميثان الذي هو أصلا ينبعث من المصادر الطبيعية التي ذكرت في مستهل الموضوع .

انتاج النفط الطحلي

يمكن ان تمثل الطحالب مصدرا جديدا للطاقة الحيوية وتقلل من الضغوط على استعمال الطاقة الحفرية وكذلك بدائلها من المصادر الحيوية مثل الكحول الايثيلي الحيوي Bioethanol وإمكانية اضطراب أسواقه وأسواق المواد الأولية له عند تحوله الى مصدرا من مصادر الطاقة ، وكذلك انتاج الغاز الحيوي وإمكانية مشاركة عمليات إنتاجه كمصادر متجددة للطاقة في زيادة ظاهرة الاحتباس الحراري .

فانتاج الطاقة او الوقود الحيوي من الطحالب يمكن ان يؤدي اكثر من غرض منها إنتاج الطاقة والثاني والذي لا يقل أهمية عنه الا وهو حماية البيئة وبأكثر من اتجاه .

ومن المصادر الواعدة هو الطحلب *Botryococcus braunii* وهو طحلب اخضر من وحيدات الخلايا من شعبة الطحالب الخضر Chlorophyta يعيش في المياه العذبة وكذلك في المياه المالحة

في مختلف أنحاء العالم ويوجد في ترسبات سواحل الشواطئ ، ويوجد في العراق بكثرة في بحيرة ساوه في منطقة السماوة في المناطق الجنوبية الغربية من العراق .

يمتاز الطحلب بوجود مواد اليفاتية مكثرة خاصة به يطلق عليها Algaenan ويمكن ان يصل تركيزه في بعض السلالات الى 30 % من الوزن الجاف ويعتقد انه ينتج من الدهون عالية الوزن الجزيئي ويظهر بشكل طبقة ثلاثية تحيط بالمكوثرات السكرية في الجدار الخلوي .

يقوم الطحلب بتنشيط ثنائي اوكسيد الكربون باستعمال الطاقة الشمسية لذا يعد من العوامل المهمة في تقليل الغاز الذي يعد السبب الأول في ظاهرة الاحتباس الحراري . يستخدم الطحلب غاز ثنائي اوكسيد الكربون في إنتاج الهيدروكربونات او ما يسمى بالنفط الطحلي Botrycocenes وتركيبه $C_{30-36}H_{44-54}$ وينتج هيدروكربونات متفرعة ، وفي أفضل ظروف التنمية يمكن ان تصل نسبة الهيدروكربونات الى 75 % من الوزن الجاف .

يفرز الطحلب الهيدروكربونات الى الوسط المحيط والبعض منها يبقى مرتبطا بالخلايا . وتختلف الهيدروكربونات المفترزة في أطوال سلسلها عن تلك التي تبقى مرتبطة بالخلايا .

يعاني الطحلب من تغيير الألوان اعتمادا على عدة عوامل مثل الفصل السنوي او ظروف التنمية وغيرها من العوامل وتغيير الألوان يمكن ان يكون دليلا على اكتمال نمو المزارع والوصول الى مرحلة الإنتاج القصوى .

وفي بعض البلدان الشرقية يحصل مد او عنفوان طحلي Algal bloom اعتمادا على فصول السنة وتحتوي الطحالب على 27 – 40 % من الوزن الجاف من الهيدروكربونات وتكون الطحالب بمظاهر مختلفة اعتمادا على الفصل السنوي ، وطحالب المد الأحمر تحوي على نسب أعلى من الهيدروكربونات مقارنة بطحالب المد الأخضر الذي يحوي على نسبة اقل اضافة الى احتوائه على هيدروكربونات ذات سلاسل مستقيمة .

اما الهيدروكربونات المتفرعة فلها الصيغة الكيميائية C_nH_{2n-10} ($n = 30, 34, 35, 36$) وعلى العموم فان الطحلب يحوي على سلاسل مستقيمة ومتفرعة ولكن بمراحل مختلفة ، فالمراحل المبكرة هي المراحل الخضراء ثم بتقدم الوقت يتحول الى الأحمر وهذه توفر فرصة للتحكم بعمليات الإنتاج .

وتستعمل مفاعلات حيوية خاصة لعمليات الإنتاج التي تحتاج الى التهوية لذا تستعمل مخمرات الرفع الهوائي Air lift bioreactor . كما يمكن ان تستعمل المزارع الراكدة او المستمرة وفي جميع الأحوال تؤثر التغييرات على فسلجة الخلايا والتي تؤثر بدورها على إنتاج الهيدروكربونات من حيث الكمية وطول السلاسل وموقعها في الخلية ومستوى الإنتاجية وكذلك تؤثر على السكريات المكثرة الخارجية للخلايا .

ويمكن تنمية الطحلب على الفضلات المائية لإنتاج الهيدروكربونات وكذلك يمكن ان تنمى على الحمأة المنشطة الناتجة من معاملة فضلات المجاري ، اذ ان الطحلب يمتص النترات والفوسفات كمواذ غذائية وبكفاءة عالية .

ونظرا لأهمية الطحالب بدأت العديد من الجهات في مجال انتاج الطاقة الاهتمام بالتحسين الوراثي وإيجاد الطرق المثلى للعمليات الإنتاجية ، كما ان هناك بعض الدول بدأت بالاعتماد على الطحالب لإنتاج الهيدروكربونات .

البحار والطحالب الصغيرة

الصفحة	الموضوع
646	البحار
647	التنوع الحيوي في البحار
648	إمكانيات البيئات البحرية
651	اكتشاف الأدوية
652	معوقات استغلال البحار
652	الطحالب الصغيرة
653	معوقات تطور التقنيات الحيوية للطحالب
654	استعمالات الطحالب الصغيرة
654	استعمالات الطحالب في تغذية الانسان
657	استعمالها مخصبات حيوية
659	مستحضرات التجميل
659	تغذية الحيوان
661	استعمالات أخرى

البحار والطحالب الصغيرة

تمثل البحار التوجهات الجديدة للتقنية الحيوية وذلك لان هذه البيئات لم تستغل بعد بشكل كبير .
والطحالب الصغيرة هي احياء لم يستفاد منها بالشكل الأمثل لذا يتناول الفصل الحالي بعض الجوانب البسيطة لهذين الجانبين .

فالبيئة اليابسة تم إتلاف بعضها بشكل هائل نتيجة لفاعليات للإنسان من خلال تأثيره بمختلف التوجهات والأشكال منها :

- استخلاص النفط والمعادن .
- سوء إدارة الأراضي .
- قطع وإزالة الغابات .
- الفعاليات التي أدت الى ارتفاع درجة حرارة الأرض .
- إدخال احياء غريبة بفاعليات الهندسة الوراثية .

كل هذه الفعاليات أدت ليس فقط الى خراب البيئة وإنما الى خراب العلاقات بين الاحياء ولذلك تغيرت المجتمعات الميكروبية في التربة وهذه التغيرات ليست آنية وانما ستستمر مدة طويلة . واهم ظواهرها قلة التنوع الحيوي الملاحظ على اليابسة الذي يعطي اشارات قوية على خراب البيئة وعدم ملائمتها خاصة بالنسبة للاحياء المجهرية لذلك توجهت الأنظار الى بيئات اخرى يمكن ان تساهم في بعض الإصلاح ومنها البيئات البحرية .

البحار

تشغل حوالي 70 % من سطح الأرض وهي غير مستغلة بشكل امثل من ناحية التقنية الحيوية ، لذلك وجد ما يسمى بالتقنية الحيوية البحرية Marine Biotechnology للاهتمام بها . وتمثل الاحياء البحرية مجموعة مهمة ذات مواصفات جديرة بالاهتمام لإنتاج المواد الفعالة ، ولذا يخطط لاستغلال هذه البيئات بالشكل الأمثل في إنتاج الأدوية ، اضافة الى ان دراسة إحياءها وفهم طريقة نموها وأي معلومات اخرى ستشارك في إيجاد وتطوير الأدوية والمواد التي ستستعمل في المستقبل .
اما من النواحي الأخرى فان البحار تمثل مصادرا جيدة للأغذية وقد استغلت بشكل كبير من هذه الناحية وأصبح الصيد الجائر هو السمة الغالبة ، مما يجعلها غير قادرة على تلبية حاجة سكان العالم وعليه بدأت دراسة البحار لاستعادة عافيتها ويساهم في ذلك كل من التقنية الحيوية والهندسة الوراثية في هذه الجوانب من خلال :

- تطوير الدراسات في مجال علوم الأسماك لتحديد التجمعات الطبيعية وتداخلها مع بعضها اضافة الى إيجاد أصول التجمعات السمكية ودراسة كفاءة بعض الأصول .

• تطوير عددا من الفحوص لاختبار سلامة لحوم الأسماك البحرية والكشف عن وجود الممرضات البشرية فيها أي تلوثها بعد الصيد .

ومنها تطوير المجسات الحيوية التي تستعمل كأنظمة إنذار مبكر في تحديد سلامة اللحوم ومن ورائها سلامة البيئة ، لأن بعض الطحالب البحرية تظهر فيها ظاهرة العنفوان خاصة الانواع السامة مما يسبب العديد من الوفيات التي يكون مصدرها البيئات البحرية ، وهناك مجسات تحذر من ازدياد بعض الواسمات او المواد الحيوية كي يتم الاستعداد لمعالجتها ، ومن جهة ثانية هناك بعض الاحياء البحرية تساعد في تنظيف البيئة البحرية عند ترسب المواد السامة فيها لذلك يمكن ان تنقل الى مواقع الخطر للمعالجة .

وقد تم تأسيس مراكز تعنى بالتقنية الحيوية البحرية تجوب البحار والمحيطات لإجراء المسح والتحري والبحث عن مضادات حيوية جديدة ومضادات للسرطان ومضادات للملاريا وغيره من الأدوية وقد لاقت نجاحا كبيرا وذلك لان البيئات البحرية تمثل تطرفا واسعا في الظروف مثل الحرارة والضوء والضغط الناتجة من اختلاف العمق .

التنوع الحيوي في البحار

ان 70 % من سطح الأرض المغطاة بالمياه ، المستغل منها في مجال التقني الحيوية لا يمثل إلا 1 % ، ومنها 60 % من البحار تقع في المناطق المغطاة بعمق 2000 متر وبمعدل ملوحة يعادل 0.6 مول كلوريد الصوديوم ، وحرارة تتراوح بين 2- الى 115 °م . تشير الدراسات الى وجود حوالي 10 ملايين من أنواع الاحياء في قعر المحيط ، 60 % منها لم يتم وصفها بعد . اما البحار المتجمدة والتي تشكل 7 % من سطح الارض فهي تحوي العديد من البيئات الموضعية التي توجد فيها انواع مختلفة من المجتمعات الميكروبية ، وتمثل البكتريا أهمها لأنها أكثر الاحياء المحبة للبرودة الموصوفة لحد الآن ومنها

Polaromonas , *Gelidobacter* , *Psychroserpens* , *Octadecobacter* ,
Colwellia , *Polaribacter* , *Psychroflexus* , *Icebacter*

والجدول التالي يوضح اهم البيئات البحرية والإمكانات في استغلالها في التقنية الحيوية (جدول 60) .

والانواع التي اكتشفت تمثل الممالك الثلاث وهي بدائية النواة وحقيقية النواة والاركية وكذلك الفيروسات ، والاحياء عزلت من أعماق مختلفة وصل بعضها الى 11000 متر ، واكثر الطرق التي كشفت عن التنوع الحيوي كان باستعمال تواليات DNA اذ ان العديد منها لا يمكن زراعته .

جدول 60 : البيئات البحرية المهمة في التقنيات الحيوية

البيئة	العلامات المميزة للبيئة	الإمكانات
أعماق المحيطات	ارتفاع الضغط	إنتاج محفزات كيميائية وحيوية جديدة
البحار العميقة والبحار القطبية	انخفاض درجات الحرارة	إنتاج المشتتات ، إنتاج محفزات حيوية تعمل بدرجات حرارية واطئة ، معالجة البيئة
مياه البحار والشقوق الحارة	قلة المواد الغذائية ، ارتفاع درجة الحرارة ، زيادة تراكيز المعادن	إنتاج محفزات ذات ألفة عالية ، إنتاج محفزات ثابتة بالحرارة والمذيبات
الترسبات	تراكيز عالية من المواد الغذائية ، تنوع وسائل الدفاع في الأحياء	إنتاج مواد حيوية جديدة ، إنتاج جزيئات التحسس ونقل الإشارات ، ومواد الدفاع الحيوي
المياه المالحة	ارتفاع التراكيز الملحية	إنتاج محفزات حيوية تعمل بملوحة عالية ، إنتاج مواد جديدة
مناطق الهيدروكربونات	وجود الكربوهيدرات	معالجة البيئة حيويًا ، اشتقاق عوامل للتحويل الحيوي
أراضي البحار العميقة	ظروف لاهوائية	إنتاج عوامل التحويل اللاهوائي الحيوية

وتظهر بين الأحياء ظاهرة التعايش التي تكون واضحة ومهمة للأحياء البحرية في ظل زيادة التنوع الحيوي الموجودة في البحر ، وتتعيش الأحياء من مختلف الممالك مع بعضها ، مثل تعايش البكتيريا مع الاركيا أو تعايش البكتيريا مع الأحياء حقيقية النواة أو الأحياء حقيقيات النواة مع بعضها ، فكل أنواع التداخلات المعروفة يمكن أن يوجد في البيئات البحرية ، ودراسة علاقات التعايش وطريقتها يمكن أن تعطي بعض المؤشرات عن نوعية المواد التي تفرزها الأحياء والتي يمكن استغلالها كأدوية أو غيرها من الأغراض .

إمكانات البيئات البحرية

تمثل البيئات البحرية وجود تطرف في العديد من العوامل ، وتمتاز بفقرها للمواد الغذائية Oligotroph وبشكل عام تتصف أحياءها باحتوائها على جينومات صغيرة وكذلك صغر حجم الخلايا .

ومن أهم مجاميع الأحياء التي تضمها هي الأحياء المحبة للضغط العالية لان مثل هذا العامل نادرا ما يتطرق على سطح الأرض .

الاحياء المحبة للضغط العالية Barophilic

تعد البيئات البحرية المكان الملائم لوجود الاحياء المحبة للضغط العالية او المحتملة لها ، ومنها احياء تابعة للأجناس *Colwellia* , *Moritella*, *Shewanella* , *Photobacrium* تعيش الاحياء المذكورة تحت ضغط 65 ميكا باسكال (MPa ، الضغط الجوي يساوي 100000 باسكال) ويعتقد وجود جينات مسؤولة عن محبة الضغط Barophily وتحمل الضغط Barotolerance تساعد الاحياء للتأقلم للضغط العالي في أعماق البحار .

وتختلف الاحياء في مدى تحملها للضغط فتوجد الاحياء المحبة لضغوط متطرفة Extremely barophilic مثل *Moritella yayanosii* التي تنمو تحت ضغط 60 – 100 ميكا باسكال وبضغط أمثل 70 ميكا باسكال .

وتعتمد المقاومة على الحدود الخارجية في الخلية خاصة الغشاء الخارجي وبروتيناته ، فبعض البروتينات مثل OmpH يزداد تخليقها وكميتها الى 10 – 100 ضعف عندما يصل الضغط الى 28 ميكا باسكال كما في البكتريا *Photobactrium profundum* SS9 والبروتين يمثل قناة Porin غير متخصص لنقل المواد الغذائية في البيئات البحرية الفقيرة بالمواد الغذائية . وتختلف بروتينات الغشاء الخارجي وكمياتها استجابة للضغط ، فعند ضغط قليل 0.1 ميكا باسكال تزداد كمية OmpL اما البروتين OmpI فيزداد عند ضغط 40 ميكا باسكال . كما ان هناك بروتينات لتحمل الضغوط العالية منها RecD الذي يساعد في تثبيت البلازميدات في الخلايا .

اما الأنواع التابعة للبكتريا *Shewanella benthica* المحبة لضغوط عالية فان اوبرون الضغط يتم تنظيمه باثنين من OFRs (OFR1 , OFR2) تحت سيطرة ممهد خاص يشبه في تواليه الممهد للبروتين OmpH المذكور للبكتريا اعلاه ، اضافة الى ذلك تحوي البكتريا على OFR4 , OFR3 التي تقع الى يمين الاوبرون الأول ، يشفر OFR3 لبروتين CydD الذي يكون مسؤولا عن تجميع معقد السايتركرومات *bd* العاملة في السلاسل التنفسية .

استغلال البيئات البحرية

ان وجود الظروف المتطرفة والتنوع الحيوي الكبير يعد من الروافد المهمة التي يمكن ان تلبي حاجات الانسان . وقد استغل التنوع الحيوي للبيئة البحرية لأغراض منها :

- زيادة الأغذية البحرية .
- زيادة المواد الأولية للعمليات التصنيعية .

والاستغلال يرمي الى استغلال البيئة البحرية للعديد من الأغراض تصب في مختلف الجوانب منها صناعة الصمغ الجديدة من كائنات بلح البحر *Mussels* ، والاستخدامات الصناعية والبحثية للمواد المتفلورة *Fluorescent* المستخرجة من اسماك *Jellyfish* .

وتكون البحار مصدرا مهما للإنزيمات التي تعمل تحت ظروف متطرفة وقد تم الحصول على الانزيمات المقاومة للحرارة التي تعزل من البكتيريا والاركية التي تعيش في أعماق البحار وكذلك عزلت بعض البروتيازات التي تعمل بدرجة حرارة 116° م وتزداد فعاليتها عند رفع الحرارة الى 130° م وتزداد فعاليتها وثباتها عند زيادة الضغط المسلط الى 50 ميكا باسكال . وعزلت ايضا إنزيمات كثرية DNA من الاحياء التي تعيش تحت أعماق كبيرة وذات درجات حرارية مرتفعة .

اضافة الى عزل إنزيمات تعمل بدرجات حرارة واطئة من الاحياء التي تعيش في البحار القطبية وتستعمل في التصنيع الغذائي ومنها الإنزيم الفا – اميليز الذي يعمل بدرجة حرارة 2-° م المعزول من البكتيريا *Pseudoalteromonas haloplanctis* , *Alteromonas haloplanctis* ، وإنزيمات اخرى تستعمل في صناعة الجلود ومواد التنظيف ومعالجة البيئة .

كما ان الاحياء المعزولة من هذه البيئات تكون متحملة للمذيبات وخاصة البكتيريا والخمائر التي تقوم بتحليل مكونات النفط الخام والهيدروكربونات الحلقية وتحلل الكولسترول لذلك تستغل الصفة الأخيرة للتعامل مع الأغذية الغنية بالكولسترول .

وتشكل البيئة البحرية مصدرا مهما للحصول على الكتلة الحيوية مثل الطحالب البحرية الكبيرة او غيرها من الاحياء التي تستعمل في التخمرات لإنتاج الوقود الحيوي واستعمال البقايا كعلف حيواني . وباستعمال بعض الطرق الخاصة بالزراعة أمكن عزل بعض الاحياء التي تستخدم في بعض عمليات التقنية الحيوية منها :

Sphingomonas

بكتيريا تنتج بعض انواع السكريات المكوثة الخاصة هو *Gellan* (من *Sph. elodea*) المراد استخدامه بدلا عن الاكر ، والبكتيريا صغيرة جدا وجينومها (1.7 ميكا قاعدة) ويمثل حوالي 25 % من جينوم *E. coli* ومن ميزات الاخرى انها تحوي على نسخة واحدة من اوبرون *rRNA* . هذا الكائن اخضع لدراسات مستفيضة وكانت تتبع لجنس *Pseudomonas* ، ودرست من النواحي الوراثية وتعرضت لعمليات الهندسة الوراثية لأهمية المواد المجلنتة التي تنتجها لتكون بديلا عن الاكر الذي تتفوق عليه في عدد من الصفات .

Cycloclasticus

عزلت افراد الجنس من بحر ألأسكا وتستعمل في معالجة التلوث بالنفط . النوع *Cy. oligotrophus* يستخدم عدد قليل من الهيدروكربونات الحلقية وله ألفة عالية للتولوين وهي اكبر ألفة مسجلة بين كائن حي والمادة التي يعمل عليها . تمتاز البكتريا بصغر جينومه الذي يصل الى 61 % من جينوم *E. coli* وهناك أنواع أخرى تابعة للجنس لها القابلية على تفكيك الهيدروكربونات الحلقية PAH لذلك تستعمل أفراد الجنس في معالجة التلوث بالنفط .

اكتشاف الأدوية

يعد استغلال البيئات البحرية للحصول على الأدوية الجديدة من اهم الجوانب في الوقت الحاضر وذلك لان المواد الكيموحيوية المنتجة من اللافقرات والطحالب والفطريات والبكتيرية البحرية تختلف عن تلك المنتجة من الاحياء الموجودة على اليابسة وبذلك تزداد فرصة الحصول على أدوية جديدة .

ويمكن ان تستغل حالة التعايش السائدة بين الاحياء البحرية في حدس ما يمكن ان تنتجه الاحياء البحرية وهذا يعني وجوب دراسة ظاهرة التعايش ، ودفاعات الاحياء واليات عملها ، وكذلك فعالية الاحياء في حماية الموقع البيئي لها ، وكيفية نقل الإشارات بين الاحياء وكذلك نقلها داخل الكائن الحي ، وتصرف الاحياء عند التغذية والآليات التي تستعملها في منع الاحياء الغريبة من استعمال المواقع التي تستعمرها ، وكل هذه أدت وتؤدي الى عدة اكتشافات منها :

- المضادات الحيوية وقد اكتشف منها العديد لمضادة للبكتريا والفيروسات مثل فيروس الهربس المنتجة من الفطريات والبكتريا البحرية والاسفنجيات .

- مضادات السرطان وهذه وجدت في البكتريا البحرية وغيرها من الاحياء مثل *Bugula neritina* يفرز مجموعة من *Bryostatins* مثل *Bryostatins 1* و *Bryostatins 2* المستعملة كمواد مضادة للسرطانات .

- مواد ذات فعالية صيدلانية أخرى وتنتج هذه كمواد ايض ثانوي من بعض الأحياء مثل الاركيا وانواع من المرجان وبعض الزقيات المائية والاسفنجيات وكذلك القواقع التي تنتج سموم الأعصاب التي لها القابلية في القضاء على الآلام ويكون تأثيرها 10000 مرة بقدر فاعلية المورفين وبدون تأثيرات جانبية

- تدعم المنتجات البحرية صناعة مواد التجميل مثل المواد المشتقة من الطحالب والقشريات .
- تستخدم المرجانيات في صناعة بدائل العظام لما لها من مواصفات جيدة من حيث المسامية والانضغاط وإمكانية الجسم في مد الأوعية الدموية فيها .
- اضافة الى العديد من الأدوية الاخرى التي هي في مراحل التجارب السريرية .

معوقات استغلال البحار

بصورة عامة تكون هناك صعوبة في عزل وتنمية الاحياء التي تعيش تحت ظروف متطرفة وهذا يسري على احياء البيئات البحرية ، اذ لا تزيد البكتريا والاكثينومايسيتات التي يمكن استزراعها عن 1 % . ولكن إحدى الحلول لاستغلال الاحياء البحرية هو جلبها للمختبر وزرعها في بيئة مشابه وهذا يتطلب التعرف على هوية الكائن والظروف التي يعيش فيها ، واهم مقومات النجاح هو إعداد الأوساط الزرعية التي ينمو عليها لذلك يكون لكل كائن الوسط الذي ينمو عليه وهذا ما يعرف بـ Taxon –formulated media (كما سيأتي ذكره لاحقا) .

النقطة الأخرى التي تعيق استغلال الاحياء البحرية هو ان المواد التي تنتجها الكائنات البحرية تكون بتركيزات قليلة جدا ولكن قد يكتفي بهذه الكميات الصغيرة المنتجة عندما تكون هناك صعوبة في تخليقها نظرا لتعقيد تركيبها . اما حصد الكتلة الحيوية واستخلاص المواد منها فتكون غير مجدية خاصة في مجال الأدوية .

الطحالب الصغيرة

Microalgae

للطحالب وخاصة الصغيرة Microalgae التي تجدد الاهتمام بها في بداية القرن الحالي إمكانيات هائلة تصب في مجال التقنية الحيوية نظرا لطبيعتها الغذائية فهي تعد جاذبة بشكل كبير كأنظمة او مفاعلات حيوية للإنتاج . فالطحالب ذات التغذية الذاتية الضوئية تعد مصدرا للعديد من المواد الكيميائية القيمة مثل السكريات المكوثرة والصبغات والمواد الغروية ، والفيتامينات والحوامض الدهنية الأساسية التي يمكن ان تستعمل في التصنيع الغذائي والصيدلاني ، لذلك وضعت برامج كبيرة لإجراء المسح على الطحالب الصغيرة المنتجة للمواد الفعالة حيويا والتعرف على مواد الأيض المرغوبة والمطلوبة . وقد تم التوصل الى العديد من المنتجات التي تجمعها الخلايا او تراكمها باستعمال طرق المسح السريعة .

وبعيدا عن عمليات إنتاج المواد الفعالة ، تستعمل الكتلة الحيوية للطحالب لاستخلاص بعض الكيماويات المهمة وكذلك إنتاج مركبات البروتين التي تخضع لعدة فحوص ومقارنتها ببروتينات قياسية ودراسة جدواها الاقتصادية ثم استعمالها كمدعمات غذائية او في إعداد العلف الحيواني . واكتسبت التقنيات المعتمدة على الطحالب الصغيرة أهمية متجددة نظرا لأهمية وإمكانيات تطبيقها وذلك :

- وجود التنوع الحيوي الكبير في مجموعة الطحالب الصغيرة .
- تطور عمليات الهندسة الوراثية والتقنيات الجزيئية لهذه المجموعة .

ولذلك تعد من المصادر الجديدة الواعدة ولكن بعد العناية بعمليات المسح والتحري والتي يمكن ان تلبي الطلب والحاجة المتزايدة في مجالات الصناعة الصيدلانية والغذائية وفي المجال الأخير يعتمد على الطحالب في تصنيع الأغذية الفعالة Functional foods التي أصبحت الشغل الشاغل للناس .

معوقات تطور التقنيات الحيوية للطحالب

ان ما ذكر أعلاه حتم وجود حقل خاص يهتم بهذه المجموعة من الطحالب Microalgal Biotechnology ، اذ ان هناك إمكانيات كبيرة لاستغلال الطحالب الصغيرة البحرية وطحالب الصحراء . ولكن أسواق منتجاتها لا زالت ضيقة وهذا ما أدى في القرن الماضي الى تراجع استعمالها ولكن تجدد الاهتمام كما ذكر . وتحاول الجهات المعنية إيجاد الحلول للنواحي السلبية التي ترافق استعمال هذه المجموعة ومن المشاكل :

- بعض الطحالب تنتج السموم الطحلبية Phytotoxins وخاصة البحرية منها والتي كانت وراء كوارث كبيرة أدت الى وفيات كثيرة .
 - إنتاجها عادة منخفض لبعض المواد المهمة لذلك استعملت معها طريقة حلب الطحالب Microalgae milking وهي إعادة استعمال الكتلة الحيوية المنتجة في عمليات إنتاجية متكررة كما في حالة استعمال الطحلب *Dunaliella salina* لإنتاج البتا - كاروتين ، وهذه الطريقة يمكن استعمالها مع مواد أخرى سواء كانت مواد ايض أولي او ثانوي .
 - يؤدي استعمال الطحالب الى التآكل الحيوي Biocorrosion وإنتاج الروائح الكريهة ولكن هذه يمكن معالجتها بعمليات الصيانة والادارة الجيدة .
 - تحتاج عمليات تنميتها الى ظروف خاصة مثل المفاعلات الحيوية الضوئية ، ولذلك تأخر تطور دراسة هذه المجموعة عن الأحياء الأخرى وقد انعكس ذلك على أعدادها في مراكز التجميع فالمقدر ان هناك اكثر من 10000 نوع ولكن المحتفظ به في المراكز الخاصة لا يزيد عن عدة آلاف قليلة .
- ويعتقد ان أفضل النجاحات يمكن ان تتم باستعمال الطحالب بتوفير أفضل الظروف كما هو الحال مع باقي الاحياء لذلك تم التوصل الى استعمال مفاعلات حيوية ضوئية Photobioreactors والتي اطلق عليها Phototrophic bioreactors التي يعنى بتصميمها وتصميم الأجزاء الملحقة وما تتطلبه العملية الإنتاجية . واستعمال مثل هذه الأنظمة المغلقة يكون مفضلا على استعمال البرك المفتوحة التي تعد الطريقة التقليدية وشائعة الاستعمال في العمليات الإنتاجية الكبرى ولكنها لا تكون ملائمة في تنمية الطحالب خاصة عندما يراد إنتاج المواد ذات القيمة العالية والتي يرام استعمالها كأدوية .

استعمالات الطحالب الصغيرة : استغلت الطحالب في عدة استعمالات منها :

استعمال الطحالب في تغذية الانسان

تستعمل الطحالب الصغيرة تغذية الانسان ومنها , *Arthrospira (Spirulina)* , *Nostoc* , *Chlorella*, وبدأت زراعتها على نطاق تجاري في الستينات ، بعد الزيادة في عدد السكان في أوائل الخمسينات وبدا البحث عن مصادر جديدة للموارد الغذائية . وبدأت عمليات الزراعة التجارية بزراعة *Chlorella* .

اما تصاميم المفاعلات الخاصة فقد بدأت في السبعينات وكانت خاصة بالطحلب *Arthrospira* . وفي الثمانيات كانت هناك 46 من المصانع الكبيرة في آسيا لإنتاج ما يقرب من 1000 طن شهريا من الكتلة الجافة للطحالب الصغيرة وبشكل خاص *Chlorella* . وبعد 30 سنة ارتفع الإنتاج ليصل الى 5000 طن .

وتستعمل الطحالب في تغذية الإنسان على شكل أقراص او كبسولات او على شكل سوائل ، والكمية الموصى بها كتدعيم غذائي هي بحدود 0.3 غم / كغم من وزن الجسم . ويمكن ان تدخل في تركيب الأغذية والمشروبات وكذلك كملونات غذائية .

وأكثر الطحالب المستعملة في تغذية الإنسان على نطاق تجاري هي *Aphanizomenon flos-aquae* , *Chlorella* , *Arthrospira* , *Dunaliella salina* .

التركيب الكيماوي للطحالب

وتمتاز الطحالب الصغيرة بمحتواها العالي من البروتينات ومركبات أخرى كما موضح (جدول

(61)

فهو كما موضح في الجدول

- تحوي على تراكيز عالية من البروتينات مقارنة بالمصادر التقليدية الأخرى . كما ان بروتيناتها تحوي على كل الحوامض الامينية ومنها الحوامض الأساسية ، وتكون بروتيناتها من الناحية النوعية والكمية مضاهية للبروتينات النباتية .

- تحوي الطحالب على الكربوهيدرات مثل النشا والكلوكوز وسكريات أخرى وسكريات مكوثرية ، وتكون كربوهيدراتها قابلة للهضم والتي تجعل إمكانية استعمال الكتلة الحيوية للطحالب الصغيرة غير محدودة في الأغذية او الأعلاف .

- اما الدهون فتتراوح بين 1 - 70 % ويمكن الوصول الى 90 % من الوزن الجاف عند ظروف خاصة . وتضم دهونها حوامض دهنية مشبعة وغير مشبعة بطول من السلاسل يتراوح بين 12 - 22 ذرة كربون . ومنها الحاوية مجاميع $\omega 3$ و $\omega 6$ التي تكون ذات أهمية خاصة .

- تكون الطحالب مصدرا للفيتامينات الأساسية مثل A , B1 , B2 , , B12 , B6 , E , C إضافة الى البايوتين و حامض الفوليك و Nicotinate , Pantothenic acid .

جدول 61 : التركيب الكيماوي لبعض المواد الغذائية وبعض الطحالب (% من المواد الجافة)

المادة او الطحلب	البروتينات	الكاربوهيدرات	الدهون
خميرة الخبز	39	38	1
اللحوم	43	1	34
الحليب	26	38	28
الرز	8	77	2
فول الصويا	37	30	20
<i>Anabaena cylindrica</i>	56 – 43	30 – 25	7 - 4
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	58 – 51	17 – 12	22 – 14
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	39 – 28	57 – 40	14 – 9
<i>Scenedesmus obliquus</i>	56 – 50	17 – 10	14 - 12
<i>Spirulina maxima</i>	71 – 60	16 – 13	7 – 6
<i>Synechococcus sp</i>	63	15	11

- تكون الطحالب غنية بالصبغات فمثلا يتراوح الكلوروفيل بين 0.5 – 1 % من الوزن الجاف ، وتصل الكاروتينات الى 0.1 – 0.2 % في عموم الطحالب وتصل الى نسبة أكثر في طحالب خاصة . وتحوي ايضا على Phycobiliproteins بنسب مختلفة . ويعتمد التركيب الكيماوي ومحتوى الطحالب من البروتينات والفيتامينات وغيره من المواد على ظروف التنمية وطرق التجفيف .

Arthrosipra

تستعمل في تغذية الإنسان على نطاق تجاري نظرا لمحتواها العالي من البروتين كما ان لهذا الطحلب فوائد اخرى سوى الفوائد الغذائية ومنها :

- التقليل من ارتفاع الدهون Hyperlipidemia .
- التقليل من ارتفاع ضغط الدم .
- محاربة الفشل الكلوي .

- التقليل من تركيز الكلوكوز في مصل الدم .
- تشجيع نمو العصيات اللبنية في الأمعاء .

وبعض شركات دول الشرق تنتج ما يقرب من 200 طن من مسحوق الطحلب الذي يمثل 25 % من إنتاج هذه الدول ، وما يقرب 10 % من الإنتاج العالمي . فهناك مساحات شاسعة في بعض الدول للإنتاج تصل حقولها مساحة 440000 م² . ومنتجاتها من الأقراص أو المساحيق أو الرقائق أو بشكل معاجين أو مستحضرات سائلة توزع على حوالي 20 بلد أو أكثر حول العالم ليستعمل في تحضير الأغذية العلاجية Nutraceuticals .

ونظرا لكون عمليات التجفيف من المراحل الإنتاجية الصعبة لذلك صممت أنظمة تجفيف خاصة لإبعاد الأوكسجين الذي يؤدي الى أكسدة الكاروتينات والحوامض الدهنية التي تحدث في عمليات التجفيف العادية وذلك بواسطة ضخ النتروجين الخامل أو غاز ثنائي اوكسيد الكربون .

Chlorella

ينتج الطحلب من قبل اكثر من 70 شركة موزعة على أنحاء العالم وبعضها تنتج ما يقرب من 400 طن من الكتلة الجافة سنويا . وقد صممت مفاعلات خاصة بهذا الطحلب Tubular photobioreactors التي تستوعب 700 م³ ، ومبيعاتها تصل الى اكثر من 38 بليون دولار سنويا واهم مكونات *Chlorella* هو β - 1,3 - glucan الذي يتصف بعدة مواصفات ايجابية في الجسم منها :

- يكون من المحفزات القوية للجهاز المناعي .
- يعد من الكاسحات للجذور الحرة .
- يقلل من دهون الدم ويقلل من الكوليسترول .
- يستعمل لمعالجة القرحة المعدية .
- يستعمل لمعالجة الجروح .
- يعمل ضد الإمساك .
- يعمل ضد تصلب الشرايين .
- له تأثير مضاد للسرطان .

اما الطحالب الاخرى مثل *D. salina* فتستعمل في الأغذية الصحية لإنتاجها الصبغات ، والطحلب *Aphanizomenon flos-aquae* فيستعمل في الأغذية نظرا لفوائدها الصحية .

استعمالات أخرى

استعمالها كمخصبات حيوية : استعملت البكتريا المزرقة كمخصبات حيوية Biofertilizers خاصة في الأراضي التي تزرع بالرز الذي يكون مجهدا ومستنزفا للتربة .

وهذه المجموعة حظيت بأكبر قدر من عمليات التحويل الوراثي وإيجاد الوسائل للدراسات والتحويلات ، كونها من الأحياء التي تثبت الكربون والنتروجين لذلك تعد من الأحياء Key organisms التي يندر وجود مثلها في مجاميع الأحياء الأخرى .

إنتاج الدهون ومشتقاتها : تستعمل الطحالب الصغيرة ثنائي اوكسيد الكربون الذي تثبته عند تراكيز عالية وتقوم أثناءها بتجميع كميات كبيرة من الدهون . وتستعمل في إنتاج Docosahexaenoic acid (DHA) acid (ω) وحامض (AA) Arachidonic acid ، Eicosapentaenoic acid (EPA) .

ومن الحوامض الدهنية الرئيسية التي تتجمع في الطحالب حامض البالميستيك (0 : C16) وحامض الاولييك (1 : C18) وحامض (2 : C18) Linoleic acid وحامض Linolenic (3 : C18) .

وتعد الحوامض الدهنية من اهم الجزئيات الحيوية التي تنتج من الطحالب ، وذلك لان النباتات والحيوانات الراقية تنقصها الانزيمات اللازمة لتخليق Polyunsaturated fatty (PUFAs) acids الحاوية على اكثر من 18 ذرة كربون . واهم مصادرها الأسماك وزيت الأسماك التي تكون مصدرا جيدا للـ PUFAs طويلة السلسلة ، ولكن هناك بعض التحفظات على استعمال الأسماك لأنها قد تحوي على بعض المواد السامة ، كما ان رائحة السمك قد لا تكون مرغوبة للعديد من الأشخاص ، اضافة الى ان زيوت الاسماك تكون في حالات خاصة غير ملائمة لأنها تحوي على خليط من الحوامض الدهنية ، وبما ان هذه الحوامض توجد في الاسماك التي تتغذى على الطحالب لذلك يكون من الافضل استعمال الطحالب والجدول (62) يوضح اهم الحوامض الدهنية في الطحالب .

والحامض الدهني DHA هو المتوفر على النطاق التجاري ، ويوجد في أنسجة الجسم ويكون اساسي في تركيبة الحوامض الدهنية في المادة الرمادية للدماغ وشبكية العيون ويكون كذلك اساسي في أنسجة القلب . والحامض الدهني ضروري لتطور الدماغ والعيون السليم للمواليد ، وفي البالغين يساعد في انتظام وصحة الأوعية القلبية . ويوجد في اغذية محددة مثل الاسماك الدهنية وحليب الأم ولا يوجد في حليب الأبقار . ولذلك صدرت التوصيات بادخاله في الخلطات الغذائية للمواليد الطبيعيين والخدج ، وقد وصلت مبيعاته في خلطات أغذية الصغار الى 10 بليون دولار في موسم عام 2005 .

والمستعمل في أغذية الأطفال هو مستخلص الطحلب *Cryptocodinium cohnii* التي تحوي دهونها على 40 – 50 % من DHA ولكن لا تحوي على EPA او غيرها من الحوامض الدهنية

طويلة السلسلة ، وقد أجاز استعمالها في أكثر من 60 دولة من قبل منظمة FDA . وينتج الحامض من الطحلب *Schizochytrium* لأنه أقل كلفة في الانتاج وأطلق على المنتج DHA gold ويستعمل كمكملات في أغذية الصغار والكبار كما في استعماله في الأغذية الصحية والمشروبات الغازية ويستعمل أيضا في العلف الحيواني . ومن الأغذية المحضرة والحاوية عليه الاجبان واللبن والتليبسات ومستحضرات الفطور من الحبوب . كما تحضر منه اغذية خاصة بالحوامل والمرضعات .

جدول 62 : بعض الدهون غير المشبعة المهمة في الطحالب (PUFAs)

الحامض الدهني	التركيب	الاستعمالات	الكائن المنتج
γ - Linolenic acid (GLA)	18:3 ω 6 , 9 ,12	. خلطات اغذية الاطفال طبيعي الولادة . مدعمات غذائية	<i>Arthrospira</i>
Arachidonic (AA)acid	20:4 ω 6 ,9,12,15	. خلطات اغذية الاطفال طبيعي الولادة والخدج . مدعما ت غذائية	<i>Porphyridium</i>
Eicosapentaenoic (EPA) c acid	20:5 ω 3,6,9,12,15	. مدعمات غذائية . الزراعة المائية	<i>Nannochloropsis</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Nitzschia</i>
Docosahexaenoic (DHA) c acid	22:6 ω 3,6,9,12,15,18	. خلطات اغذية الاطفال طبيعي الولادة والخدج . مدعمات غذائية . الزراعة المائية	<i>Cryptocodinium</i> , <i>Schizochytrium</i>

ويستعمل الطحلب *Ulkenia spp* من قبل بعض الشركات ويسوق تحت مسمى DHA active اما الحامض γ - Linolenic acid (GLA) فلا توجد مستحضرات تجارية خاصة به .

مستحضرات التجميل

- ◆ تستعمل الطحالب في مستحضرات مواد التجميل والعناية بالبشرة وأهمها *Chlorella* و *Arthrospira* وبعض شركات إنتاج مواد التجميل انشأت الحقول الخاصة بها لتنمية الطحالب وتستعمل مستحضرات الطحالب في المواد المستعملة للوجه والعناية بالبشرة منها :
- ◆ مضادات الهرم ، اذ تستعمل مستحضرات *Arthrospira* الغنية بالبروتينات في منع ظهور خطوط الهرم وتشد البشرة . كما ان مستحضرات *Chlorella vulgaris* تحفز تخليق الكولاجين في البشرة وبذلك تساعد في تجدد البشرة وتقلل من التجاعيد .
- وتكون مستحضرات الطحالب *Nannochloropsis oculata* فعالة جدا في شد البشرة سواء عند الاستعمال السريع او على المدى الطويل . اما مستحضرات *D. salina* تساعد في تكاثر خلايا البشرة وتحسينها .
- ◆ مواد منعشة للبشرة .
- ◆ مواد مجددة للبشرة وخلاياها .
- ◆ تستعمل كمرطبات للبشرة .
- ◆ تستعمل في مستحضرات العناية بالشعر .
- ◆ تستعمل في تحضيرات خاصة للأشخاص الذين يعانون من تقشر البشرة عند التعرض للشمس .
- ويستخدم الطحلب *Botryococcus braunii* لإنتاج الدهون التي تستعمل في الأدوية الجلدية ، اذ ان هذه الدهون تشجع وتحسن من امتصاص الأدوية بنسبة 3 % في أثناء 30 دقيقة الأولى من الاستعمال ، والجلد يكون أكثر تحملا للحوامض الدهنية المنتجة من الطحالب ، اضافة الى ان استعمالها يؤثر على الأنواع المختلفة من الخلايا الجلدية والتي تؤدي الى زيادة النواحي الايجابية لمساعدة الأدوية المستعملة .

تغذية الحيوان

- وتستعمل الطحالب في تغذية الحيوانات ، فهي تشكل 30 % من سوق الأعلاف العالمي ، و حوالي 50 % منها ينتج من *Arthrospira* ، ففي نهاية عام 1999 وصل انتاج الطحلب الى 1000 طن للزراعة المائية توزعت على مزارع حيوانات مختلفة مثل الأسماك والقشريات وغيرها ، وتستعمل الطحالب كغذاء لليرقات المائية وتعد بداية السلسلة الغذائية في الأنظمة المائية . ويمكن زراعة الطحالب لهذه الأغراض على الفضلات المائية التي تزود بالاحتياجات من النتروجين والفسفور ، او استعمال فضلات أخرى بعد تحديد صلاحيتها لنمو الطحالب الصغيرة .

وليس من المستبعد ان تستعمل الطحالب بكثرة في هذه الصناعة وذلك لأنها تمثل الحالة الطبيعية . وتستعمل الطحالب لوحدها لتغذية الأسماك او تستعمل كمضافات لتحسين لحوم الأسماك مثل ألوان السالمون ولتحسين أداء هذه اللحوم من حيث الوظائف الأخرى .

وتكون الطحالب الصغيرة ضرورية لتنمية اليرقات الحيوانية المائية وأكثرها استعمالاً في هذا المجال *Chlorella* , *Tetraselmis* , *Isochrysis* , *Pavlova* , *Phaeodactylum* , *Chaetoceros* , *Nannochloropsis* , *Skeletonema* , *Thalassiosira* ولأجل ان تكون الطحالب الصغيرة ملائمة لمثل هذه الصناعة لابد من توفر بعض الشروط فيها :

● ان تكون سهلة الاستزراع .

● ان تكون غير سامة .

● ان تكون بحجم وشكل ملائم يمكن تناولها من قبل الحيوانات .

● ان تكون جدرانها الخلوية قابلة للهضم لجعل القيمة الغذائية ملائمة عند تناولها .

ويعد المحتوى البروتيني هو اهم المؤشرات لتقييم القيمة الغذائية للطحالب الصغيرة . وتكون الحوامض الدهنية كمؤشر بمستوى الأهمية الخاصة بالبروتينات فهي تحوي على الدهون غير المشبعة (EPA) و حامض (AA) و حامض (DHA) المذكورة اعلاه (جدول 62) . وتكون هذه الحوامض ضرورية لنمو وتمايز اليرقات ، ونسب الحوامض الى بعضها هي الأكثر اهمية من الكميات . وتكون الفيتامينات مهمة ايضا في تنمية اليرقات ، ولذلك يستعمل خليط من الطحالب للحصول على نتائج افضل .

واضافة الى تزويد الطحالب للحيوانات البحرية بالأغذية فإنها تعمل على موازنة البيئة الموجودة فيها ، لذلك استعملت تقنية يطلق عليها *Green – water technique* التي تؤدي الى نتائج أفضل للنمو ومعامل التحويل *Transformation index* مقارنة باستعمال المياه الصافية ، لان اضافة الطحالب يساعد في ثباتية وانتعاش البيئة المائية بتزويدها بالأوكسجين وتمنع تذبذب الرقم الهيدروجيني ولها تأثيرات اخرى ايجابية على العلاقات بين الأحياء .

وتحتاج تربية الاسماك الى ان تكون لحوم الاسماك والحيوانات البحرية الأخرى ذات ألوان

محددة لذلك تضاف صبغة *Astaxanthin* او الطحالب المنتجة لها مثل *Haematococcus* او *Arthrospira* الى اغذية الاسماك مثل السالمون بنسب تصل الى 5 – 20 % . اما عند الرغبة بظهور اللون الأزرق المخضر على خياشيم المحار فيستعمل الدايتوم *Haslea ostrearia* والتي تؤدي الى زيادة قيمة الحيوانات .

وتستعمل *Arthrosipra* وبعض الطحالب الأخرى في تغذية حيوانات أخرى مثل الحيوانات الداجنة مثل الخيل والابقار لأنها تزيد من المؤشرات الحيوية لهذه الحيوانات مثل السيطرة على الوزن والخصوبة ولون اللحوم وغيرها .

وفي الدواجن يصل مستوى الطحالب المستعمل الى 5 – 10 % في الأعلاف ولا تزداد أكثر لأنها تؤدي الى نتائج عكسية ، واستعمال *Astaxanthin* من الطحلب *Haematococcus* يحسن من لون جلد فروج اللحم وكذلك لون صفار البيض كما انه يقلل من البكتيريا *Clostridia* و *Campylobacter* ويسوق العلف الحاوي على *Arthrosipra* تحت مسمى *Algrow* في بعض البلدان المنتجة .

ولكن زراعتها لهذه الأغراض تحتاج الى عمليات حصد ثم إضافتها الى البيئات المائية وهذه تكون مفضلة ، ولذلك تستعمل طرق عديدة فيزيائية او كيميائية او حيوية ، ويتم تحديد صلاحية الطحالب بعد الحصاد وتستعمل او تعرض الكتلة الحيوية الناتجة لعمليات تحويل ثم تحدد سلامتها وكفاءتها الغذائية ثم تستعمل .

استعمالات في مجالات أخرى

- تستعمل الطحالب الصغيرة في المعالجات الحيوية لفضلات المياه وقد تستعمل بشكل حر او مقيد لإزالة مركبات النتروجين والفسفور، وتستعمل في معالجة الفضلات لإنتاج غاز الميثان وكانت مصدرا للطاقة المعينة في السبعينات أثناء أزمة الطاقة التي حصلت .

- وتستعمل في إزالة المعادن الثقيلة وبعد تشبعها بالمعادن الثقيلة تزال الكتلة الحيوية لإعادة استخلاص المعادن منها . وفي مجال الفضلات تعد اكاسيد الكبريت والنتروجين من المثبطات لنمو الطحالب ولكن هناك بعض السلالات وأنواع مثل *Nannochloropsis* spp التي يمكن ان تستعمل لهذه الأغراض والطحلب يمر بطور تلكؤ طويل عند وجود 300 جزء بالمليون من الاوكسيد NO ولكنه في النهاية يمكن ان يقوم بالمعالجة الحيوية .

- تعد الطحالب الصغيرة جاذبة للانتباه لإنتاج البروتينات العلاجية *Heterologous proteins* وهذا المجال في بداياته ولكن توجد بعض الطحالب المحورة وراثيا من قبل شركات التقنية الحيوية لإنتاج البروتينات بالهندسة الوراثية . إضافة الى دراسة هندسة المسارات الايضية لإنتاج تراكيز عالية من البروتينات . فالطحالب تعد مفاعلات حيوية ملائمة لإنتاج المواد العلاجية والبروتينات التي لا يمكن إنتاجها في غيرها من المضاييف .

- إنتاج المضادات الحيوية وتكون الطحالب الصغيرة مصادرا كبيرة لإنتاج المضادات فهي تنتج عددا من مضادات الطفيليات ومضادات البكتيريا ، وكذلك تنتج بعض السكريات المكوثرة ضد فيروس

الايدز Anti-HIV ، وتنتج مواد مضادات السرطانات ، ولذلك زاد الاهتمام بهندستها الوراثية وتحويرها .

• تستعمل كمحفرات مناعية اذ ينشط المستخلص المائي لبعض الطحالب الخلايا Monocytes وكذلك كمحورات حيوية ،

• إنتاج الأصباغ وتصدر الطحالب وخاصة الصغيرة الأحياء الأخرى المنتجة التي تقوم بعمليات التخليق الضوئي ومن الأصباغ التي تنتجها الكاروتينات البرتقالية والحمراء والصفراء . تستعمل في تلوين الأغذية نظرا للطلب المتزايد على الصبغات من أصل حيوي ولسبب نفسه تستعمل في تلوين مواد التجميل .

• تعد مصادرا مهمة للفيتامينات التي تدعم بها الأغذية العلاجية او الصحية ، ولذا تستعمل كمواد مضادة للأكسدة لتحضير المغذيات الدوائية Nutraceutical foods .

• تستعمل مضافات لعلف الدواجن والمواشي والأسماك والقشريات وغيرها من الحيوانات .

• يستعمل Lutein كعامل فعال في معالجة ومنع حدوث العديد من الأمراض التحليلية في الإنسان ومن الطحالب المنتجة للصبغات والمستعملة على نطاق تجاري :

Dunaliella تنتج كميات كبيرة من البتا - كاروتين .

Haematococcus تستعمل لإنتاج صبغة Astaxanthin .

Chlorophycean تستعمل بعض سلالاتها في إنتاج Lutein .

وهناك اضافة الى ما ذكر قوائم طويلة جدا من الصبغات الأساسية والمشتقة وتنتج بعضها اما

باستعمال طريقة البرك المفتوحة او استعمال المفاعلات الحيوية الضوئية المغلقة .

الكاروتينات

ويوجد حوالي 400 من الكاروتينات المعروفة ولكن المستعمل والمنتج على النطاق التجاري

قليل وهي البتا - كاروتين و Astaxanthin (الموضحة تراكيبها في الشكل 76 / الفصل العاشر)

وتأتي بدرجة اقل Lutein , Zeaxanthin , Lycopene , Bixin وتستعمل بشكل رئيس في

تلوين الأغذية ومضافات علف الدواجن والاسماك وكذلك في صناعة مواد التجميل .

وللكاروتينات اهمية صحية :

◊ تكون أوليات لفيتامين A .

◊ لها فعالية مضادة للالتهابات .

◊ لها قابلية إخماد مركبات الأوكسجين الفعالة .

◊ تعمل بمثابة مواد مضادة للسرطانات .

وتكون اصباغ الطحالب في حالة منافسة مع الأصباغ الصناعية ولكن أصباغ الطحالب تكون أفضل لأنها تعطي النظائر الطبيعية .

ويستعمل الطحلب *D. salina* في انتاج البتا - كاروتين وهو طحلب متحرك بالاسواط محب للملوحة ، ينمى في البرك ويتحمل الظروف غير الملائمة مثل ارتفاع الملوحة وقلة النتروجين وارتفاع الإشعاع الشمسي . وتوجد مزارع تجارية للإنتاج في مناطق متعددة من العالم التي تصل مساحاتها الى 800 هكتار (للمزرعة الواحدة) وتنتج الكاروتينات على شكل مسحوق للاستعمال البشري وعلى شكل طحالب مجففة للعلف .

Astaxanthin

تستعمل بشكل رئيس في تغذية السالمون . وينتج من الطحلب *Haematococcus pluvialis* وهو طحلب يحوي على الاسواط وفيه جدار خلوي رقيق وتصل نسبة الصبغة فيه 1.5 الى 3 % من الوزن الجاف . ويتم الإنتاج باستعمال مزارع ذات مراحل :

المرحلة الأولى لبناء الكتلة الحيوية .

المرحلة الثانية لإنتاج الصبغة وذلك بتسليط إضاءة شديدة في أوساط غذائية فقيرة اذ يقوم الطحلب بمراكمة الصبغة وفيها تتحول الخلايا الى خلايا ذات جدران سميكة لتكون بمثابة خلايا هاجعة والكلفة الإنتاجية عالية ولا تنافس المصادر الصناعية . وتستخلص الصبغة من الخلايا او تجفف الخلايا وتستعمل كمستحضر لتقليل السعر والمنافسة .

Phycobiliproteins

وتضم *Phycocyanin* و *Phycoerythrin* (شكل 76) وتنتج من *Arthrospira* والطحلب *Porphyridium* ، ولها فوائد صحية لتلوين الأغذية لتزاحم الصبغات الصناعية . ومنها انتاج *Lina blue* المستعملة في صناعة اللبان والمنتجات والحلويات والمشروبات الغازية ومنتجات الألبان .

وتستعمل في مختبرات المناعة البحثية وذلك لصفاتها الخاصة مثل معامل الامتصاص الضوئي العالي ، الوميض العالي ، ثباتيتها للضوء وغيرها من الصفات التي تحتاجها عملية التحليل المختبري وبما انها من المواد ذات الفلورة الحساسة العالية لذلك تستعمل في تعليم الأجسام المضادة والمستلمات وغيرها من الجزيئات الحيوية والخلايا المستعملة في التشخيص ، وتصل أسعار المنقاة منها الى 1500 دولار للملغرام الواحد وقد قدرت أسواقها بنحو 50 مليون دولار عام 1997 .

- تستعمل الطحالب في انتاج هيدروكاربونات الوقود كما ذكر سابقا (يراجع الفصل الثاني عشر)

- تستعمل الطحالب وخاصة وحيدات الخلايا لإنتاج الكليسرول الذي يمثل احد انواع التنافذيات التي تستعملها الخلايا . ويستعمل للإنتاج التجاري أنواع من جنس *Dunaliella* وتعتمد كمية الكليسرول على تركيز الأملاح خارج الخلايا ، ويستخلص بسهولة من الخلايا بالعصر بعد ان تصل الخلايا الى طور الاستقرار التي تكون لها مواصفات خاصة . عند تطبيق الظروف الملائمة تصل كميات الكليسرول الى 75 % من وزن الخلايا ، لذلك تستغل البحيرات المالحة للإنتاج .
- **المواد الحيوية المشعة** ، تكون الطحالب الصغيرة مثالية لتعليم الجزيئات الحيوية اذ ان نمطها في التخليق الضوئي يسمح بإدماج النظائر المشعة من ^{13}C ، ^{15}N ، ^2H من المواد المشعة الرخيصة مثل $^{13}\text{CO}_2$ ، $^{15}\text{NO}_3$ ، $^2\text{H}_2\text{O}$ مقارنة بالمواد المشعة المكلفة في الحوامض الامينية والكاربوهيدرات والحوامض النووية وتستعمل هذه في :
 - o الاندماج في الجزيئات الحيوية لتحديد التركيب على المستوى الذري .
 - o دراسة عمليات الايض في الخلايا .
- ويصل سوقها الى 13 مليون في السنة وتنتج بعض الشركات 400 غرام في السنة من الحوامض الدهنية المعلمة مثل ^{13}C -DHA تصل قيمته الى 38000 دولار \ غرام .
- تستعمل الطحالب التي تقوم بعملية التخليق الضوئي كمبادلات غازية في الرحلات الفضائية .

توجهات التقنية الحيوية الميكروبية

الصفحة	الموضوع
665	محاوالت التوجهات
665	المحور الأول : إنشاء قواعد معلوماتية حيوية
669	المحور الثاني : البحث ومراجعة تصنيف الأحياء
678	المحور الثالث : معالجة الإخفاقات واستنباط طرق جديدة للتطوير

توجهات التقنية الحيوية الميكروبية

تعد التقنية الحيوية الميكروبية مفتاحاً للقرن الجديد والدوافع وراء ذلك تندرج ضمن :

- الواقع الاقتصادي .
 - المنافسة بين الصناعات الحيوية والصناعات الأخرى وخاصة الصناعات الكيماوية .
 - الطلب الجماهيري المتزايد على كل ما هو حيوي بعد ما لوحظت أضرار الصناعات الأخرى .
- والنجاح في مساعي العاملين في التقنية الحيوية يعتمد على الاختراعات الجديدة ، وإيجاد مواد كيماوية جديدة ذات أصل حيوي ، وكذلك إيجاد أدوية جديدة ، وإيجاد مساعدات أو محفزات التفاعلات Catalysts جديدة ، وهذه المطالب تحتاج معالجة عدة محاور يمكن ان تكون ضمن احد التوجهات الآتية

محاور التوجهات

- ترتيب وتبويب المعلومات التي تم الحصول عليها من الدراسات والبحوث وتصنيفها للاستعمال عند الحاجة .
 - البحث الجديد بالاعتماد على خزين المعلومات المتراكم .
 - معالجة الفشل الذي واجهته بعض جوانب التقنية الحيوية في السابق .
- وكل المحاور المذكورة تحتاج الى المزيد من المعلومات عن الاحياء والتنوع الحيوي واستعمال طرق حديثة لتوصيف الاحياء المجهرية ، وإدارة المعلومات لتسهيل الوصول إليها واشتقاق واستخلاص المفيد منها ووضع قواعد معلوماتية خاصة Bioinformatics . وأكثر المحفزات للحصول على المزيد من المعلوماتية الحيوية هو مجال الطب البشري لغرض معرفة الامراض ذات العلاقة الوراثية وكذلك الكشف عن الأهداف في الاحياء الممرضة لاستهدافها . اضافة الى مساحات اخرى في التقنية الحيوية التي يمكن للمعلوماتية الحياتية المساعدة فيها .

المحور الاول : انشاء قواعد معلوماتية حيوية

في الوقت الحاضر خلف مجال الهندسة الحيوية Bioengineering مجال الهندسة الوراثية Genetic engineering ولكن هذا لا يعني إلغاء الهندسة الوراثية وإنما استعمالها كأساس لما يترتب عليه من تفاعلات ومسارات اىضية نتيجة التغيير الوراثي .

وتغيرت التوجهات في التقنية الحيوية التقليدية الى استعمال المعلوماتية الحيوية Bioinformatics لغرض الابتعاد عن التكرار وصرف الجهد والمال في نتائج مسجلة سابقا او على الأقل معروفة بعض الجوانب ولا داعي البدء من الصفر في كل مرة . ومرة اخرى هذا لا يعني

التخلي تماما عن الطرق التقليدية فلا زالت هناك العديد من الحالات البكر التي تحتاج الى الطرق التقليدية .

والمعلوماتية الحيوية ما هي الا طريقة ترتيب للمعلومات التي تم الحصول عليها من حقول المعرفة الاخرى بمساعدة برامج الحاسوب .

فالمعلوماتية الحيوية تعتمد على علم الحياة التقليدي الذي يقوم بجمع النماذج وإجراء الملاحظات عليها ودراستها ، ثم إجراء التجارب عليها ، ثم ترتيب المعلومات التي تم الحصول عليها . وهذه ترسل لتسجل ضمن قواعد معلومات التي تقوم بجمعها وتخزينها ، ليكون بالإمكان استغلالها فيما بعد للوصول الى معلومات جديدة بالاعتماد على ما معروف ومسجل . وتحتوي المعلوماتية الحيوية وقواعدها على معلومات تخص الأحياء من نواحي متعددة مثل :

- الجينومات وتوالياتها Genomics .
- المكنون البروتيني Proteome وهو كل ما يخص البروتينات .
- مكنون النسخ Transcriptome وتشمل كل ما تنتجه عملية الانتساخ .
- المكنون الايضي Metabolome ويشمل المعلومات الخاصة بالايض .
- اضافة الى كل معلومة ممكنة حول الكائن الحي .

Genomics

يعني تحديد توالي القواعد النتروجينية في DNA والتي تقود الى معلومات نظرية يمكن ان تقارن بالمعلومات الموجودة في الحاسوب . وساعدت التطورات الجزيئية الحديثة في تحديد توالي جينومات كاملة مثل الجينوم البشري الذي له تأثير كبير في معرفة او تحديد الأهداف التي يمكن ان تعمل عليها الأدوية .

وباستعمال خوارزميات Algorithms حاسوبية يمكن مقارنة جينوم ما مع قواعد المعلوماتية للبحث عن جين بطريقة سريعة حتى وان لم يتم تحديد وظيفته من قبل ، ويمكن مقارنة جينوم كائن حي مرضي مع نظيره غير المرضي لتحديد الجين المسؤول عن المرض ، وقد وجد بمقارنة جينوم البكتريا *Haemophilus influenzae* مع جينوم *E. coli* ان هناك 40 هدف للأدوية يمكن استعمالها . ومن مقارنة جينوم البكتريا *Helicobacter pylori* مع *E. coli* و *H. influenzae* تم التعرف على 594 جين موجود في *H. pylori* منها 196 معروفة الوظيفة و 123 مسؤولة عن تداخلات البكتريا مع المضيف والاخيرة وما تبقى من الجينات يمكن ان تكون أهداف للأدوية .

وتساعد تحديد تواليات الجينومات في تحديد التواليات قصيرة السلسلة SSR في DNA للخلايا بدائية النواة واحتمالية ارتباط هذه التواليات بتغيير الأطوار Phase variation والتعبير عن جينات

الضراوة في الاحياء المرضية . فتحديد هذه التواليات ومواقع OFRs المعروفة الوظيفة تشكل أهدافا مثالية لاستهداف ضراوة الاحياء المرضية ، والتي حددت في بكتريا السفلس *Treponema pallidum* وطفيلي الملاريا *Plasmodium falciparum* وقد وجد ان معالجة الطفيلي الأخير بالـ Chloroquine , Quinine ان هذه الأدوية لا تؤثر على الطفيلي وانما تؤثر على الانسان وتمنع تداخله مع الطفيلي .

ولكن Genomics تعاني من بعض القصور وذلك لان تحديد تواليات الجينوم لا تعني اعطاء هوية مضبوطة للكائن الحي وتزداد هذه الهوة باستعمال تقنيات PCR التي تعتمد على Primers منتخبة وتهمل العديد من مناطق او مواد DNA مثل الموجودة في الابواغ للأجناس المكونة لها ، ويمكن ان تؤدي تقنية PCR الى اعتبار النتائج خاطئة Artifacts عند عدم وجود تواليات معروفة للمقارنة خاصة بالنسبة للاحياء غير القابلة للزرع إضافة الى التقنيات الاخرى .

المكونون البروتيني Proteomics

وتعني تحليل Proteome والذي يسمى أحيانا Phoneme ويحوي المعلومات عن البروتينات بعد فصلها وتحديد خرائطها ، وتوصيف البروتينات بطرق دقيقة مثل استخدام نترات الفضة في تحديد الكميات والكشف عن البروتينات بمستوى نانوغرام او باستعمال الصبغات المتفلورة Fluorescent التي تكشف عن البروتينات بمستوى البيكوغرام .

يجب توصيف البروتينات بشكل واضح لان التحويلات التي تجري عليها بعد الترجمة يمكن الكشف عنها بتحديد توالي الحوامض الامينية فيها ، لذلك تعد الخرائط البيبتيدية ، وتكون هناك حاجة ملحة للـ 2D-maps لكل بروتينات الخلية تحت الظروف الطبيعية لتحديد المكونون البروتيني الأصلي في الخلية ثم بعد ذلك يمكن تحديد تأثير الظروف على الخلية وما يعتري بروتيناتها من تغيير تحت ظروف الإجهاد المستحثة او تأثير بيئة النمو والأسباب المؤدية لاستحداث المرضية منها . وبذلك يمكن وضع خارطة مرجعية وقاعدة معلوماتية يمكن الرجوع إليها . ويشمل تحديد المكونون البروتيني العديد من المعلومات عن البروتينات بدءا من عملية ترجمتها والتحويلات التي تجري عليها بعد الترجمة وتوزيع البروتينات في الخلية او الكائن بالنسبة لمؤشرات الزمان والمكان والاستجابة للظروف الخارجية ومنها :

تحديد نسق التعبير عن البروتين Protein expression profile : وهو بمثابة دليل كمي

Quantitative catalogue للبروتينات المخلفة في الكائن او الخلية تحت ظروف معينة .

نمط البروتين المظهري : وفيه تحدد صفة او حالة بروتين معين تحت ظروف معينة مثل تحديد

الكمية ، ومعدل التخليق والانقلاب ومدى وجود التحويلات بعد الترجمة التي جرت عليه .

وفي هذا الموضع هناك بعض المفاهيم لا بد من التعرف عليها منها :

Regulon مجموعة من البروتينات التي يكون تخليقها منظم بتأثير بروتين منظم واحد .

Stimulon مجموعة من البروتينات التي يتم تخليقها نتيجة للاستجابة لمحفز معين .

Protein signature مجموعة ثانوية من البروتينات التي تؤدي الى تغير التعبير نظرا للاستجابة لظرف معين او تغيير وراثي ، وتكون لها علاقة بأحد المسارات الايضية او الوظائف الخلوية مثلا لها علاقة بمعدل نمو الميكروبات ، او وظائف الريبوزومات او إفراز البروتينات .

ولذلك يكون المكنون ألبروتيني وسيلة فعالة جدا في الكشف عن التأثيرات الشاملة أي الكشف عن التأثير على مجموعة من الجينات . وقد استغل المكنون ألبروتيني بالاعتماد على حقيقة ان الإنزيمات والبروتينات في الخلايا بدائية النواة تختلف عن تلك الموجودة في حقيقية النواة واستهدفت الإنزيمات الموجودة في الميكروبات المرضية دون التأثير على الانسان . وتستغل معلومات المكنون ألبروتيني في البحوث الصيدلانية وتطوير موادها وذلك في :

- اكتشاف الأدوية الجديدة وانتخاب أهدافها فيمكن بمقارنة مكنون ببروتيني لأحياء مختلفة تحديد نقاط الاختلاف في الأحياء المرضية وغير المرضية ، او مقارنة الحالات المرضية مع الحالات السليمة للنماذج ومعرفة الاختلافات .
- التحري عن طريقة تأثير الدواء .
- المسح والتحري عن السمية .
- مراقبة تطور المرض أثناء التجارب السريرية .

وقد أوضحت دراسة المكنون ألبروتيني ان البروتينات الكارهة للماء تكون أهداف جيدة للمواد الصيدلانية مثل البروتينات المرتبطة بالأغشية والمستلمات على سطوح الخلايا .

ويمكن ان تطبق معلومات المكنون ألبروتيني في مجالات أخرى من التقنية الحيوية حتى مع الأحياء التي لم يحدد لها توالي جينوماتها ، اذ يمكن استغلال المكنون للأحياء المتطرفة Extremophiles والمتحملة Extremotolerant للكشف عن الإنزيمات والبروتينات الثابتة ومثل هذه ساعدت في الكشف عن البروتينات الحاوية على التنكستن Tungstoenzymes وهي موجودة بكثرة في الأحياء المحبة للحرارة او المتحملة للحرارة والتي يعتقد انه نشأت للمساعدة في تفاعلات الأكسدة والاختزال واطئة الجهد الكهربائي التي تتم بدرجات حرارية عالية .

كما استعمل المكنون ألبروتيني في تحديد استجابة الخلايا للجهودات اذ كشف عن حث حوالي 90 بروتين في البكتريا *Ps. fragi* المهمة في الاغذية تحت إجهاد البرودة . اضافة الى الكشف عن وجود كميات كبيرة من البروتينات الوصيفة و Chaperonins في العديد من الأحياء ، ويمكن ان تساعد في الكشف عن مواد ايض جديدة .

المكونون الايضية Metabolome

ويضم المعلومات الايضية في قواعد معلوماتية خاصة بها تساعد في معرفة المسارات الايضية للأحياء المجهرية والممرضة منها والجينات المشتركة والتي يمكن استعمالها كأهداف للأدوية .

مكونون النسخ Transcriptome

ويشمل كل المعلومات الخاص بانتساخ mRNA ونسق الانتساخ الذي ينتج من العملية وكل ما يتخلق بالانتساخ وتخليق mRNA .

لذلك فالتوجهات الحديثة في التقنية الحيوية ترمي الى انتخاب الأحياء المنتجة والحصول على المعلومات عنها من قواعد المعلوماتية الحيوية ، وبمساعدة برامج الحاسوب وبالدراسة المتأنية يمكن الوصول الى النجاح دون الخوض في غمار عمليات العزل والتشخيص والتصنيف وما يتبعها . والمشكلة لم تحل بالكامل مع الأحياء المجهرية لان معظم الأحياء المجهرية غير مصنفة والبدء بأحياء غير مصنفة غير مقبول الى حد ما . ولذلك لا تزال الطرق القديمة تطبق في بعض المجالات واستطاعت الكشف عن العديد من المواد الا ان استعمال الطرق الحديثة في المساعدة سيكون لها تأثير افضل وانتاج مواد اكثر من السلالة الواحدة بالاعتماد على حقيقة ان السلالة الواحدة تنتج عدة مركبات وهذه فكرة معروفة من زمن بعيد .

وفي الوقت الحاضر توجد أعداد كبيرة من قواعد المعلوماتية الحيوية الخاصة بالتقنية الحيوية في كافة مجالاتها ولكن القواعد التي تخص الأحياء المجهرية ليست بالكثيرة ومنها قاعدة IMD (Integrated microbial database) ، وضعت عام 1997 تحوي على معلومات عن الأحياء المجهرية من حيث التصنيف والعلاقة التطورية وتحديد توالي جينومات بعض الأحياء المجهرية ومعلومات عن ايضها وفسلجتها والبيئات التي تعيش فيها وهذا يساعد في تقديم بعض الفهم عن الأحياء

المحور الثاني : البحث ومراجعة تصنيف الأحياء

وهذا يقع ضمن الاستقصاء الحيوي Bioprospecting ويعني البحث عن موارد حيوية جديدة مثل النباتات والحيوانات والأحياء المجهرية لتكون مصادرا طبيعية لمواد مفيدة مثل الأدوية او المواد الصناعية . والتقنية الحيوية باعتبارها استثمار لعلم الحياة فهي تحتاج الى دراسات معمقة لبيئة الميكروبات لغرض استثمارها بالشكل الأمثل . ومن المعروف ان أهم محركات التقنية الحيوية هي العوامل او النواحي الاقتصادية .

وقد بدأت أسواق جديدة تفتح أمام منتجات التقنية الحيوية وهي في اتساع ، فالتقنية الحيوية كما ذكر في فصول الكتاب السابقة تساعد في حل المشاكل المستديمة والمشاكل التي تظهر نتيجة سوء الاستخدام ، اضافة الى تحسين وتطوير الصناعات الموجودة وإيجاد صناعات جديدة ، وللتقنية الحيوية

مرونة في مواجهة المشاكل التي يتوقع حدوثها في المستقبل مثل سوء التغذية والتلوث البيئي المستقبلي ، ويتوقع ان تساهم بشكل كبير في التخلص من مشكلة ارتفاع الحرارة العالمي .

والمنتج لعمليات صناعة الأدوية – وهو من المحاور الملحة التي تحتاج الى رفق من قبل التقنية الحيوية – يلاحظ انه في نهاية القرن الماضي ان مبيعات المواد الطبيعية ومشتقاتها شكلت 28 % ، وشكلت المضادات الحيوية أكثر المبيعات للمواد الطبيعية اذ بلغت 67 % . والمنتج يلاحظ أيضا ان اكتشاف منتجات من غير المضادات الحيوية يزداد بشكل كبير وأصبح أوسع من سوق المضادات الحيوية . كما ان اكتشاف المواد الفعالة حيويًا ليس بالضرورة يدخل مجال الادوية مباشرة وانما يمكن ان يخضع لعمليات تحويل كيميائي للحصول على ادوية أكثر فاعلية تلبي احتياجات علاجية خاصة .

ويدخل تصنيف الاحياء المجهرية وتشخيصها كواقع يفرض نفسه عند الاستقصاء الحيوي والذي تعتمد عليه القواعد المعلوماتية المذكورة . فالمناقشة اعلاه حول التوجهات الجزيئية واستعمال مكتبات DNA البيئي فتحت المجال وأوضحت ان التنوع الحيوي للاحياء المجهرية هو اكبر مما كان متوقعا ، ولكن التوجهات الحديثة لا تعد الأساس وإنما تعد جزءا مكملًا .

التصنيف وتوجهات التقنية الحيوية

ان عمليات التصنيف المعتمدة على المظاهر والدراسات الوراثية هي في حالة حركة دائمة وتغيير مستمر ، وبعض الأحيان يكون التغيير جذري فقد لا تشمل نوع او جنس او رتبة او صنف كما لوحظ في عمليات التصنيف الجديدة التي أدت الى تقسيم الاحياء الى ثلاث ممالك وهي Prokaryotae , Archaea , Eucarya (يراجع الفصل الرابع والخامس) ومن الأمثلة الابتدائي *Epulopiscium fishelsonii* وهو من الاحياء التي كانت مهجنة الموقع في التصنيف تبين بعد تحديد تواليات الجينوم انه بكتريا ولكنها كبيرة بشكل غير طبيعي . وعند التأكيد على الجوانب التصنيفية فذلك لتجنب التكرار وإضاعة الجهد ، ولكي تكون عملية التصنيف مجدية يجب ان تدخل فيها العوامل البيئية بشكل فاعل جدا لذلك لابد الأخذ بنظر الاعتبار الجوانب الآتية :

- دراسة التوزيع الجغرافي للاحياء Biogeography وهو احد فروع علوم الحياة الذي يهتم بدراسة التوزيع الجغرافي للاحياء في العالم وقد تطور بشكل كبير واسهم في تحديد مواقع وبيئات الحيوانات والنباتات وبشكل اقل الاحياء المجهرية .
- تحديد الاحياء الموجودة في منطقة جغرافية محددة Endemic species ، والمناطق المشغولة بهذه الاحياء تكون بمثابة مناطق ساخنة لوجودها أي تكون حاوية على اعداد كبيرة منها .
- تحديد الاحياء المنتشرة عالميا وغير المقيدة بمنطقة واحدة Cosmopolitan species .
- تحديد التغيرات الناتجة عن الموقع الجغرافي والمتمثل بوجود ضروب جغرافية Geovar مختلفة ضمن منطقة معينة او مضيف معين .

وهذا يعني ان تصنيف الأحياء الى ضروب Varieties أي الى درجة تحت النوع Intraspecies يكون ضروريا لعمليات التقنية الحيوية . ومعرفة الجوانب الجغرافية او البيئة للأحياء تكون مهمة لعدة أسباب :

- لتحديد مدى التنوع الحيوي للأحياء المجهرية .
- تحديد المجاميع التصنيفية من الاحياء المجهرية المهددة بالانقراض والتي تعكس مدى صلاحية البيئة ومدى حاجتها للمعالجات الحيوية .
- تحديد الوظيفة البيئة للمجاميع الميكروبية للاستفادة منها في المعالجات الحيوية او غيرها من الأغراض التي تشارك فيها التقنية الحيوية .
- وعليه فان المقولة القديمة حول الاحياء المجهرية والبكتريا بشكل خاص انها منتشرة عالميا غير صحيحة ، وهذا لا يصح الا في بعض الأجناس ، فالعديد من البكتريا تكون متوطنة ، وحتى المتوطنة منها يوجد بينها تغايرات وراثية كبيرة حتى الموجودة في مضيف واحد .
- يجب الابتعاد عن الكائنات الحية عالمية الانتشار في التقنية الحيوية لتجنب التكرار وحتى يعد الكائن منتشر عالميا (Cosmopolitan species) لابد من توفر بعض الشروط :
- عزل 4 عزلات من الكائن من نماذج مختلفة من النظام البيئي نفسه .
- يجب ان تكون العزلات المذكورة هي من الفلورا الطبيعية المستوطنة للنظام البيئي .
- عزل 4 عزلات متشابه من مناطق مختلفة قريبة من المناطق الجغرافية التي عزلت منها العزلات الاولى .

إخضاع العزلات التي يتم الحصول عليها لعمليات تحليل جزيئي مثل تحديد توالي الجينومات لاثنتين او اكثر من جيناتها لإيجاد العلاقات التطورية ويمكن إجراء عمليات تهجين للـ DNA واعتمادا على مدى التشابه يمكن ان تعد متوطنة او Geovar او أحياء عالمية الانتشار يجب الابتعاد عنها .

الاحياء المجهرية المعزولة

النماذج العشوائية ربما تعطي صورة أفضل عن الاحياء المجهرية الموجودة في بيئة ما ، ولكن الاحياء المجهرية التي تعزل بصورة نقية من النماذج بطريقة الزراعة على الأوساط غذائية لا تمثل المجتمعات الميكروبية الموجودة في تلك البيئات ، وإنما تكون من التي لها القابلية للنمو السريع وتكوين المستعمرات على أوساط صناعية ذات مواد غذائية وافرة وعادة تزرع على الأطباق واغلب الأحيان تحت ظروف هوائية بدرجات حرارية معتدلة . وهذه الأحياء التي يتم الحصول عليها ما هي إلا أدغال عالم الميكروبات وتشكل اقل من 1 % من الأحياء وهذا يمكن ان يتضح ويقدر من

مقارنة عدد الاحياء النامية على الأطباق مع عدد وانواع الاحياء التي تظهر بالفحص المجهرى . وهذا ما يعرف بالشذوذ الكبير لطريقة العد بالأطباق Great plate count anomaly .

ولا شك ان الحصول على مزارع نقية قد ساهم الى حد كبير في التعرف على عالم الاحياء المجهرية ولكن كل هذا جاء من الأدغال . وأكثر الدراسات التي تجرى وتنشر تدور وتعتمد على هذه الاحياء التي تنمو على الأطباق المختبرية ، وهذه لا يمكن ان تمثل الآلاف من الاحياء الميكروبية الموجودة . ومن هنا بدا استعمال الدراسات الجزيئية لذلك كان لابد من وضع شبكات تربط بين النتائج الظاهرة على الأطباق مع الدراسات الجزيئية ومنها استخدام تواليات 18S rRNA , 16S rRNA (SSU rRNA) وقد اختيرت هذه الجزيئات لتكون أفضل من بعض الساييتوكرومات و Ferredoxins المستعملة كأدوات لتسجيل Molecular chronometer لعدة أسباب :

- متوفرة في الخلية بكميات كبيرة .
- يشفر لها بجينومات العضيات في الخلايا حقيقية النواة وبجينومات الخلايا بدائية النواة
- تظهر فيها اجزاء سريعة التطور وأخرى بطيئة ولكنها بشكل عام ثابتة او محافظ عليها .

• تتداخل مع عدد كبير من جزيئات RNA الأخرى والبروتينات .

• ضرورية لاقتصاديات الخلايا .

ولكنها لا تكون معتمدة بشكل مطلق واهم الأمثلة على عدم الاعتماد المطلق هو انه عند اعتمادها في رسم او وضع شجرة الأحياء (يراجع الفصل الرابع / شكل 46) اهتزت أصول هذه الشجرة عند استعمال الطرق الجزيئية الحديثة الأخرى ، ولم يتمكن العاملون من وضع شجرة حياة حقيقية وذلك لا يعود الى الطرق المستخدمة بشكل أساسي او الجينات المنتخبة التي اعتمدها في رسم العلاقات ، ولكن لان تاريخ الحياة على الأرض لا يمكن تمثيله بشكل صحيح على شكل شجرة وكانت الشجرة غير مقبولة وذلك لعدة أسباب :

• الطرق المستعملة تحوي على Artifacts تتعلق بالجزيئات نفسها وكذلك تتعلق بالاحياء وحصول الطفرات فيها مما أدى الى نتائج مضللة حول أعماق وجذور الشجرة .

• حصول الانتقال الأفقي للمعلومات الوراثية ، وهذا جعل الشجرة بمثابة شبكة .

• حصول تغاير في الشفرات المتمثلة بـ Covariation theory .

• في مراحل التطور الاولى للخلايا حقيقيات النواة فان Paralogous genes حصل لها انتخاب بالتضاعف .

يستخلص مما ذكر ان الفشل في استعمال الصفات المظهرية والكيموحيوية في الاحياء يؤدي الى اللجوء الى 16S rRNA وهذا الآخر لا يسعف وفيه قصور كبير ، وكل هذا انعكس على التحيز

وعدم قابلية إيجاد صورة واضحة عن الاحياء في مراكز تجمع الاحياء فحوالي 97 % من العزلات والسلالات التي يحتفظ بها تعود الى مجاميع , Firmicutes , Actinobacteria , Bacteriodes , Proteobacteria وهذه احياء هي التي سيطرت على عمليات مهمة في علم الاحياء المجهرية .

تنوع بدائيات النواة بعيدا عن الادغال الميكروبية :

في منتصف الثمانيات اقترح ان تكون التوجهات الجزيئية هي الأساس في البحث عن الاحياء وتخطي طرق الزراعة وذلك لان كل من البكتريا والاركية لا تحوي على عدد كبير من الصفات التي تساعد في تصنيفها . ويكون ذلك باستخلاص الحوامض النووية من النماذج البيئية ويتم تحديد تواليات الـ 16S rDNA التي تعزل من بقية الحوامض النووية بالاستعانة بتقنية PCR واستعمال قطع بدء تستهدف 16S rDNA ومقارنة النتائج بتواليات معروفة وهذا يمكن ان يضع الاحياء في المكان الصحيح في شجرة التطور ويسهل تصنيفها .

ويمكن تحضير مجسات من 16S rRNA خاصة بالاحياء المستهدفة والمراد الكشف عنها لتوضيح مكانها وحجم المجموعة المستهدفة في النماذج البيئية وبمساعدة التقنيات الخاصة مثل FISH (Whole – cell fluorescence in situ hybridization) او استعمال التهجين على الأغشية .

وبتطبيق مثل هذه التوجهات وجد ان شعب وأقسام البكتريا 11 المذكورة اعلاه قد ارتفع الى 36 عام 1998 وهذه الزيادة لا تعزى فقط الى تحديد التواليات في النماذج البيئية التي ملئت أماكن كانت شاغرة في شجرة تطور الاحياء ولكن أيضا الى تحديد تواليات الاحياء التي تحتاج الى ظروف متطرفة مثل المحبات للحرارة والتي تمثل خطأ جديدا في شجرة الأحياء . كما أوضحت ان كل قسم يحوي على مجاميع وخطوط اخرى .

وعليه فان زيادة المعلومات عن تواليات 16S rRNA وجمعها من الاحياء القابلة للزرع والاخرى غير القابلة للزرع ادى الى التفكير الى ان حدود الشعب والأقسام بين الاحياء لا بد من إعادة تقييمها . ولذلك فان الاعتماد على شجرة 16S rRNA لم تحل إشكالية التصنيف وذلك يعود الى وجود علاقات اكبر من ان تحل بتحديد تواليات 16S rRNA .

استعمال البروتينات في التصنيف : بعد الدراسات أعلاه ، تم اللجوء الى الاعتماد على بروتينات معينة وتسلسل الحوامض الامينية فيها ومنها بروتينات الرايبوزومات وذلك لان الجينات هي الاساس في الكائن ولكن الأنماط الذي يظهر فيها الكائن هي المهمة وتكون الجينات جزءا منها . وهذا التوجه أشار الى وجود تقارب بين المجاميع والتي لم تظهر عند استعمال توالي الجينومات . كما ان شجرة الحياة أظهرت بعض الخطوط Lineage لا يعرف عنها سوى توزيعها البيئي مع العلم انها تظهر في الفحص المجهرى .

فمثلا الاركيا تقسم الى قسمين Euryarchaeota , Crenarchaeota اعتمادا على تواليات 16S rRNA ولكن استعمال توالي الحوامض الامينية في بروتينات الرايبوزوم اشارت الى Euryarchaeota مكونة من أقسام أخرى . وبالنسبة فان دراسة توالي الحوامض الامينية قسم الاركيا الى 18 قسم بدلا من 2 .

مشاكل الانتقال الأفقي للجينات

تم تحديد توالي جينومات بعض الاحياء المهمة من مزارع نقية وهذا بطبيعة الحال يشكل انحيازاً نحو الأقسام الأربعة المذكورة اعلاه . اضافة الى ذلك فان وضع الاحياء في شجرة الحياة اعتمادا على تواليات الجينومات يصطدم بقوة بظاهرة الانتقال الأفقي للجينات Lateral gene transfer (LGT) الذي يؤدي في بعض الاحيان وتحت ظروف الإجهاد الى تلاشي حواجز النوع (يراجع الفصل الخامس) والانتقال الأفقي يؤثر على الجينات المهمة العاملة في مجال الانتساخ والترجمة اضافة الى تأثيره على باقي الجينات مثل الجينات العاملة في مجال الايض ، ولكنه في جميع الأحوال يشكل وسيلة فاعلة في تطور كل من البكتريا والاركيا .

وظاهرة الانتقال الأفقي قد تكون خفيفة التأثير في بعض المجاميع مثل Euryarchaeota الا ان المسألة تتعد بظاهرة تضاعف الجينات او فقدها ، كما ان الطرق المستعملة لتحديد الانتقال الأفقي للجينات هي غير متناسقة مما يزيد من التعقيد .

ومثلما ذكر اعلاه ان الانتقال الأفقي قد جعل من شجرة الحياة شبكة ولكن هناك بعض النقاط الواجب الأخذ بها بنظر الاعتبار ، وهي ان البلازميدات تعد الأهم في النقل الأفقي وهي تحوي بعض الأحيان على جينات خاصة مثل المقاومة للمضادات الحيوية او السموم او قابلية استعمال مواد عضوية غير طبيعية ، مثل هذه الجينات هي التي تنتقل ولا تقوم البلازميدات بنقل الجينات الخاصة بالانتساخ او التضاعف والترجمة او جينات rRNAs . ومن هنا يتضح ان هناك حقائق حول نقل الجينات منها :

- ان جينات الانتساخ والترجمة تعد الأساس في كينونة الكائن وهويته فهي تشفر للمكانن Hardware التي تقرا الجينات للخلايا والتي يصعب استبدالها ولكنها تشفر ايضا لما يمكن تسميته بالـ Software لعمليات الايض لذلك تكون مهمة وأساسية للخلايا .

- ان ماكينات الانتساخ والترجمة لا بد ان تكون مكوناتها متداخلة بشكل كبير جدا وتشمل Chaperonins والجسيمات البروتينية الحالة و ATPases ولكن هناك بعض الشواهد التي تشير الى ان التغييرات يمكن ان تطال الجينات الأساسية في الخلايا ومنها :

- استبدال جينات إنزيم الكوثرية Bacterial – type RNAP بنوع E من النوع العائلي أثناء عملية تطور المايوتوكوندرية .

● حصول تبادل جينات عامل الاستطالة EF-G بين الخلايا حقيقية النواة وبعض الحلزونات Spirochetes .

● استبدال بعض الجينات التي تشفر لبعض بروتينات الرايبوزوم اذ يتضح ذلك من ان بروتينات الرايبوزوم من بكتريا يمكن ان تعمل في بكتريا أخرى .

● التبادل المتكرر للوحدات في الجينات التي تشفر للإنزيم Aminoacyl – tRNA synthetase والمعتقد ان جينات 16S rRNA (SSU rRNA) تكون ذات مناعة تجاه الانتقال الأفقي ولهذا استعملت في عمليات التصنيف ، ولكن هذا لا يكون مطلقا وذلك لان هذه الوحدات تكون غير متجانسة في بعض Streptomyces . ولذلك فان عملية التصنيف هي ليست مخطط طبيعي وان وضع الأحياء بشكل مصفوفات هرمية او شجرية لا يمثل الحقيقة البيولوجية .

واضافة الى النقل الأفقي هناك عوامل يمكن ان تشوش على عمليات التصنيف منها حصول الأخطاء الطبيعية في عمليات التضاعف والانتساخ وأثناء الترجمة ايضا اضافة الى وجود قطع صغيرة على الكروموسومات قابلة للتبادل .

وعلى العموم فعند الوصول الى الأفرع الثلاثة او الممالك الثلاثة تصبح عملية انتقال الجينات الأفقي صعبة ، لذلك يعتقد ان الانتقال الأفقي للجينات لا يلعب دورا مهما في تطور الأحياء حقيقية النواة المتعددة الخلايا مثل النباتات والحيوانات الحاوية على خلايا تناسلية مفردة كما هو الحال مع الأحياء الميكروبية ، اضافة الى انه لا توجد شواهد حول انتقال الأفقي في الخلايا حقيقية النواة الأحادية الخلايا . ولذا وجب تحديد توالي الجينومات لعدد كبير من الأحياء ضمن القسم الواحد او الشعبة الواحدة باتخاذ 16S rRNA كنقطة انطلاق .

زراعة الأحياء لغرض التصنيف

ذكر اعلاه ان طريقة الزراعة تؤدي الى تحيز كبير وعدم دقة في النتائج ولكن يمكن تحديد خطوط معينة Lineages او مجموعات في البيئة وانتخاب مجموعة معينة وتحضير مسابر قليلة تعدد النيوكلويتيدات خاصة بالمجموعة Group – specific oligonucleotide probes للكشف عن المجموعة في البيئة . وان كانت المعلومات عنها قليلة فلا بد من عزلها فيزيائيا وهناك عدة طرق للعزل الفيزيائي مثل تحضير النماذج والتي تصلح عندما تكون الأحياء المطلوبة هي السائدة على بقية الأحياء المجهرية . ومن طرق العزل الفيزيائي :

- طرق الترشيح والذي يعتمد فيها على حجم الخلايا . او استعمال Micromanipulator وتكون عملية العزل فيه معتمدة على حركة الخلايا المتجمعة مع بعضها بشكل قوي في خليط من الأحياء وكذلك تكون مفيدة في عزل الأحياء الكبيرة الموجودة في تراكيب مثل التراكيب الخيطية

- ويمكن استعمال الطرد المركزي المعتمد على الكثافة وفيه تعزل الخلايا اعتمادا على كثافتها الطفوية .

- أو تفصل الخلايا باستعمال Flow cytometry وهي طريقة سريعة جدا لعزل الخلايا المفردة من خليط من الخلايا .

وتزرع الخلايا المعزولة على أوساط تساعد على نموها والأفضل عدم استعمال أوساط غنية وإنما استعمال أوساط تحاكي البيئة التي كانت فيها مثل استعمال وسط لمحلل البيئة معقم بالترشيح أو استعمال طريقة الاغناء المتدرج Diffusion – gradient enrichment وهذا يساعد في تحديد الظروف المثلى لنموها مثل تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل وتركيز المواد الغذائية الملائمة أي تحديد مؤشرين أو أكثر في الوقت نفسه وتطبق هذه في الأوساط الصلبة وشبه الصلبة .

ومع هذا ان بعض الاحياء لا تنمو لأنها تحتاج الى مدة طويلة لنموها تصل الى شهرين ، واخرى لا تستطيع النمو بشكل مزروع نقي لأنها تعتمد في حياتها على علاقات مجبرة عليها مع احياء اخرى لذا لا تنمو في المختبر ، ومثل هذه لا تكون هناك وسيلة للكشف عنها الا تحديد جينومها كما في حالة *Chlamydia* أي استعمال ما يسمى بـ Metagenomics .

ويمكن تحديد جينومات الاحياء غير القابلة للزرع من الاحياء بدائية النواة باستخلاص قطع كبيرة من DNA من النماذج البيئة الحاوية عليها وتحمله على نواقل تتحمل قطع كبيرة مثل الكوزميدات التي يمكن ان تحمل 35 – 40 كيلو قاعدة او استعمال كروموسومات البكتريا الصناعية BACs التي تحمل قطع بحدود 200 كيلو قاعدة وهذه القطع تمثل مجموعة من الجينات المتجاورة في كروموسومات الأحياء الموجودة في البيئة ويمكن تحديد توالي القواعد باستعمال طريقة Chromosome walking او طريقة Shot gun او أي طريقة اخرى وتفحص بمقارنتها بتواليات احياء معروفة . ويتم تحديد تواليات قطع من الكروموسومات من الاحياء غير القابلة للزرع وذلك لان تحديد كروموسوم كامل يكون مهمة صعبة جدا خاصة وان البيئات مثل التربة تحوي العديد من الاحياء ويمكن ان تحوي الآلاف الجينومات .

الاختلاط بين الاحياء حقيقية النواة والاحياء بدائية النواة

أسفرت نتائج دراسة 16S rRNA وتوالي الحوامض الامينية في البروتينات الى وجود تقارب بين الاركيا وحقيقيات النواة اكثر من تقارب الأولى مع البكتريا (كما ذكر سابقا) .

ومن جهة ثانية فهناك العديد من الشواهد تشير الى ان الماييتوكوندريا هي أحياء بدائية النواة تطفلت داخل حقيقية النواة وحصل الاختلاط ، وانتقلت بعض الجينات القليلة من الماييتوكوندريا الى نواة الخلية المضيفة . ونواتج الجينات المنتقلة ترتبط بتواليات لسلاسل قاندة تؤدي الى الرجوع الى الماييتوكوندريا لأداء وظيفتها الأصلية . وقد وجد ان بعض إنزيمات السائل الخلوي في الخلايا حقيقية

النواة هي ذات أصل بكتري وليس من الاركيا كما متوقع . كل هذه أدت الى الاختلاط وصعبت الطريق أمام اللذين يحاولون إجراء عمليات التحسين الوراثي خاصة في الميكروبات حقيقية النواة او استهداف عضياتها مثل المايتوكوندريا او البلاستيدات .

حلول البحث : بعد الخوض بملاسات التصنيف وتداخل الاحياء فيما بينها ليس على مستوى الأنواع والأجناس وإنما حتى على مستوى الممالك ، لذلك فمن الافضل البحث واجراء المسح والتحري عن فعالية مطلوبة او صفة مميزة في مجموعة من الاحياء وهذا يؤدي الى :

- استكشاف البيئات غير الطبيعية وأنظمة بيئية التي لم تستغل مسبقا . هذه تمثل وسيلة مهمة جدا اذ تبعد عن التكرار فمثلا الاحياء البحرية الموجودة في مناطق مختلفة او بيئات بحرية مختلفة وتعرض لظروف مختلفة التي تتفاعل مع أنظمتها الوراثية والحيوية على مدى أزمان طويلة يستبعد ان تكون مشابهة للأنظمة الموجودة على الأرض وذلك لاختلاف الظروف تماما والتي تؤدي الى نشو مسارات ومسالك تختلف عن غيرها .

- التأكيد على العزلات الجديدة من المجاميع التصنيفية المهملة .
- الرجوع الى ما موجود من المعلومات حول المادة المطلوبة من حيث طبيعتها الكيماوية وغيرها من المعلومات مثل المضادات الحيوية والدهون وحوامضها الدهنية غير المشبعة .
- استعمال طرق المسح السريعة High-throughput screens .
- استعمال المضايغ المستعارة او البديلة Surrogate hosts or cells للكشف السريع عن تأثير المواد المحتمل على جسم الكائن الحي .

وقد كانت ولا زالت التقنية الحيوية تضخ بمنتجاتها في العديد من المجالات مثل استمرار ضخ الأدوية الجديدة وحماية المحاصيل وزيادة القيمة الغذائية للأغذية وللأعلاف ، وقدمت مساعدات التفاعلات الحيوية في معالجة البيئة ، وربما أكثر المشاركات كانت من استخدام الإنزيمات العاملة في ظروف متطرفة Extremoenzymes مثل الانزيمات العاملة بدرجات حرارية عالية Thermozymes والتي توجد في الاركيا والبكتريا المحبة للحرارة خاصة المجموعة Hyperthermophiles لذلك فان مجموعة المتطرفات Extremophiles من الاركيا والبكتريا تمثل مصادر جيدة جديدة لعمليات التقنية الحيوية .

إذن فان الصفة المميزة للكائن الحي تعد الأساس في عملية البحث عن المواد الطبيعية الجديدة ولا أهمية للموقع التصنيفي ، وهذا يعني عدم إمكانية إعادة عزل الاحياء نفسها أي تجنب عزل أنواع متماثلة او سلالات متماثلة من الأحياء المجهرية وإعادة استكشاف المواد نفسها .

ومن اهم الانجازات في هذا المجال عزل وتشخيص *Thermotoga maritima* وهي تنمو بدرجة حرارة 65 – 90° م وبحرارة مثلى 80° م أي من محبات الحرارة بشكل متطرف وتسميتها

تعود الى وجود تركيب toga في غلاف الخلية الخارجي وقد عزلت عام 1986 وتم تحديد توالي قواعد جينومها عام 1999 ومرة اخرى تشير دراسة هذا الكائن الى مشكلة الانتقال الأفقي للجينات وهناك 46 % من الجينات غير معروفة الوظيفة . ويحوي الجينوم جينات من الاركيا تسمى Archeal islands تتجمع في 15 منطقة من الكروموسوم تمتد على مسافة 4 – 20 كيلو قاعدة . والكائن يعيش في البيئة مع مولدات الميثان وعند تنميتها في المخمرات تنمو بشكل حبل على جدار المخمر ويمكن ان تنمو بشكل أغشية حيوية التي يتم فيها التعبير عن جينات الصدمة الحرارية التي تكون حاوية على المعادن Metallochaperones وبطبيعة الحال يختلف نمو وفعالية الخلايا الهائمة او العالقة عن الخلايا المقيمة في الحبل الذي تكونه او الأغشية الحيوية . وأنزيماتها جاذبة للاهتمام بشكل كبير في التقنيات الحيوية ومن أهم أنزيماتها Glycoside hydrolases مثل α – galactosidase , Mannanase , β – mannosidase لتكسير مكوثرات صمغ الكوار Guar gum المستعمل في تجزئة المنتجات النفطية وكذلك في الصناعات الغذائية . ، وتحوي على إنزيمات تستعمل في معالجة منتجات الصويا وكذلك تستعمل إنزيمات الانقلاب Invertase في صناعة السكر ، وأخرى تستعمل في صناعة الورق Xylanases وتحوي على إنزيمات لصناعة وتحضير المحليات الصناعية مثل D – tagatose .

المحور الثالث : معالجة الاخفاقات واستنباط طرق جديدة للتطوير

معالجة الفشل الذي واجهته بعض جوانب التقنية الحيوية

بدأت عمليات التقنية الحيوية باستعمال الأحياء الطبيعية ثم المحورة وراثيا ولكن عددا من العمليات لاقت الإخفاق ، ولذلك كان لابد من دراسة الشبكة الايضية للأحياء المستعملة لان مثل هذه الحالات ستواجه الأحياء الجديدة التي ستضخ للاستعمال الحيوي وخاصة الأحياء التي تهندس لإنتاج مواد غريبة عنها فمثل هذه الأحياء ستقاوم الوضع الغريب عليها وربما سارت الى طريق الانتحار وعليه فان دراسة الشبكة تعد ضرورية .

وفي الخلايا توجد شبكات تنظيم عامة Global regulatory networks وهذه يسيطر عليها بمنظم عام Regulon لذلك فهي تستجيب بنمط ما يتناسب مع التغيرات في الظروف البيئية التي توجد فيها وتوجد منها أنواع :

- اوبرونات الكبح والتنشيط لعمليات الهدم وفيها تتأثر الفعاليات بالتغيرات الحاصلة في تركيز cAMP والذي يؤدي الى التأثير على عدد من فعاليات اوبرونات الهدم كما في تنظيم اوبرون اللاكتوز .

- استبدال العوامل سيكما وهو الذي يعمل بشكل واضح في عملية التبوغ (يراجع الفصل الخامس) فعند شعور الخلايا بعدم ملائمة الظروف الخارجية فإن العامل سيكما الخاص بالنمو الخضري للإنزيم RNAP يستبدل بعوامل أخرى خاصة بالتبوغ لتبدأ فعاليات جديدة .
- تكوين عوامل المجاعة وتحصل عند انخفاض تركيز الحوامض الامينية بشكل خطير ، فالعديد من الخلايا تدخل الى استجابة المجاعة لتتلاءم مع نقص الحوامض الامينية ، وتكوين عامل المجاعة الذي يجعل الخلايا تراكم ppGpp والتي تقوم بدورها بتقليل عمليات تخليق tRNA , rRNA ، ويتم تكسير بعض البروتينات لسد النقص الحاصل في الحوامض الامينية إضافة الى تحفيز تخليق بعض الحوامض الامينية لسد النقص الحاصل . وعندما تصل تراكيز الحوامض الامينية إلى مستويات مقبولة يقوم ناتج الجين *spoT* بتفكيك ppGpp وتعود الخلايا الى طبيعتها .
- مسارات نقل الإشارات وهي أنظمة تستجيب للعديد من التغيرات البيئية من خلال فسفرة البروتينات . فجزئيات التحسس تكشف او تتحسس للتغيرات الحاصلة خارج الخلايا مثل نقص النتروجين او الفسفور او ارتفاع الضغط التناظفي او غيرها من المؤشرات فتقوم بفسفرة بروتينات منفذة وهذه تقوم بعمليات تنشيط انتساخ Regulon الذي ينظم الاستجابة مثل حركة البكتريا او غيرها من التفاعلات الحيوية .

وبما ان السيطرة الوراثية هي المعول عليها في تفاعلات وتغيير الخلايا ، لذلك كانت دراستها مهمة جدا ، فعمليات تنظيم التعبير الوراثي يمكن ان تستغل في المراحل الأولى من إجراء التغييرات الوراثية الى النمط المطلوب ثم إمكانية تثبيت النمط في الأحياء لاستعمالها في الإنتاج ومن أهم الإمكانات في السيطرة هو نظام الإصلاح (Mismatch repair) MMR (يراجع الفصل السادس) .

ويمكن باستعمال التطور التجريبي او المباشر او ما يسمى بالتطوير الموجه للحصول على الإنزيمات ذات الطبيعة الملائمة للعمليات الإنتاجية الصناعية او تطبيقات أخرى مثل خدمة الصناعات الصيدلانية ، كما يمكن إعداد أحياء وفق الرغبة ، وهذا يعني إحداث تغييرات في DNA ومن أهم الآليات التي تؤثر على تطور DNA هو نظام الإصلاح MMR (الذي ذكرت بعض التفاصيل عنه سابقا) .

نظام الإصلاح MMR

نظام يتكون من عدة جينات ونواتجها من البروتينات التي تسيطر على ثباتية جينوم الأحياء ويوجد في الأحياء من البكتريا الى الإنسان ، والنظام يحافظ على سلامة الجينوم وذلك بواسطة :

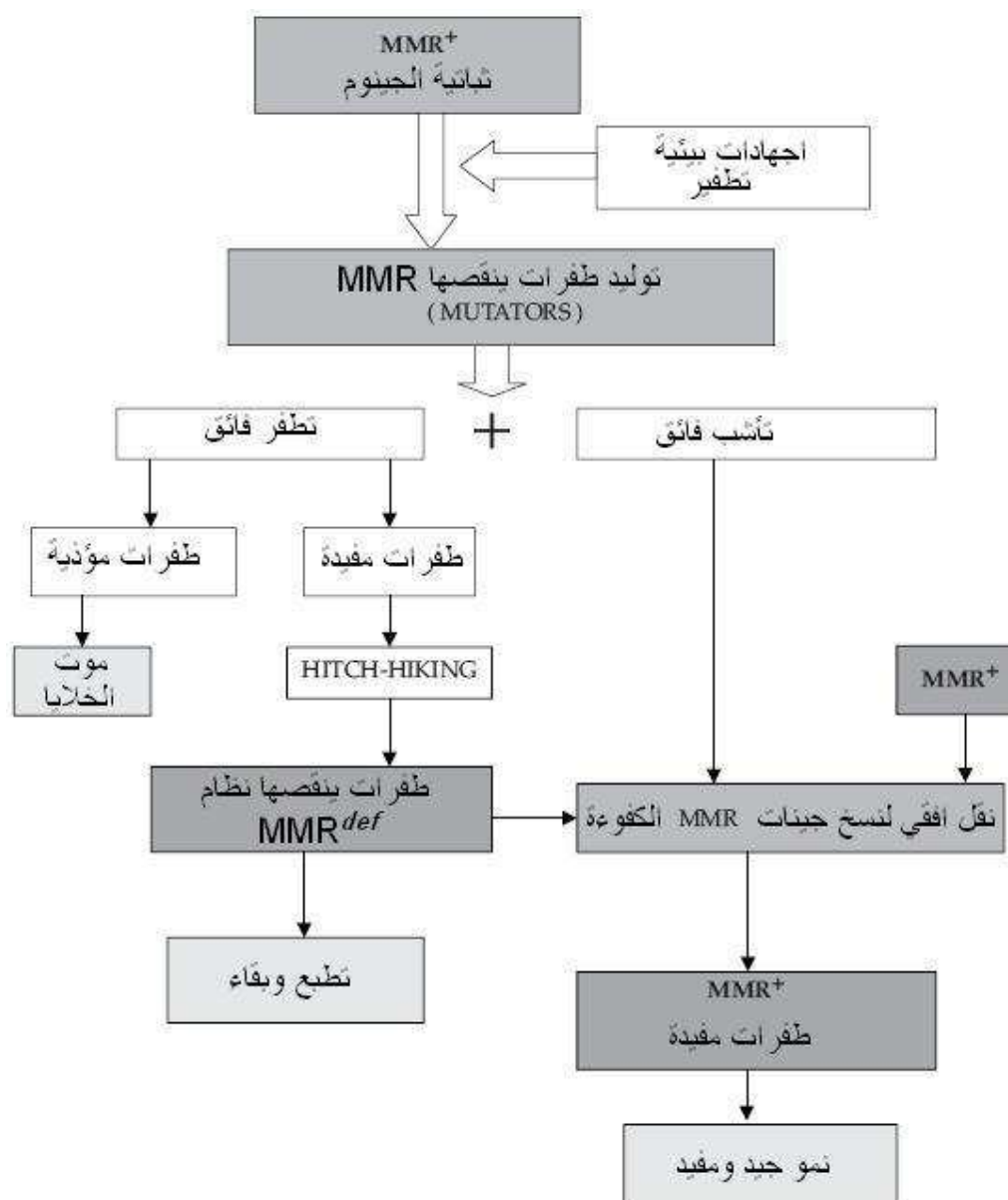
- تصحيح الأخطاء أثناء عملية التضاعف .
- منع التأشب الوراثي بين قطع DNA متباعدة الأصول .

وتنبيطه يؤدي الى قابلية توارث الأحياء للتطفر أي تصبح Mutators ويعني زيادة معدل الطفرات التي يكون أكثرها مؤذيا للمجموع البكتيري مثلا ، ولكن بعضها مفيد ويساعد الخلايا للعيش تحت الاجهادات البيئية . وعند اعتدال الظروف تفقد الخلايا المتطفرة فائدتها لتجمع الطفرات والتغيرات المؤذية فيها . ولذلك فان السلالات ذات الطفرات المفيدة يمكن ان تعيش باستلام واستعمال نسخ من MMR من الخلايا ذات النمط الطبيعي عن طريق الانتقال الطبيعي الأفقي وتأشبه مع جينومها ، لذلك يمكن ان تستغل هذه الظاهرة لتثبيت الصفات المطلوبة في الخلايا بعد تعريضها للاجهادات وحصول التغيرات فيها وفق المخطط الآتي شكل (83) .

وأثناء التطور فان MMR يمكن ان يفقد ويستعاد بعمليات النقل الأفقي وهذا أدى الى إعطاء التركيب الموزائكي لجيناته وهذه الموزائكية هي المظهر الملفت في عمليات التطور والتي تعني التغير في نسخ او اليلات جينات الاستجابة للانتخاب الطبيعي الذي يؤثر على عمليات إصلاح DNA وعمليات التطور الدقيقة Microevolution المهمة للتقنية الحيوية . اذ تطورت تقنيات جديدة للإسراع في عمليات التطور الوراثي داخل المضيف او الخلية وقد استخدمت مع الاحياء المجهرية او النباتات او حيوانات لإنتاج أحفاد مختلفة عن الآباء وملائمة لعمليات التصنيع الحيوي والاستخدامات المتطورة في المجالات الزراعية والصيدلانية وغيرها .

وهذه التقنيات ساعدت وتساعد في إيجاد أحياء بصفات جديدة التي يمكن ان تستعمل مباشرة في التطبيقات التجارية دون اللجوء الى العمليات المطولة من عزل الجين وتوصيفه ثم كلونته الى مضيف ملائم . وقد استخدمت شركات التقنية الحيوية طريقة التطوير المباشر او الموجه في داخل وخارج الكائن الحي للحصول على إنزيمات او مواد بمواصفات محددة . وفي المختبر تتم عملية التطوير السريع الطبيعي في أنبوبة الاختبار باستعمال التطهير الدوري والمسح وترك عملية التأشب للحدوث . اما التطوير الموجه داخل الأنظمة الحية هو إنتاج التنوع في المضيف بالاعتماد على نظام MMR ودوره في تأشب قطع DNA من أصول بعيدة مؤديا الى ارتفاع معدل الطفرات ونشؤ التغيرات . وهذه الطريقة سهلة وسريعة للسماح للجينات البعيدة للتأشب مع الجينومات ، او تأشب الجينومات مع بعضها مما يسمح بزيادة التنوع الوراثي وزيادة المواد الحيوية الجديدة ، اذ يؤدي اختلاط المواد الوراثية الى إحداث تنوع وتغير في المسارات الايضية دون الحاجة الى معرفة الجينات المشتركة .

لذلك يستفاد من التطوير التجريبي بانجازه تحت ظروف محددة وقابلة للإعادة وهذه تتم تحت ظروف في أنظمة مغلقة باستعمال البكتيريا كنموذج . لان المزروع البكتيري يمثل مجموع كبير من الخلايا تنمو في وقت قصير جدا يسهل الملاحظات المباشرة لعمليات التطور التي حدثت في الطبيعة واحتاجت الى وقت طويل .



شكل 83 : اشتراك نظام MMR في الحصول على سلالات وطفرات مفيدة بعد التعرض للاجهادات

آليات التطبع للتطهير في البكتريا

تتعرض البكتريا الى العديد من الاجهادات البيئية والظروف غير المناسبة لذلك كان التنوع الوراثي لها عملية ضرورية لنجاح بقاءها وتطورها . ويعتمد هذا على إمكانية او سعة إنتاج التنوع في الجينوم . والتطور الحيوي ينتج من التغييرات في المكونات الوراثية للأنواع ، وينتج التنوع الوراثي عن :

• الطفرات .

• التأشب مع DNA غريب .

ولذلك كان حدوث الطفرات ضروريا لتطور الأحياء ، والطفرات التلقائية تحدث عند عدم انضباط عمليات التضاعف وتنتج أبناء تختلف عن الآباء كما يحصل في طور الاستقرار . ومعظم الطفرات التلقائية تكون مؤذية للخلايا لذلك يتم المحافظة على حدوثها عند أوطأ معدل ممكن فمثلا في *E. coli* يكون تكرارها 5×10^{-10} / زوج قاعدة / جيل . ونقصان معدلاتها يعود الى وجود عدة آليات وراثية تساعد في انسياب عمليات التضاعف بشكل صحيح للحفاظ على المعلومات الوراثية ، ومنها إنزيمات تصحيح الخطأ في تضاعف DNA إضافة الى آليات أخرى منها :

• توازن وتصحيح النيوكليوتيدات قبل إدماجها في DNA .

• فعالية التصحيح في إنزيمات التضاعف Proof-reading activity of DNAPs

لضمان دخول النيوكليوتيدات في المكان الصحيح .

• وجود آليات وعمليات تقوم بإصلاح الأخطاء الناتجة عن التضاعف .

ونظام MMR من الأنظمة التي تعمل بعد انتهاء عملية التضاعف ، والعطب فيه يؤدي الى زيادة معدل حدوث الطفرات أي وجود Mutators التي تكون ذات قابلية عالية للتطفر أكثر من الأنماط الطبيعية وهي موجودة في المجاميع الطبيعية ولكن بمستوى منخفض جدا .

اما وجود Transient mutators يعني زيادة معدل الطفرات اعتمادا على الظروف المحيطة وعند عودة الظروف الى الحالة الطبيعية تعود Mutators الى الوضع الطبيعي . اما حالة وجود التطفر المفرط او الفائق Hypermutability فهي يمكن ان تحدث نتيجة لأخطاء في فعالية الإنزيم DNAP والتي تستهدف ضرر معين حاصل في DNA وقد تحدث بدون ضرر .

لذلك فان آلية حدث الطفرات تحت الاجهادات تكون مختلفة . فهناك العديد من الأنظمة الإنزيمية التي تستجيب لظروف الإجهاد وتضرر DNA ومنها حصول الإجهاد التأكسدي او بواسطة المواد المؤكسدة Alkylating agents او الأضرار الضوئية السامة Phototoxic ، او الحرارة ، او المجاعة وغيرها من الاجهادات ، كل هذه تؤدي الى حدوث الطفرات لذلك تظهر على المجموع ما يسمى بحالة التطبع للتطفر Adaptation mutagenesis التي يشارك فيها *mutL* لتخفيف او تلطيف تأثير الظروف .

والاستجابة التي تحصل نتيجة لتضرر DNA هي استجابة الاستغاثة SOS وهي التي تفتح كبح جينات Mutator genes الموجودة في الخلايا وهي *umuC* , *umuD* , *dinB* وكذلك تحفز استجابة الاستغاثة عددا من جينات التأشب منها *recA* , *recN* , *recQ* , *ruvB* كل هذه تفتح عندما تعاني الخلايا من التسمم الوراثي او الإجهاد الايضي (يراجع الفصل الثالث / شكل 25) . ولكن عند

عودة الظروف الى الحالة الطبيعية يتم كبح هذه الجينات بواسطة الكابح *lexA* ، لذلك تكون وظيفة نظام الاستغاثة هو لتشخيص وتحديد فعالية عددا من الإنزيمات المؤدية الى توليد الطفرات وهي DNA mutases .

ومن هنا كان حدوث الطفرات ضروريا لعملية التطور وثبوت الطفرات يحدث عند تلف نظام MMR ، كما ان حدوث الطفرات ومعدلاتها يعتمد على الجزء المتضرر من نظام MMR فتوجد بعض الطفرات فيه تؤدي الى زيادة معدل الطفرات في الخلايا بمعدل متوسط لا يزيد عن 10 أضعاف ولكن توجد طفرات تؤدي الى زيادة المعدل الى 100 – 1000 مرة كما في طفرات جين *mutS* .

ويمكن ان يعمل MMR بطرق مختلفة ، ففي *E. coli* يوجد مسار يحرك MMR بعملية المثيلة Methyl-directed MMR وهو يعمل على تصحيح أخطاء التضاعف بإزالة النيوكليوتيدات غير المزدوجة او غير الصحيحة من أشرطة DNA المخلقة حديثا . ويعمل النظام عند عدم وجود تطابق القواعد في الحلزونات المتباينة Heteroduplexes التي تتكون أثناء عملية التأشب وعملية تحول الجينات Gene conversion ، وكذلك يعمل عند حصول عدم التطابق الناتج من إزالة مجموعة الأمين من القاعدة النتروجينية السائتوزين .

آلية التصحيح بـ MMR : وهذه تتم بخطوات

- التعرف على مكان الخطأ وتتم بواسطة البروتين *mutS* بتفاعل يحتاج الى الطاقة التي تأتي من تحلل ATP أي بتكوين معقد مع DNA .

- قص منطقة الضرر وتتم بواسطة البروتين *mutL* الذي يتداخل مع المعقد المتكون في الخطوة الأولى ويساعد في ذلك *mutH* .

ويتم تمييز الشريط الجديد الذي فيه الخطأ من وجود مجموعة المثل على الأدينين في مواقع التواليات GATC والتي تحصل لجعل المنطق مستهدفة للإصلاح . وتكون مستهدفة للإصلاح بالاعتماد على فعالية ناتج الجين *dam* وبذلك يتم التخلص من القطعة الجديدة التي لا تحوي على المثل والتي يوجد فيها الخطأ .

- تقوم الإنزيمات والبروتينات الخاصة مثل DNAP III والبروتينات التي ترتبط بالأشرطة المفردة SSB بمليء المنطقة التي حصل فيها القص .

وبما ان هناك عدد من الجينات من النظام *mut* فالنظام يسمى MuthLS .

وبالإضافة الى وظيفة النظام في السيطرة على دقة تضاعف DNA فانه يسيطر كذلك على عمليات التأشب ، فبروتيناته تميز عدم انطباق القواعد النتروجينية في DNA وتؤدي الى منع التأشب بين أنواع مختلفة من DNA أي انه من المثبطات القوية لالتحام قطع DNA غير المتماثلة ، وبذا فان تعطيله يزيد من حدوث الطفرات ويزيد من النقل الأفقي للجينات بين الأنواع المختلفة .

الحصول على MMR mutators

ان Mutators موجودة في المجاميع البكتيرية الطبيعية كما في الممرضات الناجحة او البكتريا المتعايشة وكذلك توجد في المزارع المختبرية التي تعيش مدة طويلة على أوساط مختبرية في ظروف المختبر ، وأكثر الخلايا المتطفرة Mutators هي مصابة بنظام MMR فمثلا يوجد منها 1 % في خلايا *E. coli* و البكتريا *Sal. enterica* في حين يصل مستواها الى 10 % في خلايا *Ps. aeruginosa* الموجودة في مرضى التحوصل الليفى ، لذلك فهناك علاقة وثيقة بين حالة وجود التطفر الفائق وتطور المقاومة للمضادات الحيوية في الأحياء الممرضة ويمكن لهذه الصفة الانتشار لان الخلايا التي تحملها تكون ناجحة في البيئة التي تكثر فيها المضادات الحيوية وتسود بشكل أكثر من الأحياء الطبيعية .

ولكن في الحالات الطبيعية تكون هناك حواجز بين الاحياء تمنع من انتقال المواد الوراثية ومنها :

- اختلاف الجينومات وتوالياتها اذ تقل عملية التآشب كلما زاد الابتعاد بين الأحياء وهذا يعود الى تأثير MMR .

- استجابة الاستغاثة تزيد من معدل التنوع وحدوث الطفرات .

ويمكن للتغيرات التي تحصل ان تثبت بإدخال MMR سليم وهو بهذه الحالة يكون قد جمع العديد من التغيرات وأصبح موزائكي التركيب .

في خميرة الخبز يكون الجين *MSH2* يقابل *MutS* في البكتريا ، ويكون مسئولاً عن حدوث الطفرات ولذلك تكون الطفرات كثيرة في طور الاستقرار لأنها تزيد عن قابلية وإمكانية الإصلاحات التي يقوم بها نظام MMR .

وما ذكر أعلاه عن التفاعلات الجزيئية وتأثيرات نظام MMR يمكن ان يستغل بشكل كبير في التقنيات الحيوية الإنتاجية وكذلك عند هندسة الخلايا لان الأخيرة أي هندسة الخلايا تؤدي الى حدوث إجهاد على الخلايا (يراجع الفصل السابع) وبالتالي يمكن ان تؤدي الى نتائج عكسية ما لم تتخذ الإجراءات اللازمة .

المراجع

المستعملة وأخرى للمطالعة

References

A

- Abed , R . , Safi , N . , Koster, J., Beer, D . , El-Nahhal, Y. Rullkotter, J. & Garcia-Pichel, F. 2002. Microbial diversity of heavy polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds . Appl. Environ. Microbiol. **68** : 1674-1683 .
- Abedl-El-Haleem , D. 2003 . *Acinetobacter* : environmental and biotechnological applications . African J. Biotechnol. **2** : 71 -74 .
- Acevedo, F. 2000 .The use of reactors in biomining processes . J. Biotechnol. **3** : 1 – 12 .
- Albanese , A . , Bentivoglio , A. , Cassetta , E. , Viggiano , A . , Maria , G. & Gui , D . 1995 . The use of botulinum toxin in the alimentary tract . Aliment . Pharmacol . **9** : 599 – 604 .
- Alberto , J. , Marcario , L . & Marcario , E. 1999 . The archaeal molecular chaperone machine: peculiarities and paradoxes . Genetics **152** : 1277 – 1283 .
- Alexander , G. & Zhulin , I . 2001 More than one way to sense chemicals . J. Bacteriol. **183** : 4681 – 4686.
- Allison , M . & Cook , H . 1981 . Oxalate degradation by microbes of the large bowel of herbivores : the effect of dietary oxalate . Science **212** : 675 – 676 .
- Altomare , C . , Norvell m W . m Bjokman m T . & Harman , G . 1999 . Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant – growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rafai . Appl . Environ . Microbiol . **65** : 2926 – 2933 .
- Anderson , A . & Dawes , E . 1990 . Occurrence , metabolism , metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates . Microbiol . Rev. **54** : 450 – 472 .
- Antonio , O. 2005 . Hyperaccumulation in natural bacterial populations : consequence for medical microbiology . Rev. Med. Microbiol. **16** : 25 - 32.
- Ari , R. 1985 . SOS system . Biochimie **67** : 343 - 347 .
- Aso , Y. Akaza, H. , Kotake, T. , Tsukamaoto, T. , Imai , K. & Naito, S. 1995. Prevention effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in double - blind trial . Eur . Urol . **27** : 104 -109.
- Atlas , R . 1993 . Bacteria and bioremediation of marine oil – spill . Oceanus **36** : 71 – 81 .
- Au , N. , Kuester-Schoech , E . , Mandavo, V. , Bothwell, L. , Canny , S. , Chachu, K. , Colavito, S. , Fuller, S., Groban, E. , Hensly , L . , O'Brien , T. , Shah , A . , Tierney , J. , Tomn , L . , O'Gara , T. , Goranov , A . , Grossman , A . & Lovett , C. 2005 .

Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system . J. Bacteriol . **187** : 7655 -7666.

- Ayebo. A. , Shahani, K. , Dan, R. & Friend , B. 1982 . Ion exchange separation of the antitumor component (s) of yogurt dialyzate . J. Dairy Sci . **65** : 2388 - 2390 .
- Azaizeh, H. , Gowthaman , S. & Terry , N. 1997 . Microbial selenium volatilization in rhizosphere and bulk soils from a constructed wetland . J . Environ . Qual . **26** : 666 - 672 .

B

- Baath , E. , Frostegard, A. & Fritze , H. 1992 . Soil bacterial biomass , activity , phospholipids fatty acid pattern , and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition . Appl. Environ . Microbiol . **58** : 4026 - 4031 .
- Bains , W . 1998 . Biotechnology from A to Z . Oxford University Press . UK .
- Banat , I . 1995 . Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal , state of the art . Acta Biotechnol . **15** : 251 – 267 .
- Banerjee, A . , Sharma , R . , Chisti , Y. & Banerjee , U . 2002 . *Botryococcus braunii* renewable source of hydrocarbons and other chemicals . Crit . Rev. Biotechnol . **22** : 245 -279 .
- Baneyx , F, 2004 . Keeping up with protein folding . Microbial . Cell Factories **3** : 1- 2 .
- Banuelos , G . , Ajwa , H . , Mackey , B . , Wu , L . Cook , C . , Akohoue , S . & Zambruzuski , S. 1997 . Evaluation of different plant - species used in phytoremediation of high soil selenium . J. Environ . Qual . **26** : 639 - 646 .
- Banuelos , G. , Ajwa , H . , Terry , N . & Zayed , A . 1997 . Phytoremediation of selenium laden soils : a new technology . J. Environ. Qual. **26** : 426 -430 .
- Banuelos , G. , Ajwa, H. , Wu , L . , Guo , X . , Akohoue , S. & Zambruzuski , S . 1997 . Selenium – induced growth reduction in brassica land races considered for phytoremediation . Ecotox . Environ Saf . **36** : 282 -287 .
- Banuett , F. 1998 . Signaling in the yeasts : An informational cascade with links to the filamentous fungi . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **62** : 249 - 274 .
- Bartha , R . 1986 . Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation . Microbiol . Ecol . **12** : 155 – 161 .
- Baum , J . , Kakefuda , M . & Gawron – Burke , G. 1996 . Engineering *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides with an

indigenous site-specific recombination system . Appl . Environ . Microbiol . **62** : 4367 - 4373 .

- Becker , E . 1988 . Micro – algae for Human and Animal Consumption . In " Microalgae Biotechnology " Eds. M . Borowitzka and L . Borowitzka . Cambridge Univ . Press : Cambridge .
- Begley , M . , Hill , C. & Gahan , C. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. Appl . Environ . Microbiol . **72** :1729 -1738.
- Belem , . M. , Gibbs , B . & Lee , B . 1999 . Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites . J . Dairy Sci . **82** : 486 – 493 .
- Belkum , A . , Schreure , S. , Alphen , L . & Verbrugh , H . 1998 . Short – sequence DNA repeats in prokaryotic genome . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **62** : 275 -293 .
- Bellamy , W . , Takase , M . , Yamauchi , K . , Kawase , K . , Shimamura , S . & Tomita , M . 1992 . Antibacterial spectrum of lactoferricin B , a potent antimicrobial peptide derived from the N - terminal region of bovine lactoferrin . Blochim . Biophys . Acta . **1121** : 130 – 136 .
- Bellamy , W . , Wakayashi , H . , Takase , M . , & Tomita , M . 1993 : Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B , a potent antimicrobial peptide derived from the N - terminal region of bovine lactoferrin . Med . Microbiol . Immunol . **182** : 97 – 105 .
- Bellamy , W . , Yamauchi , K . , Wakayashi , H . , Takase , M . , Shimamura , S . & Tomita , M . 1994 . Antifungal properties of lactoferricin , a peptide derived from the N - terminal region of bovine lactoferrin . Lett . Appl . Microbiol . **18** : 230 - 233 .
- Benhar , I . 2001 . Biotechnological applications of phage and cell display . Biotechnol . Adv . **19** : 1 – 33 .
- Biffi , A . , Coradin , D . , Larsen , R . , Riva , L . & Fronzon , G . 1997. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of human breast cancer cell line . Nutr . Cancer. **28** : 93 - 99.
- Bochner , B . , Lee , P . , Wilson , S . , Cutler , C . & Ames , B . 1984 . AppppA and related adenylylated nucleotides are synthesized as consequence of oxidation stress . Cell **37** : 225 – 232 .
- Bolton , G . Nester , E . & Gorgon , M . 1986 . Plant phenolic compounds induced expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence . Science **232** : 983 - 985 .
- Bongaerts , G . , Severijnen , R . , Tangerman , A . , Verrips , A . & Tolboom , J . 2000. Bile salt deconjugation by lactobacilli and its

effects in patients with short small bowel . J. Gastroenterol. **35** : 801 – 804 .

- Boon , M . 2001 . The oxidation of sulphide minerals. Hydrometallurgy **62** : 67 – 70 .
- Borowitzka , M . 1986 . Micro - algae as a sources of fine chemicals . Microbiol . Sci . **3** : 372 - 375 .
- Borowitzka , M . 1988 . Vitamins and Fine Chemicals from Micro – algae . In " Microalgae Biotechnology ' Eds. M . Borowitzka and L . Borowitzka . Cambridge Univ . Press : Cambridge .
- Borowitzka , M . 1988 . Oils and Hydrocarbons . In " Microaldae Biotechnology ' Eds. M . Borowitzka and L . Borowitzka . Cambridge Univ . Press : Cambridge .
- Borowitzka , M . 1995 . Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds . J . Appl . Phycol . **7** : 3 – 15 .
- Brantl , V . 1984 . Novel opioid peptides derived from human beta – casein : human beta – casomorphins . Eur . J . Pharmacol . **106** : 213 – 214 .
- Bridges , B . & Brown , G . 1992 . Mutagenic DNA repair in *Escherichia coli* . XXI . A stable SOS – inducing signal persisting after excision repair of ultraviolet damage . Mut . Res . **16** : 135 – 144 .
- Brim , H . , Venkatesworn , A . , Kostandarithes , H . , Fredrickson , J . & Daly M . 2003 . Engineering *Deinococcus geothermalis* for bioremediation of high – temperature radioactive waste environments . Appl . Environ . Microbiol . **69** : 4575 - 4582 .
- Brooks , G , Butel , J. & Mores , S . 2004 . Jawetz , Melnick , Adelberg's Medical Microbiology . 23rd Edition . McGraw Hill : Boston , New York .
- Brooks , G . & Roberts , T . 1999 . Pesticides Chemistry and Bioscience . Royal Science of Chemistry . Cambridge , UK .
- Brot , N . & Weissbach , H . 1983 . Biochemistry and physiological role of methionine sulfoxide residues in proteins . Arch . Biochem . Biophys . **223** : 271 – 281 .
- Brown , M . , Mular , M . , Miller , I . , Farmer , C . & Trenerry , C . 1999 . The vitamin content of microalgae used in aquaculture . J . Appl . Phycol . **11** : 247 – 255 .
- Bukau , B . , Weissman , J . & Horwich , A . 2006 . Molecular chaperones and protein quality and control . Cell **125** : 443 – 451 .
- Bull , A . , Ward , A . & Goodfellow , M . 2000 . Search and discovery strategies for biotechnology the paradigm shift . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **64** : 573 – 606 .

C

- Cadieux , P . , Burton , J . , Gardiner , G . , Braunstein , I . , Bruce , A . , Kaug , C. & Reid , G . 2002 . *Lactobacillus* strains and vaginal ecology . JAMA . **287** : 1940 – 1941 .
- Campo , J . , Garcia - Gonzalez , M . & Guerrero , M . 2007 . Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production : current state and perspective . Appl . Microbiol . Biotechnol .
- Casadevall , E . Dif , D . , Largean , C . , Gudin , C . , Chaumont , D . & Desanti , O . 1985 . Studies on batch and continuous culture of *Botryococcus braunii* : Hydrocarbon production in relation to physiological state , cell ultra structure and phosphate nutrition . Biotechnol . Bioeng . **27** : 286 - 295 .
- Castagliolo , I . , Riegler , M . , Valenick , L . , LaMont , J. & Pothoulaskis , C. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effect of *Clostridium difficile* toxin A and B in human colonic mucosa . Infect . Imm . **67** : 302 - 307.
- Chahance , B . Jolles , P . Izquierdo , C . , Mazoyer , E . , Francoul , C . , Drouet , L . & Fiat , A . 1995 . Characterization of an antithrombic peptide from kappa – casein in newborn plasma after milk ingestion . Br. J . Nutr . **78** : 583 – 590 .
- Chatterjee , M . , Khalawan , S . & Curran , B. 2000 . cellular lipid composition influence stress activation of the yeast general stress response element (STRE) . Microbiology **146** : 877 - 884 .
- Chen , D. Toone , W. , Mata , J . , Lyne , R . , Burns , G . , Kivinen , K . Brazma , A . Jones , N . & Bahler , J . 2002 . Global transcriptional response of fission yeast to environmental stress . Mol . Biol . Cell . **14** : 214 – 229 .
- Chen , G . , Konig , K . & Lafferty , R . 1991 . Occurrence of poly – D (–) – 3 – hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus* . FEMS Microbiol . **84** : 173 – 176 .
- Chen , H . Fujita , M . , Feng , Q . , Clardy , J . & Fink , G . 2004 . Tyrosol is quorum sensing molecule in *Candida albicans* . Proc . Natl . Acad . Sci . **101** : 5048 – 5052 .
- Chiba , H . Tani , F . & Yoshikawa , M . 1989 . Opioid antagonist peptides derived from kappa – casein . J . Dairy Sci . **56** : 363 – 366 .
- Christensen , H . , Frokiaer , H . & Pestka , J. 2002 . Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells . J . Immunol . **168** : 171 – 178 .

- Christie , P . 1997 . *Agrobacterium tumefaciens* T – complex transport apparatus : a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria . J . Bacteriol . **179** : 3044 – 3085 .
- Citrovsky , . V . , Guralnick , B . , Simon , M . & Wall , J . 1997 . The molecular structure of *Agrobacterium* virE₂– single stranded DNA complexes involved in nuclear import . J . Mol . Biol . **271** : 718 – 727 .
- Clare , D . & Swaisgood , H . 2000 . Bioactive milk peptides : a prospectus . J . Dairy Sci . **83** : 1187 – 1195 .
- Coates , A . , Hu , Y . , Bax , R . & Pagar , C . 2002 . The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs . Natl . Rev . Drug Discov . **1** : 895 – 910 .
- Connors , S . , Mongodin , E . , Johnson , M . , Montero , C . , Nelson , K . & Kellg , R . 2006 . Microbial biochemistry , physiology , and biotechnology of hyperthermophilic *Thermotoga* species . FEMS Microbiol . Rev. **30** : 1 – 51 .
- Cooper , G . 2000 . The Eukaryotic Cells . 2nd edition . NCBI .
- Craig , E . , Gambill , D . & Nelson , J . 1993 . Heat shock proteins : Molecular chaperone of protein biogenesis . Microbiol . Rev. **57** : 402 - 414 .
- Crickmore , N . , Zeigler , D . , Feitelson , J . , Schnepf , E . , VanRie , J . , Lereclus , D . , Baum , J . & Dean , D . 1998 . Revision of the nomenclature of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **62** : 807 – 813 .

D

- Daigle , A . , Roy , D . , Belanger , G . & Vuilleumard , J . 1999 . Production of probiotic cheese (cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis* . J. Dairy Sci . **82** : 1081 - 1091 .
- Dambekodi , P . & Gilliland , S . 1998 . Incorporation of cholesterol in cellular membrane of *Bifidobacterium longum* . J. Dairy Sci . **81** : 1818 – 1824 .
- Daniel , J . , Renwick , A . , Roberts , A . & Sims , J . 2000 . The metabolic fate of sucralose in rats . Food Chem . Tox . **38** : S115 – S 121 .
- Daniel , S . , Hartman , P . & Allison , M . 1987 . Intestinal colonization of laboratory rats with *Oxalobacter formigenes* . Appl . Environ . Microbiol . **53** : 2767 – 2770 .
- Darouiche , R . , Donovan , W . , Terzo , D . , Thornby , J . , Rudy , D . & Hull , R . 2001 . Pilot trial of bacterial interference for preventing urinary tract infection. Urology **58** : 339 – 344 .

- DeCleene , M . & DeLey , J . 1976 . The host range of crown gall . Bot . Rev . **42** : 389 – 466 .
- Delgado – Jarana , J . , Sousa , S . , Gonzalez , F . , Rey , M . & Llobell , A . 2006 . ThHog1 controls the hyperosmotic stress response in *Trichoderma harzianum* . Microbiology **152** : 1687 – 1700 .
- de la Riva , G . , Gonzalez – Cabrea , J . , Vazquez – Pardon , R . & Ayra – Pardo , C . 1998 . *Agrobacterium tumefaciens* : a natural tool for plant transformation . Electronic . J . Biotechnol . **1** : 1- 19 .
- Desai , J . & Banat , I . 1997 . Microbial production of surfactants and their commercial potential . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **61** : 47 – 64 .
- Desnottes , J . 1996 . New targets and strategies for the development of antibacterial agents . Trends Biotechnol. 14 : **134** - 140 .
- De Vrse , M . , Stegelmann , A . & Richter , B . 2001. Probiotic compensation for lactase insufficiency . Am . J . Clin . Nutr . **73** : 4215 - 4229.
- Dionysius , D . , Grieve , P . & Milne , J . 1993 . Forms of lactoferrin : their antibacterial effect on enterotoxigenic *Escherichia coli* . J . Dairy Sci . **76** : 2597 – 2606 .
- Donlan , R . & Costerton , J . 2002 . Biofilms : Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms . Clin . Microbiol . Rev . **15** : 167 – m193 .
- Doolittle , W . 1999 . Phylogentic classification and the universal tree . Science **284** : 2124 – 2128 .
- Douglas , C . , Staneloni , R . , Rubin , R . & Nester , E . 1985 . Identification and genetic analysis of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region . J . Bacteriol . **161** : 850 – 860 .
- Drachman , D . 2006 . Aging of the brain , entropy and Alzheimer disease . Neurology **67** : 1340 – 1352 .
- D'Souza , A . , Rajkumar , C . , Cooke , J . & Bulpitt , C . 2002. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea : meta-analysis . Br . Med . J . **324** : 1361.
- Duncan , S . , Richardson , A . , Kaul , P . , Holmes , RE . , Allison , M . & Stewart , C . 2002 . *Oxalobacter formigenes* and its potential role in human health . Appl . Environ . Microbiol . **68** : 3841 – 3847 .
- Dybing , S . & Smith , D . 1991 . Relation of chemistry and processing producers to whey protein functionality : a review . Cult . Dairy Prod . J . **2** : 4 – 12 .

- Dyk , T . , Majarian , W . , Konstantinov , K . , Young , R . , Dhurjati , P . & LaRossa , R . 1994 . Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene – bioluminescence gene fusions . Appl . Environ . Microbiol . **60** : 1414 – 1420 .
- Dzidic , S . , Bacun – Druzina , V . & Petranovic , M . 2003 . The role of mismatch repair in bacterial evolution . Food Technol . Biotechnol . **41** : 177 – 182 .

E

- Elad , Y , & Hanson , L . 1999 . The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea* . Eur . J . Plant Pathol . **105** : 177- 189 .
- Ernst , J . 2000 . Transcription factors in *Candida albicans* environmental control of morphogenesis . Microbiology **146** : 1763 – 1774 .
- Fahnestoc , S . & Irwin , S . 1997 . Synthetic spider dragline proteins in *Escherichia coli* . Appl . Microbiol .Biotechnol . **47** : 23 – 32 .
- Fang , J . , Chiu , H . , Wu , J . , Chiang , Y . & Hsu , S . 2004 . Fatty acids in *Botryococcus braunii* accelerate topical delivery of flurbiprofen into and across skin . Int . J . Pharm . **19** : 163 – 173 .
- Farnworth , E . 2003 . Handbook of Fermented Functional Foods . CRC Press : London , New York .
- Farr , S . & Kogoma , T . 1991 . Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* . Microbiol. Rev . **55** : 561 – 585 .
- Finlay , R . & White , D . 1983 . Polymeric beta – hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium* . Appl . Environ. Microbiol . **45** : 71 – 78 .
- Fishel , R . & Kolodner , R . 1995 . Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer . Curr . Opin . Genet . Dev . **5** : 382 – 395 .
- Foster , P . 1990 . *Escherichia coli* strain with multiple DNA repair defects are hyperinduced for the SOS response . J . Bacteriol . **172** : 4719 – 4720 .
- Fuller ,R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl . Bacteriol . **66** : 365 - 378.
- Fuller , R . 1991. Probiotics in human medicine . Gut **32** : 439 - 442.

G

- Gabai , V . & Sherman , M . 2002 . Molecular biology of thermoregulation . J . Appl . Physiol . **92** : 1743 -1748 .

- Ganjam , L . , Thornton , W . , Marshall , R . & MacDonald , R . 1997 . Antiproliferative effects of yogurt factors obtained by membrane dialysis on cultured mammalian intestinal cells . J . Dairy Sci . **80** : 2325 – 2329 .
- Gelvin , S. 2003 . *Agrobacterium* – mediated plant transformation : the biology behind the ' Gene Joking tool ' . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **67** : 16 – 37 .
- Gething , M . & Sambrook , J . 1992 . Protein folding in the cell . Nature **355** : 33 – 45 .
- Gilbert . P . , Collier , P . & Brown , M . 1990 . Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents : Biofilms , cell cycle , dormancy , and stringent response . Antimicrobiol. Agents Chemother . **34** : 1865 – 1868 .
- Gill , H . 1998 . Stimulation of the immune system by lactic cultures . Int . Dairy J . **8** : 535 - 544.
- Gill , H . , Cross , M . & Rutherford , K . 2001. Dietary probiotic supplementation to enhance cellular immunity in the elderly . Br . Biomed . Sci . **58** : 94 - 96 .
- Gill , H . & Guarner , F. 2004 . Probiotics and human health : a clinical perspective . Post . Med . J . **80** : 516 - 526.
- Gilliland , S. 1989. Acidophilus milk products : a review of potential benefits to consumers . J . Dairy Sci . **72** : 2483 – 2494 .
- Gilliland , S . , Nelson , C . & Maxwell , C. 1982 . Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* . Appl . Environ . Microbiol . **49** : 377 – 381 .
- Gilliland , S . & Speck , M . 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli . Appl . Environ . Microbiol . **33** : 15 – 18 .
- Glickman , M . & Cicchanover , A . 2002 . The ubiquitin – proteasome proteolytic pathway : destruction for the sake of construction . Physiol . Rev . **82** : 373 – 428 .
- Goebel , B . & Stackebrandt , E . 1994 . Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **60** : 1614 – 1621 .
- Gonzalez -Toril . E . , Martinez - Frias , J . , Gomez , J . , Rull , F. & Amils , R . 2005 . Iron meteorites can support the growth of acidophilic chemolithotrophic microorganisms . Astrobiology **3** : 406 – 414 .
- Gorach , S . 2000 . Probiotics and gastrointestinal health . Am . J . Gastroenterol . **95** : S2 - S4.
- Guckent , J . , Hood , M . & White , D . 1986 . Phospholipids ester – linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of

Vibrio cholerae : Increases in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids . Appl . Environ . Microbiol . **52** : 794 – 801 .

- Guerin , M . , Huntley , M . & Olaizola , M . 2003 . *Haematococcus astaxanthin* : applications for human health and nutrition . Trends Biotechnol . **21** : 210 – 216 .
- Guslandi , M . , Mezzi , G . & Sorghi , M . 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease . Dig . Dis . Sci . **45** : 1462 – 1464 .
- Gui , D . , Rossi , S . , Runfola , M . & Magalini , S . 2003 . Botulinum in the therapy of gastrointestinal motility disorders . Aliment . Pharmacol . Ther . **1** : 1- 16 .
- Gupta , R.1998 . Protein phylogenies and signature sequences : a reappraisal of evolutionary relationship among archaeobacteria , eubacteria , and eukaryotes . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **62** : 1435 – 1491 .
- Gustin , M . , Albertyn , J . , Alexander , M . & Davenport , K . 1998 . MAP Kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **62** : 1264 – 1300 .

H

- Halas , A . , Baranowska , H . , Policinska , Z . 2002 . The influence of the mismatch repair system on stationary phase mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* . Curr . Genet . **42** : 140 – 146 .
- Hamilton - Miller , J. 2004 . Probiotics and prebiotics in the elderly . Postgrad . Med . J . **80** : 447- 451 .
- Hamme , J . , Singh , A . & Ward , O . 2003 . Recent advances in petroleum microbiology . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **67** : 503 – 549 .
- Hamos , J . Oblas , B . , Pluaski , - Sato , D . , Welch , W . , Bole , D . & Drachman , D . 1991 . Expression of heat shock proteins in the Alzheimer disease . **41** : 345 350 .
- Harris , R . , Feng , G . , Ross , K . , Sidhu , R . , Thulin , C . Longerich , S . , Szigety , S . , Winkler , M . & Rosenberg , J . 1997 . Mismatch repair protein mutL , becomes limiting during stationary phase mutation . Genet . Dev . **11** : 2426 – 2447 .
- Hatcher , G . & Lambrecht , R. 1993. Augmentation of macrophage phagocyte activity by cell free extracts of selected lactic acid – producing bacteria . J. Dairy Sci . **76** : 2485 - 2492.
- Heath , R . , White , S . & Rock , C. 2001 . Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents . Prog . Lipid Res. **40** : 467 – 497 .
- Heipieper , H . , Meulenbed , G . , Oirschot , O . & Bont , J . 1996 . Effect of environmental factors on the trans/cis ratio of unsaturated

- fatty acids in *Pseudomonas putida* S12 . Appl . Environ . Microbiol . **62** : 2773 – 2777 .
- Hejazi , M . & Wijffels , R . 2004 . Milking of microalgae . Trends Biotechnol . **22** : 189 – 194 .
 - Hekmat , S . , McMahon , D. 1992. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food . J. Dairy Sci . **75**: 1415 - 1422.
 - Helmbrecht , K . , Zeise , E . & Rensing , L . 2000 . Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review . Cell Proliferation . **33** : 341 – 365 .
 - Hendrickson , H . , Slechta , E . , Bergthorsson , U . , Anderson , D . & Roth , J . 2002 . Amplification – mutagenesis : evidence that " directed " adaptive mutation and general hypermutability result from growth with selected gene amplification . Proc . Natl . Acad . Sci . **99** : 2164 – 2169 .
 - Henriot , J . , Chaillot , B . , Rochette , L . & Labrude , P . 1990 . The medicinal leech *Hirudo medicinalis* : clinical use of the animal and therapeutic prospects of hirudin . J . Pharm . Belg . **45** : 207 – 218 .
 - Hill , G . 1993. Microbiology of bacterial vaginosis . Am . J . Obstet . Gynecol . **169**: 450 - 454.
 - Hofte ,H . & Whiteley , H . 1989 . Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* . Microbiol . Rev . **53** : 242 – 255 .
 - Hohmann , S. 2002 . Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **66** : 300 – 372 .
 - Holloway , B. 1998 . The less traveled road in microbial genetics . SGM Special Lecture pp 3243 -3248 .
 - Holtt , V . 1983 . Multiple endogenous opioid peptides . Trends Neurosci . **6** : 24 – 26 .
 - Horikoshi , K . 1999 . Alkaliphiles : Some applications of their products for biotechnology . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **63** : 735 – 750 .
 - Howell , C . , Hanson , L . , Stipanovic , R . & Puckhaber , L . 2000 . Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens* . Phytopathology **90** : 248 – 252 .
 - Hugenholtz , P . 2002 . Exploring prokaryotic diversity in the genomic era . Genome Biol . **3** : 1 – 14 .
 - Hughes , V. & Hillier , S. 1990 . Microbiologic characteristics of *Lactobacillus* products used for colonization of the vagina . Obstet . Gynecol . **75** : 244 – 248 .

I

- Iersel , M . , Meersmam , E . Swinkels , W . , Abee , T . & Rombouts , F . 2005 . Continuous production of non – alcohol by immobilized yeast at low temperature . J . Ind . Microbiol . Biotechnol . **14** : 495 – 501 .
- Irianto , A . & Austin , B . 2002 . Probiotics in aquaculture . J . Fish Dis . **25** : 633 – 642 .
- Ishizuka , M . , Kawatsu , M . , Yamashita , T . , Ueno , M . & Takeuchi , T . 1995 . Low molecular weight immunomodulators produced by microorganisms . Int . J . Immunopharmacol . **17** : 133 – 139 .
- Isolauri . E . , Arvola , T . , Sutas , Y . , Moilanen , E . & Salminen , S . 2000 . Probiotics in the management of atopic eczema . Clin . Exp . Allergy **30** : 1604 -1610.
- Isolauri . E . , Sutas , Y . , Kankaapaa , P . , Arvilommi , H . & Salminen , S . 2001 . Probiotics : effects on immunity . Am . J . Clin . Nutr . **73** : 444S - 450S.

J

- Jensen , G . , Ginsberg m D . & Drapeau , M . 2001 . Blue – green algae as an immuno – enhancer and biomodulator . J . Am . Nutraceutical Assoc . **3** : 24 – 30 .
- Jolles , P . & Henschen , A . 1982 . Comparison between the clotting of blood and milk . Trends Biochem. Sci . **7** : 325 – 328 .
- Jolles , P . , Parker , F . , Floch , F . , Midliore , D . , Alliel , P . , Zerial , A . & Werner , G . 1981 . Immunostimulating substances from human casein . J . Immunopharmacol . **3** : 363 - 369 .
- Jones , E . , Smart , A . , Bloomberg , G . Burgess , L . & Millar , M . 1994 . Lactoferricin , a new antimicrobial peptide . J . Appl . Bacteriol . **77** : 208 – 214 .
- Jong – Yuh , C . & Mei – Fen , S . 2005 . Potential hypoglycemic effects of Chlorella in streptozotzic – induced diabetic mice . Life Sci . **77** : 980 – 990 .

K

- Katircioglu , H . , Aslim , B . , Yuksekdao , Z . , Mercan , N . & Betatli , V . 2003 . Production of poly- β – hydroxybutyrate (PHB) and differentiation of putative *Bacillus* mutant strains by SDS-PAGE of total cell protein . African J . Biotechnol . **2** : 147 – 149 .
- Kaur , A . , Chaudhary , A . , Kaur , A . , Chaudhary , R . & Kaushik , R . 2005 . Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem . Curr . Sci . **89** : 1103 – 1112 .

- Kayser , H . & Meisel , H . 1996 . Stimulation of human peripheral lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins . FEBS Lett . **383** : 18 – 20 .
- Khan , , A . , Kuek , C . , Chaudhary , T . , Khoo , C . & Hayes , W . 2000 . Role of plants , mycorrhizae and phytochelators in heavy metals contaminated land remediation . Chemosphere **41** : 197 - 207 .
- Kim , J . , Kim , S . , Chung , S . , Dae , K . , Bor , Y . & Batt , C . 1992 . Use of antisense RNA to confer bacteriophage resistance in dairy starter cultures . J . Ind . Microbiol . Biotechnol . **10** : 71 – 78 .
- Klaver , F . & van der Meer , R . 1993 . The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugation activity . Appl . Environ . Microbiol . **59** : 1120 – 1124 .
- Knorr , D . & Sinskey , A . 1985 . Biotechnology in food production and processing . Science **229** : 1224 – 1229 .
- Kolars , J . , Levitt , M . & Aouji , M . 1984 . Yogurt an autodigesting source of lactase . N . Engl . J . Med . **310** : 1 – 3 .
- Kullisaar , T . , Zilmer , M . , Mikelsaar , T . , Vihalemm , H . , Annuk , C . & Kilk , A . 2002 . Tow oxidative lactobacilli strains as promising probiotics . Int . J . Fd . Microbiol . **72** : 215 – 224 .
- Kultz , D . 2003 . Evolution of the cellular stress proteome : from monophyletic origin to ubiquitous function . J . Expt. Biol . **206** : 3119 – 3124 .

L

- Lahov , E . & Reglson , W . 1996 . Antibacterial and immunostimulating casein – derived substances from milk : casecidin , isracidin peptides . Food Chem . Toxicol . **34** : 131 – 145 .
- Lange , R . & Hengge – Aronis , R . 1991 . Identification of central regulator of stationary – phase gene expression in *Escherichia coli* . Mol . Microbiol . **5** : 49 – 59 .
- Langewald , J . & Cherry , A . 2000 . Prospects for microbial pest control in : west Africa . Biocontrol **21** : 51 – 56 .
- Lasat , M . 2002 . Phytoextraction of toxic metals : A review of biological mechanisms . J . Environ . Qual . **31** : 109 – 120 .
- Lazaris , A . , Arcidiacono , S . & Karatzas , C . 2002 . Spider silk fiber spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells . Science **295** : 472 – 476 .
- Lee , K . , Lee , S . & Lee , B . 2006 . *Asperigillus oryzae* as probiotic in poultry : a review . Int . J . Poul . Sci . **5** : 1 - 3 .

- Lewis , K . 2000 . Programmed cell death in bacteria . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **64** : 503 – 514 .
- Lewis , L . 2006 . Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors . Appl . Microbiol . Biotechnol . **73** : 27 - 36 .
- Li , Y . , Korola . A . , Fahima , T . & Nevo , E . 2004 . Microsatellites within the genes : structure , function , and evolution . Mol . Biol .Evol . **21** : 991 – 1007 .
- Lidbeck , A . , Nord , C . , Gustafsson , J. & Rafter , J . 1992 . Lactobacilli , anticarcinogenic activities and human intestinal microflora . Eur . J . Cancer Prev . **5** : 341 – 353 .
- Lik - Amster , H . , Rochat , F . , Saudan , K . , Mingnot , A . & Aeschlimann , J . 1981 . Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intakes . FEMS Immunol . Med . Microbiol . **10** : 55 – 64 .
- Little , J . & Mount , D . 1982 . The SOS regulatory system of *Escherichia coli* . Cell **29** : 11 – 22 .
- Little , J . 1983 . ppGpp acts at the level of RNA polymerase . J . Bacteriol . **154** : 787 – 792 .
- Liu , J . , Dehbi , M . , Moeck , G . , Arhin , F . , Banda , P . , Bergron , D . , Calleigo , M . , Ferretti , V . , Ha , N . , Kawan , T . , McCarty , J . , Srikumar , R . , Williams , D . , Wu , J . Gros . P . , Pelleteir , J . & DuBow , M . 2004 . Antimicrobial drug recovery through bacteriophage genomics . Natl . Biotechnol . **22** : 185 – 191 .
- Liu , Y . , Zhou , J . , Omelchenko , M . , Beliaev , A . , Venkateswaran , A . , Stair , J . , Wu , L . , Thompson , D . , Xu , D . , Rogozin , I . , Gaidamakova , E . , Zhai , M . , Makarova , K . , Koonin , E . & Daly , M . 2003 . Transcriptome dynamics of *Deinococcus radiodurans* recovering from ionizing radiation . Proc . Natl . Acad . Sci . **100** : 4191 – 4196 .
- Lodinova – Zadnikova , R . , Cukrowska , B . & Tlaskalova - Hagenova , H . 2003 . Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years) . Int . Arch . Allergy Immunol . **131** : 209 – 211 .
- Luiten , E . , Akkerman , I . , Kouloman , A . , Kamermans , P . , Reith , H . , Barbosa , M . , Sipkema , D . & Wijffels , R . 2003 . Realizing the promises of marine biotechnology . Biomol. Eng . **20** : 429 – 439 .

- Lund , P . 2001 . Microbial molecular chaperones . Adv . Microbiol . Physiol. **44** : 93 – 140 .

M

- Macario , A . , Lange , M . , Ahring , B . & Macario , E . 1999 . Stress genes and proteins in archaea . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **63** : 923 – 967 .
- Macario , A . , & Macario , E . 2005 . Sick chaperones cellular stress, and disease. N . Eng . J . Med . **353** : 1489 – 1501 .
- Maeno , M . , Yamamoto , M . & Takano , T . 1996 . Identification of an antihypertension peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790 : J . Dairy Sci . **79** : 1316 -1321 .
- Majamaa , H . & Isolauri , E. 1997. Probiotics : a novel approach in the management of food allergy . J . Allergy Clin . Immunol . **99**_: 179 – 185 .
- Majamaa , H. & Isolauri , E . & Saxelin , M. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis . J . Pediatr . Gastroenterol . Nutr . **20**_: 333 – 338 .
- Makarova , K . , Aravind , L . , Wolf , Y . , Tatusov , R . , Minton , K. . Koonin , E . & Daly , M . 2001 . Genome of the extremely radiation – resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **65** : 44 –79 .
- Mallick , N . 2002 . Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal : a review . **15** : 337 -390 .
- Markwardt , F . 2002 . Hirudin as alternative anticoagulant : a historical review . Semin Thromb . Hemost . **28** : 405 – 415 .
- Marquis , R . , Sim , J . & Shin , S . 1994 . Molecular mechanism of resistance to heat and oxidative damage . J . Appl . Bacteriol . **76** : 40 – 48 .
- Martin , D. , Ciulla , R . & Roberts , M . 1999 . Osmoadaptation in archaea . Appl . Environ . Microbiol . **65** : 1815 – 1825 .
- Martin , R . , Richardson , B . , Nyange , P . , Lavreys , L . , Hiller , S . , Chohan , B . , Mandaliya , K . , Ndinya – Achola , J . , Bwayo , J . & Kreiss , J. 1999 . Vaginal lactobacilli microbial flora , and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition . J . Inf . Dis . **180**_: 1863 – 1868 .
- Maruyama , S . , Mitchi , H . , Tanaka , H . , Tomizuka , N . & Suzuki , H . 1987 . Studies on active site and antihypertensive activity of angiotensin I – converting enzyme inhibitors derived from casein . Agric . Biol . Chem . **51** : 1581 .

- Mastromarino , P . , Brididi , P . , Macchia , S . , Maggi , L . , Pirovano , F . , Trinchieri , V . Counte , U. & Matteuzzi , D . 2002 . Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets . J . Appl . Microbiol . **93**: 884 - 893 .
- Matic , I . , Rayssiguler , C . & Radman , M . 1995 . Interspecies gene exchange in bacteria : the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species . Cell **80** : 507 – 515 .
- Martin , A . 1991 . The molecular basis of carbon starvation-induced general resistance in *Escherichia coli* . Mol . Microbiol . **5** : 3 – 10 .
- Matsuzaki , J . & Chin , J . 2000 . Modulating immune response with probiotic bacteria . Immunol . Cell Biol . **78** : 67 - 73 .
- Matthies , H . , Strak , H . , Hartrodt , B . , Ruethrich , H . , Spieler , H . , Barth , A . & Neubert , K . 1984 . Derivatives of beta – casomorphins with high analgesic potency . Peptides **5** : 463 – 470 .
- McDevitt , D . & Rosenberg , M . 2001 . Exploiting genomics to discover new antibiotics . Trends Microbiol **9** : 611 – 617 .
- McDonnell , G . & Russell , A . 1999 . Antiseptics and disinfectants : activity , action , and resistance . Clin . Microbiol . Rev . **12** : 147 – 179 .
- McGowan , C . 2003 . Regulation of the eukaryotic cell cycle . Progress Cell Cycle Res . **5** : 1- 4 .
- McKenzie , G . , Harris , R . , Lee , P . & Rosenberg , S . 2000 . The DNA polymerases and genetic change strategies of pathogens . Curr . Opin . Microbiol . **4** : 586 – 594 .
- Meisel , H . & Frister , H . 1989 . Chemical characterization of bioactive peptides from *in vivo* digests of casein . J . Dairy Sci . **56** : 343 - 349 .
- Meisel , H . & Schlimme , E . 1990 . Milk proteins : precursors of bioactive peptides . Trends Food Sci . Technol . **1** : 41 – 43 .
- Meister A . & Anderson , M . 1983 . Glutathione . Annu . Rev . Biochem . **52** : 711 – 760 .
- Messina , J . & Lawrence , D . 1989 .Cell cycle progression of glutathione - depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase . J . Immunol . **143**: 1974 -1981.
- Meydani , S . & Ha , W. 2000 . Immunologic effects of yogurt . Am . J . Clin . Nutr . **71**: 861 – 872 .
- Miettinen , M . , Vuopio – Varkila . J . & Varkila , K. 1996. Production of human tumor necrosis factor- alpha , interleukine - 6

and interleukine -10 is induced by lactic acid bacteria . Infect . Immun . **64** : 5403 – 5405 .

- Mikes , Z . , Ferenicik , M . & Jahnova , E. 1995 . Hypocholesterolemic and immunostimulatory effects of orally applied *Enterococcus faecium* M - 74 in man . Folia Microbiologica **40** : 639 – 646 .
- Miller , R . 1995 . Biosurfactants – facilitated remediation of metal-contaminated soils . Environ . Health Presp . **103** : 59 – 62 .
- Milner , R . 2000 . Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticides in Australia . Biocontrol . **21** : 47 – 50 .
- Mittal , G . 1992 . Food Biotechnology . Technomic Publishing Comp . Inc . : Lancaster , Basel .
- Morin , D . , Lips , A . , Pinches , A . , Huisman , J . , Frias , C . , Norberg , A . & Forssberg , E . 2005 . BioMinE integrated project for the development of biotechnology for metal – bearing materials in Europe . Proceedings of the 16th international Biohydrometallurgy Symposium . Cape Town Africa .
- Morita , A . , Chung , Y . , Freeman , H . , Erickson , R . , Sleisenger , M . & Kim , Y . 1983 . Intestinal assimilation of proline – containing tetrapeptide . Role of a brush border membrane postproline dipeptidyl aminopeptidase IV . J . Clin . Invest . **72** : 610 .
- Morrissey , J . & Osbourn , A . 1999 . Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **63** : 708 – 724 .
- Moscatelli , M . , Lagomarsino , A . , Marinaris , S . , Angelis , P . & Grego , S . 2005 . Soil microbial indices as bioindicators of environmental changes in a popular plantation . Ecol . Indicators **5** : 171 – 179 .
- Mukamolova , G . , Kaprelyants , A . , Young , M . & Kell , D. 1998 . A bacterial cytokine . Microbiology . **95** : 8916 -8921 .

N

- Nakamura , Y . , Yamamoto , N . , Sakai , K . , Okubo , A . , Yamazaki , S . & Takano , T . 1995 . Purification and characterization of angiotensin I – converting enzyme inhibitors from sour milk . J . Dairy Sci . **78** : 777 – 783 .
- National Cancer Institutes . 2003. Understanding the Immune System. NIH. Publication No. 03 - 5423.
- Negoro , M . , Shioji , N . , Miyamoto , K . & Miura , Y . 1991 . Growth of microalgae in high CO₂ gas and effects of SO_x and NO_x . Appl . Biochem . Biotechnol . **26** : 877 – 886 .

- Nesvold , K . , Kristoffersen , A . , Holst – Jensen , A . & Berdal , K . 2005 . Design of DNA chip for detection of unknown genetically modified organisms (GMOs) . *Bioinformatics* **21** : 1917 – 1926 .
- Nguyen , R . & Harvey , H . 2003 . Preservation via macromolecular associations during *Botryococcus braunii* decay : proteins in the Pula Kerogen . *Organic Geochem* . **34** : 1319 – 1403 .
- Nickerson , K . , Zamick , W . & Kramer , V . 1998 . Poly – β hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis* . *FEMS Microbiol . Lett* . **12** : 317 – 331 .
- Nies , D . 7 Silver , S . 1995 . Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances . *J . Indust . Microbiol* . **14** : 186 – 199 .
- Noh , D . , Kim , S . & Gilliland , S . 1997 . Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 . *J . Dairy Sci* . **80** : 3107 – 3113 .
- Noue , J . & Pawu , N . 1988 . The potential of microalgal biotechnology : a review of production and uses of microalgal . *Biotechnol . Adv* . **6** : 725 – 770 .

O

- O'aizola , M . 2003 . Commercial development of microalgal biotechnology : from the test tube to the marketplace . *Biomol . Eng* . **20** : 459 – 466 .
- Ocana , V . , & Nader – Macias , M . 2004 . Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II : screening of *Lactobacillus* strains with probiotic purposes and characterization of *Lactobacillus* bacteriocin . *Meth . Mol . Biol* . **268** : 347 - 353 .
- Oda , M . , Hasegawa , H . , Komatsa , S . , Kambe , M . & Tsuchiya , F . 1983 . Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* species . *Agric . Biol . Chem* . **47** : 1623 .

P

- Palejwala , S . & Desai , J . 1989 . Production of extracellular emulsifier by Gram negative bacterium . *Biotechnol . Lett* . **11** : 115 – 118 .
- Pedraza , M . & Yasbin , R . 2004 . Contribution of the mismatch DNA repair system to the generation of stationary – phase – induced mutants of *Bacillus subtilis* . *J . Bacteriol* . **186** : 6485 – 6491 .
- Pennanen , T . , Frostegard , A . , Fritze , H . , & Baath , E . 1996 . Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities in coniferous forests . *Appl . Environ . Microbiol* . **62** : 420 – 428 .

- Perdigon , G . , Alvarez , S . , Rachid , M . , Agureo , G . & Gobbato , N . 1995 . Immune system stimulation by probiotics . J . Dairy Sci . **78**: 1597 – 1606 .
- Pericone , C . , Bae , D . , Shchepetov , M . , McCool , T . & Weiser , J . 2002 . Short – sequence tandem and non – tandem DNA repeats and endogenous hydrogen peroxide production contribute to genetic instability of *Streptococcus pneumoniae* , J . Bacteriol . **184** : 4392 – 4399 .
- Pessi , T . , Sutas , Y . & Hurme , M . 2000 . Interleukin -10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG . Clin . Exp . Allergy **30** : 1804 -1808 .
- Pihlanto – Leppala , A . , Antila , P . , Mantsala , P . & Hellamn , J . 1994 . Opioid peptides produced by *in vivo* proteolysis of bovine caseins . Int . Dairy J . **4** : 291 -301 .
- Pihlanto – Leppala , A . , Paakkari , I . , Rinta – Koski , M . & Antila , P . 1997 . Bioactive peptides derived from *in vitro* proteolysis of bovine beta – lactoglobulin and its effect on smooth muscle . J . Dairy Res. **64** : 149 – 155 .
- Poole , K . 2002 . Mechanism of bacterial biocide and antibiotic resistance . J . Appl . Bacteriol . **92** : 55 – 64 .
- Prasad , m . & Freitas , H . 2003 . Metal hyperaccumulation in plants – biodiversity prospecting for phytoremediation technology . J . Biotechnol . **6** : 1 – 32 .
- Prieto , M . 2007 . From oil to bioplastics , a dream come to true ? J . Bacteriol . **189** : 289 – 290 .
- Proctor , P . & Reynolds , E . 1984 . Free radicals and disease in man . Physiol . Chem . Phys . **16** : 175 – 194 .
- Pugh , N . & Pasco , D . 2001 . Characterization of human monocyte activation by a water soluble preparation of *Aphanizomenon flos – aquae* . Phytomedicine **8** : 445 – 453 .
- Pulz , O . 2001 . Photobioreactors : production systems for phototrophic microorganisms . Appl . Microbiol . Biotechnol . **57** : 287 – 293 .
- Pulz , O . & Gross , W . 2004 . Valuable products from biotechnology . Appl . Microbiol . Biotechnol . **65** : 635 – 648 .

Q

- Qina , Z . , jolles . P . , Migliore – Samour , D . , Schoentgen m F . & Fiat , A . 1995 . Sheep kappa – casein peptides inhibitors of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin . Biochim . Biophys. Acta . **1243** : 25 - 32 .
- Quintela , J . , Portillo , F . , Pittenauer , E . , Allmaier , G . & Pedro , M . 1999 . Peptidoglycan fine structure of the radiotolerant

bacterium *Deinococcus radiodurans* SARK . J . Bacteriol . **181** : 334 - 337 .

R

- Rafter , J . 2002 . Lactic acid bacteria and cancer . Br . J . Nutr . **88** : 89 – 94 .
- Ranson , N . White , H . & Saibil , H . 1998 . Chaperonins . Biochem . J . **333** : 233 – 242 .
- Ratledge , C . 2004 . Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production . Biochimie **86** : 807– 815 .
- Rawlings , D . 2005 . Characteristics and adaptability of iron and sulfur – oxidizing microorganisms used for the recovering of metals and their concentrates . Microbial Cell Factories . **4** : 13 – 45 .
- Reddy , G . , Friend , B . , Shahnai , K . & Farmer , R . 1983 . Antitumor activity of yogurt components . J . Food Prot . **46** : 159 – 164 .
- Reddy , B . & Rivenson , A . 1993 . Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon , mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4.5-f]quinoline , a food mutagen . Cancer Res . **53** : 3914 – 3918 .
- Redman , R . , Litvintseva , A . , Sheehan , K . , Henson , J . & Rodriguez , R . 1999 . Fungi from geothermal soils in Yellowstone national park . Appl . Environ . Microbiol . **65** : 5193 – 5197 .
- Rehm , B . 2006 . Genetic and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granules self – assembly : the key role of poly ester synthetases . Biotechnol . Lett . **28** : 207 – 213 .
- Reid , G . 2002 . Safety of *Lactobacillus* strains a probiotic agents . Clin . Infect . Dis . **35** : 349 – 350 .
- Reid , G . , Beuerman , O . , Heinemann , C . & Bruce , A . 2001. Probiotic *Lactobacillus* dose required and maintain a normal vaginal flora . FEMS Immunol. Med. Microbiol. **32**: 37- 41 .
- Reid , G . , & Bruce , A . 2001. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications . J . Infect . Dis . **183** : S77- S80.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M. & McCormick, K. 2003. Potential use of probiotics in clinical practice . Clin. Microbiol. Rev. **16**: 658- 672.
- Reid , G . , KILLSAP , K . & Bruce , A . 1994. Implantation of *Lactobacillus casei* var *rhamnosus* into vagina . Lancet **344** : 1229 .
- Rocha , E . , Matic , I . & Taddei , F . 2002 . Outer – representation of repeats in stress response genes : a strategy to increase

versatility under stressful conditions . Nucleic Acid Res . **30** : 1886 – 1894 .

- Rommelaere , H . , Tory , M . Goo , Y . , Melik , R . , Gowan , N . , Vandekerckhove , J . & Ampe , C . 1993 . Eukaryotic cytosolic chaperonin contains t - complex polypeptide 1 and seven related subunits . Proc . Natl . Acad . Sci . **90** : 11975 – 11979 .
- Roseman , A . , Chen , S . , White , H . , Braig , K . & Saibil , H . 1996 . The chaperonin ATPase cycle : mechanism of allosteric switching and movements of substrate – binding domains in GroEL . Cell **87** : 241 – 251 .
- Rosenberg , E . 1986 . Microbial surfactants . Crit . Rev . Biotechnol . **3** : 109 – 132 .
- Rosenberg , E . & Ron , E . 1997 . Bioemulsans : surface – active polysaccharide – containing complexes . Curr . Opin . Biotechnol . **8** : 313 – 316 .
- Rosenberg , S . , Thulin , C . & Harris m R . 1998 . Transient and heritable mutators in adaptative evolution in the lab and in nature . Genetics **148** : 1559 – 1566 .
- Russell , A . 1998 . Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics and biocides . Prog . Med . Chem . **35** : 133 – 197 .
- Russell , A . 2003 . Similarities and differences in the response of microorganisms to biocides . J . Antimicrobial . Chemother . **52** : 750 – 763 .

S

- Sabirova , J . , Ferrer , M . , Lunsdrof , H . , Wany , V . , Kalscheuer , R . , Steinbuchel , A . , Timmis , K . & Golyshin , P . 2006 . Mutation in a " tes –B like " hydroacyl - coenzyme A – specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoate by *Alcanivorax borkumensis* SK2 . J . Bacteriol . **188** : 8425 – 8459 .
- Sancar , A . & Sancar , B . 1988 . DNA repair enzymes . Annu . Rev . Biochem . **57** : 29 – 67 .
- Sar , P . , Kazy , S . & Singh , S . 2002 . Intracellular nickel accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* and its chemical nature . Lett . Appl . Microbiol . **32** : 257 – 261 .
- Scheller , J . , Guhrs , K . & Conrad , U . 2001 . Production of spider silk proteins in tobacco and potato . Nature **19** : 573 – 577 .
- Scheppler , L . , Vogel , M . , Zuercher , A . , Zuercher , M . , Germond , J . , Miescher , S . & Stadler , B . 2002 . Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle . Vaccine **20** : 2913 - 2920 .

- Schiffrin , E . , Brassart , D . , Servin , A . , Rochat , F . & Donnet – Hughes , A . 1997 . Immune modulation of blood lymphocytes in human by lactic acid bacteria : criteria for strain selection . Am . J . Clin . Nutr . **66** : 515S - 520S .
- Schnepf , E . , Crickmore , N . , van Rie , J . , Lereclus , D . , Baum , J . , Feitelson , J . Zeigler , D . & Dean , D . 1998 . *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins . Microbiol . Mol . Biol . Rev . **62** : 775 – 806 .
- Shephord , R . , Rockey , J . , Sutherland , I . & Roller S . 1995 . Novel bioemulsifier from microorganisms for use in foods . J . Biotechnol . **40** : 207 – 217 .
-
- Shin , K . Yamauchi , K . , Teraguchi , S . , Hayasawa , H . , Tomita , M . , Otsuka , Y . & Yamazaki , S . 1998 . Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 . Lett . Appl . Microbiol . **6** : 407 – 411 .
- Shida , K . , Makino , K . & Morishita , A . 1998 . *Lactobacillus casei* inhibits antigen induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures . Int . Arch . Allergy Immunol . **115** : 278 - 287 .
- Shida , K . , Kiyoshima – Shibata , J . , Nagaoka , M . , Watanabe , K . & Nanno , M . 2006 . Induction of interleukin -12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion . J . Dairy Sci . **89** : 3306 - 3317 .
- Shuler , M . , Cho , T . , Wickham , I . , Ogonah , O . , Kool , M . , Hammer , D . , Granados , R . & Wood , H . 1990 . Bioreactor development for production of viral pesticides or heterologous proteins in insect cultures . Ann . N . Y . Acad . Sci . **589** : 399 – 422 .
- Shon , J . , Kang , H . , Rao , K . , Kim , C . , Choi , E . m Chung , B . & Rhee , S . 2001 . Current status of the anticoagulant hirudin : its biotechnological production and clinical practice . Appl . Microbiol . Biotechnol . **57** : 606 – 613 .
- Singh , S . Kate , B . , & Banerjee , U . 2005 . Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae : an overview . Crit . Rev n. Biotechnol . **25** : 73 – 95 .
- Sipsas , N . , Zonios , D . & Kordossis , T . 2002 . Safety of *Lactobacillus* strains used as probiotic agents . Clin . Infect . Dis . **34** : 1283 – 1285 .

- Smith , K . , Handelsman , J . & Goodman , R . 1999 . Genetic basis in plants for interactions with disease suppressive bacteria . Proc . Natl . Acad . Sci . **96** : 4786 – 4790 .
- Songisepp , E . , Kullisaar , T . , Hütt , P . , Elias , P . , Brilene , T . , Zilmer , M . & Mikelsaar , M . 2004 . A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity . J. Dairy Sci . **87**: 2017-2023 .
- Spelberg , B . , Powers , J . , Brass , E . , Miller , L . & Edwards J , 2004 . Trends in antimicrobial drug development : implications for the future . Antimicrobial Res. Develop . **38** : 1279 – 1286 .
- Spolaore , P . , Joannis – Cassan , C . , Duran , E . & Isambert , A . 2006 . Commercial applications of microalgae . J . Biosci . Bioeng . **101** : 87 - 96 .
- Steidler , L . , Robinson , K . , Chamberlain , L . , Schofield , K . , Remout , E . , Le Page , R . & Wells , J . 1998. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine . Infect . Immun . **66**: 3183 - 3189 .
- Stolz , P . & Obermayer , B . 2005 . Manufacturing microalgae for skin care . Cosmetics Toiletries **120** : 99 – 106 .
- Sudakin , D . 2003 . Biopesticides . Toxicol . Rev . **22** : 83 – 90 .
- Surawicz , C . , Elmer , G . , Speelman , P . , McFarland , L . , Chinn , J . & van Belle , G . 1989 . Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* : a prospective study . Gastroenterology **96**: 981 – 988 .
- Sutton , M . , Smith , B . , Goday , V . & Walker , G . 2000 . The SOS response : recent insights into *umuDC* – dependent mutagenesis and DNA damage tolerance . Annu . Rev . Genet . **34** : 479 – 497 .
- Sybesma , W . , Starrenburg , M . , Kleerebezem , M . , Mierau , I . , de Vos , W . & Hugenholtz , J . 2003. Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis* . Appl . Environ . Microbiol . **69**: 3069 – 3076 .

T

- Taha , T . , Hoover , D . , Dalladetta , G . , Kumwenda , N . , Mtimavalye , L . , Liomba , G . , Braadhead , L . , Chipangwi , J. Miotti , P. 1998 . Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora : association with increase acquisition of HIV . AIDS **12**: 1699 – 11706 .
- Takahashi , M . , Moriguchi , S . S . , Suganuma , H . , Shiota , A . , Tani , F . , Usui , H . , Kurahashi , K . , Sasaki , R . & Yoshikawa , M . 1997 . Identification of casoxin C , an ileum – containing

peptide derived from kappa – casein , as an against for C3a receptors . Peptides **18** : 329 – 336 .

- Teschnemacher , H . , Koch , G . & Brantl , V . 1997 . Milk protein derived opioid receptor ligands . Peptide Sci . **43** : 99 – 117 .
- Toone , W . & Jones , N . 1998 . Stress – activated signaling pathway in yeast . Genes Cells . **3** : 485 – 498 .
- Torres – Cruz , J . , van der Woude , M . 2003 . Slipped – strand mispairing can function as a phase variation mechanism in *Escherichia coli* . J . Bacteriol . **185** : 6990 – 6994 .
- Tramper , J . , Battershill , C . , Brandenburg , W . , Burgess , G . , Hill , R . , Luiten , E . , Muller , W . , Osinda , R . , Rorrer , G . , Tredici , M . , Uriz , M . , Wrigt , P . & Wijffels , R . 2003 . What to do in marine biotechnology . Biomol . Eng . **20** : 467 – 471 .
- Trivedi , P . 2001 Algal Biotechnology . Jaipur , Pointer Publishers .
- Tohill , B . , Heilig , C . , Klein , R . , Rompalo , A . & Cu-Univ , S . 2004 . Vaginal flora morphotypic profiles and assessment of bacterial vaginosis in women at risk for HIV infection . Infect . Dis . Obstet . Gynecol . **12** : 121 – 126 .
- Tsuru , S . , Shinomiya , N . , Taniguchi , M . , Shimazaki , H . , Tanigawa , K . , Nomoto , K . 1988 . Inhibition of tumor growth by dairy products . J . Clin . Lab . Immunol . **25** : 177 – 183 .
- Tzfira T . , Chen , M . & Citovsky , V . 2000 . Nucleic acid transport in plant – microbe interactions : the molecule that walk through the walls . Annu . Rev . Microbiol . **54** : 187 – 219 .
- Tzfira T . & Citovsky , V . 2003 . The *Agrobacterium* – plant cell interaction . Taking biology lesson from a bug . Plant . Physiol . **133** : 943 – 947 .

U

- Ussery , D . , Binnewies , T . , Gouveia – Oliveira , R . , R . , Jamer , H . & Hallin , P . 2004 . Genome update : DNA repeats in bacterial genomes . Microbiology . **150** : 3519 - 3521 .

V

- Vaca , C . , Wilhelm , J . & Harms – Ringdahl , M . 1988 . Interaction of lipid peroxidation products with DNA : a review . Mut . Res . **195** : 137 – 149 .
- Van Leir , F . , Van den End , E . , de Gooijer , C . , Vlak , J . & Tramper , J . 1990 . Continuous production of baculovirus in a cascade of insect – cell reactors . Appl . Microbiol . Biotechnol . **33** : 43 -47 .

- Van't Veer , P . , van Leer , E . & Rietdijk , A . 1991. Combination of dietary factors in relation to breast - cancer occurrence . Int . J . Cancer **47** : 649 – 653 .
- Velkov , V . 2001 . Stress – induced evolution and the biosafety of genetically modified microorganisms released into the environment . J . Biosci . **26** : 667 – 683 .

W

- Wakabayashi , H . , Abe , S . , Okutomi , T . , Tansho , S . , Kawase , K . & Yamaguchi , H . 1996 . Cooperative anti- *Candida* effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents . Microbiol . Immuno . **40** : 821 – 825 .
- Wake , L . & Hillen , L . . Nature and hydrocarbon content of blooms of the alga *Botryococcus braunii* occurring in Australian freshwater lakes . Aust . J . Marine & Freshwater Res. **32** : 353 – 367 .
- Walker , T . 1998 . Microbiology . W.B. Saunders Comp . Philadelphia , London .
- Walker , T . , Purton , S . , Becker , D . & Collet C . 2005 . Microalgae as bioreactors . Plant . Cell Rep . **24** : 629 – 641 .
- Walker, W. 2000. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense . J . Pediatr . Gastroenterol . Nutr . **30** : S2 - S7 .
- Wallace , S . 1988 . AP endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage . Environ . Mol . Mutagen . **12** : 431 – 477 .
- Wayman , M . , Jenkins , A . & Kormady , A . 1984 . Biotechnology for oil and fat industry . J . Am . Oil Chem . Soc . **61** : 129 – 131 .
- Wells , J . , Robinson , K . , Chamberlain , L . , Schofield , K . & Le Page , R. 1996 . Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles . Antoine Leeuwenhoek **70** : 317 – 330 .
- Westwater , C . , Schofield , D . , Schmidt , M . , Norris , J . & Dolan , J . 2002 . Development of a P1 phagmid system for the delivery of DNA into Gram – negative bacteria . Microbiology . **148** : 943 – 950 .
- Willardson , B . , Wilkins , J . , Rand , T . , Schupp , J . , Hill , K . , Keim , P . & Jackson , P . 1998 . Development and testing of a bacterial biosensor for toluene – based environmental contaminants . Appl . Environ . Microbiol . **64** : 1006 – 1012 .
- Winter , J . & Jacob , U . 2004 . Beyond transcription – new mechanism for regulation of molecular chaperones . Crit . Rev . Biochem . Mol . Biol . **39** : 297 – 317 .

- Wood , E . , Ghane , F . & Grogan , D . 1997 . Genetic responses of the thermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* to short – wavelength UV light . J . Bacteriol . **179** : 5693 - 5698 .
- Wu , B . , Hunt , C . & Morimoto , R . 1985 . Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70 . Mol. Cell . Biol . **5** : 330 – 341 .
- Yamamoto , N . 1997 . Antihypertensive peptides derived from food proteins . Peptide Sci . **43** : 129 – 134 .
- Yamamoto , N . , Akino , A . & Takano , T . 1994 . Antihypertensive effect of peptides from casein by an extracellular protease from *Lactobacillus helveticus* CP790 . J . Dairy Sci . **77** : 917 - 922 .
- Yamamoto , N . , Maeno , M . & Takano , T . 1999 . Purification and characterization of antihypertensive peptide from yogurt – like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4 . J . Dairy Sci . **82** : 1388 – 1393 .
- Yoshikawa , M . , Yoshimura , T . & Chiba , H . 1986 . Opioid peptides from milk proteins . Agric . Biol . Chem . **50** : 2419 – 2421 .
- Zabel , C . , Chamard , D . , Priller , J . 2002 . Alterations in the mouse and human proteome caused by Huntington's disease . Mol . Cell Proteomics **1** : 366 – 375 .
- Zarate , G . , Juárez , M . & Nader – Macias , M . 2005 . Effect of some pharmaceutical excipients on the survival of probiotic vaginal lactobacilli . Can . J . Microbiol . **51** : 483 – 489 .
- Zhang , Q . & Yonel . S . 1991 . Function of manganese – superoxide dismutase by membrane – binding drug in *Escherichia coli* . J . Bacteriol . **173** : 3488 – 3491 .
- Zioudrou , H . , Streaty , R . & Klee , W . 1979 . Opioid peptides derived from food . The exorphins . J . Biol . Chem . **254** : 2446 - 2449 .
- Zucht , H . , Raida , M . , Adermann , K . , Magret , H , H . & Forssman , W . 1995 . Casocidin – H : a casein – alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity . FEBS Lett . **372** : 185 – 188 .
- Zupan , J . , Zambryski , P . 1997 . The *Agrobacterium* DNA transfer complex . Crit . Rev . Plant Sci . **16** : 279 – 295 .

الفهارس

- املاح الصفراء 7, 454, 471
 انبات البوغ 165, 166
 انتاج الهيدروجين 641
 انتساخ 22, 57, 64, 82, 83, 84, 85 ,
 166, 209, 218, 232, 239, 251, 86
 255, 269, 273, 278, 280, 282,
 284, 290, 309, 331, 389, 400,
 424, 477, 493, 607, 679
 انتقال الجينات الافقي 97, 415
 انجذاب 28, 157, 158, 159, 160
 انجذاب الطاقة 159, 160
 انزيم الالدوليز 44
 انزيم القفر 73
 انزيم النسخ العكسي 21, 78, 115, 117 ,
 131
 انزيم كثررة DNA 95, 116, 131
 انزيم كثررة RNA 12
 انزيمات القطع 101, 108, 127, 132 ,
 136, 206, 230, 242
 انزيمات القطع الخارجي 132
 انزيمات القطع الداخلي 101
 انزيمات المزامرة 557
 انفجار الخلية 122, 482
 انقسام خيطي 2
 اوبرون 85, 86, 88, 120, 128, 163 ,
 164, 193, 307, 331, 342, 371,
 614, 649, 650, 678
 اوبرون اللاكتور 85, 86, 88, 120, 128, ,
 614, 678
 اوبرونات الهدم 86, 678
 اوكرالات 349, 350, 475, 476
 اوكسيد الاثيلين 183
 ايض الدهون 249, 398, 409, 460
 ايض الطاقة 248
 ايونات المعادن 313, 317, 337, 356, ,
 363, 368
- ب**
- بايروفات 349, 631
 بروتينات 515, 517, 552, 553, 554 ,
 620
 بروتين الخلية الواحدة 542, 578, 579 ,
 613
- ا**
- ابواغ 17, 591
 اجهاد 171, 199, 203, 221, 224, 231 ,
 232, 241, 243, 244, 245,
 246, 247, 248, 249, 252, 273,
 278, 285, 305, 311
 اجهادات ثانوية 199
 احياء بدائية النواة 144, 198
 احياء علاجية 453
 اختبار ايمس 99
 ادلاف الاكسونات 90
 ارتفاع الدهون 655
 اركيا 222, 251, 616, 617
 ازالة الكبريت 379
 استجابة الاستغاثة 87, 98, 171, 191 ,
 206, 226, 228, 230, 238, 243,
 247, 406, 415, 682, 684
 استجابة الغدد الصم 463
 استذابة 25, 122
 استرات 401, 541
 استماتة 196, 233, 452, 477
 اسهال 471
 اشربة مزدوجة 22, 121
 اصلاح التأشب 96, 98
 اصلاح ضوئي 252
 اعفان 16
 اغذية رواد الفضاء 474
 افراز الانزيمات 545, 547
 اقتران 454
 اقحام القافزات 73
 أكسدة الدهون 235, 236, 237, 238
 239, 454, 564
 الاستالديهايد 44, 177, 588
 الاستجابات العامة 248, 249, 265, 273, ,
 277
 الاسكيمية 199, 282
 الايدز 440, 479, 487, 489, 614, 662
 الايونات السالبة الاوكسجينية 309
 الديهايدات 236, 370

بروتينات الاجهاد 203, 209, 215, 222 ,
224, 294
بروتينات الشرش 457, 458, 459, 466
بروتينات الصدمة الحرارية 80, 193, 199
201, 209, 210, 226, 237, 240,
243, 245, 246, 248, 250, 255,
263, 274, 277, 279, 281, 282,
285, 286, 306, 307, 388, 408,
410, 465
بروتينات الضراوة 70, 493, 497, 498
بروتينات العتمة 70
بروتينات المنصة 206
بروتينات حامضية 190
بروتينات قبل الاستماتة 196
برولين 462
بطاطا 521, 537
بكتريا السل 175, 178, 179, 181, 182 ,
183, 184, 187, 188, 398, 436, 598
بكتريا السيلان 429
بكتريا حامض اللاكتيك 41, 67, 73, 140 ,
162, 316, 441, 450, 451, 452,
453, 455, 456, 457, 458, 460,
462, 469, 470, 475, 544, 564,
565, 574, 581, 584, 585, 586,
589, 591
بكتريوسينات 591
بلازميد الورم 495, 496, 500
بلازميد كبير 317, 400, 512, 516
بلازميدات 71, 72, 74, 76, 173, 290
370, 371, 414, 431, 495, 496,
511, 518, 587, 588
بلازميدات اقترانية 72, 511, 518
بلازميدات صامتة 587
بلازميدات متعددة المضاييف 431
بلاستيك حراري 626
بلح البحر 650
بوغ 163, 166, 176, 181, 271, 516
535
بيبتيدات 6, 55, 153, 255, 267, 384 ,
441, 455, 456, 457, 458, 459,
460, 461, 462, 466, 487, 517,
590, 595, 599, 604, 638

بيروكسيد الهيدروجين 180, 190, 195 ,
224, 234, 235, 238, 241, 242,
244, 245, 246, 247, 248, 275,
278, 284, 395, 557, 590

ت

تارتيرات 349
تأزر 375
تأشب متجانس 104
تبادل منفعة 537
تبرعم 271, 272
تبلور 558, 613, 621
تثبيت الكربون 3, 327
تثبيت النتروجين 160, 309, 321, 322 ,
341, 490, 502
تجرثم 591
تجمع الخلايا 49, 220, 221
تجمعات الرايبوزومات 22
تحسس الخلايا 80, 156
تحسس الزحام 50, 80, 152, 155, 156 ,
168, 173, 189, 194, 224, 415
تحسس الضوء 559
تحلل السكر 165, 183, 398, 566, 588
631
تحليل شكل القطرة 607
تحول 25, 33, 37, 90, 102, 188, 193 ,
195, 216, 225, 237, 291,
301, 303, 370, 417, 424, 477,
479, 480, 497, 498, 500, 501,
515, 517, 548, 564, 574, 628,
637, 638, 683
تحول الجين 90, 683
تحول العائي 25
تحول حيوي 637
تخليق DNA 37, 53, 54, 55, 116 ,
176, 178, 268, 269, 402, 422
تخمير 41, 361, 455, 458, 533, 547 ,
548, 564, 565, 582, 583, 584,
586, 588, 592, 633, 640
تخمير المواد الصلبة 533, 547
تخميرات 356, 563, 581, 615, 622
ترجمة 79, 83, 85, 93, 147, 209, 214 ,
478

ترشيح فائق 611
تركيز الملوحة 296
تسلسل نووي 494
تصلب الشرايين 453, 454, 656
تضاعف مطفر 227
تطفير 137, 147, 224, 229
تطفير تطبيعي 224
تطفير عالي 147
تطفير مفرط 229
تعایش 38, 143, 648
تعديل 77, 212, 213, 258, 265, 266 ,
465, 486, 520, 580, 587
تعدين الذهب 338, 361
تغاير الطور 70, 92
تغذية صخرية 28
تفكيك المواد القاتلة 187
تقديد 564
تقييد 364, 548, 553, 559, 562, 576 ,
577, 621, 642
تقييد الانزيمات 553, 576, 577, 621
تلازن 177
تنافذيات 223
تنظيم التعبير الجيني 76, 77, 78
تنظيم دورة الخلية 54
تواصل الخلايا 155
توالي التوقيع 145
توالي قائد 82
تواليات طرفية 77, 400
تواليات قصيرة 70
تواليات مقلوبة 74, 512
توجيه البروتينات 248

ث

ثنائي اوكسيد الكربون 3, 27, 37, 44 ,
289, 329, 340, 341, 344, 351,
362, 562, 565, 584, 588, 631,
635, 640, 643, 644, 656, 657
ثنائية الجلد 149

ج

جبن منضج 471
جبيلات 589, 618

جدار خلوي 250, 663
جذر الدهن 236
جزر الامراضية 67
جسور سايتوبلازمية 103
جسيم التحلل البروتيني 214, 259
جفاف 613
جلد 661
جهاز قياس الشد 607
جوز القطن 522, 527, 528, 529
جين الإعلان 308, 324
جين مهمد 128
جينات الدفاع المضادة 226
جينات السرطان 84, 121, 476, 477 ,
479, 482, 486
جينات ذات اصول مختلفة 519
جينات قافزة 351, 512
جينات كامنة 206
جينات منظمة 370
جيوب باير 450

ح

حاجز 76, 190, 194, 276
حامض البروبيونيك 473, 582, 585
حامض الستريك 542, 581
حامض الفورميك 340, 466, 559
حامض الفوليك 95, 422, 435, 467
حامض اللاكتيك 41, 43, 67, 73, 140 ,
162, 316, 441, 450, 451, 452,
453, 455, 456, 457, 458, 460,
462, 467, 469, 470, 475, 542,
544, 561, 564, 565, 574, 581,
583, 584, 585, 586, 588, 589,
590, 591

حاملات الايونات 223
حاملات البروتونات 223
حاملات اليود 180
حد العتبة 202

حرفية الأجنحة 515, 516

حفظ حيوي 583
حقيقيات النواة 77, 125, 197, 203, 250, 251, 256, 258, 259, 280, 281,
283, 287, 292, 314, 315, 316,

327, 397, 399, 402, 410, 616,
648, 672
حلب الطحالب 653
حلزونات مزدوجة 14
حليب اسيدوفيلي 472
حليب خض الزبد 585
حليب محمض 586
حمأة النفط 389, 393, 612
حوامض التربة الدبالية 375
حوامض الصفراء 454
حوامض امينية 64, 98, 219, 460, 461,
469, 574, 592, 595, 638
حوامض دهنية غير مشبعة 236
حوامض دهنية مشبعة 239, 595, 654
حوامض عضوية 338, 346, 370, 382,
564, 582, 638

خ

خرائط القطع 114, 120, 139, 140
خزع حيوية 488
خلايا البلازما 448
خلايا الطحال 177, 458
خلايا تائية 446
خلايا حقيقية النواة 143, 144, 212, 552
خلايا مثابرة 192, 232
خلايا محولة 477
خلايا مستذابة 78
خلايا مستلمة 105
خلايا مضيفة 107, 229
خلايا هاجعة 663
خلايا واهية 104, 107
خمائر 62, 328, 330, 472, 589
خميرة الخبز 17, 55, 129, 183, 205,
247, 248, 254, 256, 259, 260,
263, 267, 272, 274, 276, 277,
278, 279, 281, 315, 316, 318,
320, 321, 322, 326, 328, 330,
331, 332, 413, 434, 460, 551,
552, 566, 576, 578, 588, 589,
592, 602, 630, 631, 632, 633,
641, 655, 684
خيوط السدى 624
خيوط العنكبوت 623, 624

د

دقق المواد القاتلة 188
دقق خارجي 191
دمج الجبيلات 411, 589
دهون التريهالوز 596, 598, 611, 614
دهون الرامينوز 384, 596, 597, 598,
605, 607, 608, 611, 612, 614
دهون السفيروز 596, 599, 611, 613
دهون فوسفاتية 384, 386, 595, 597,
603, 610
دورة الخلية 2, 52, 53, 54, 56, 57, 170,
193, 201, 202, 215, 247, 259,
261, 267, 268, 269, 270, 271,
283, 285, 401, 476, 477, 498

ذ

ذاتية التغذية 3, 27, 340, 341, 344,
347, 352, 358, 360, 409, 626

ر

رامينوز 6
رايبوزومات 65, 176, 183
رقم هيدروجيني 182, 342, 344, 380,
444, 517, 541, 612, 615, 616,
617, 620, 621

ز

زئبق 411
زنك 302
زيت السلجم 610
زيوت غير مهدرجة 568

س

سايتوبلازم 3, 23, 403, 499, 500
سيات الاحياء 304
سرطان القولون 442
سرطان الكبد 477
سرطان عنق الرحم 477, 482
سرطانات 468, 477, 484
سكروز 572, 579

سكريات مكوثره , 15, 16, 384, 386,
602, 603 601
سكسينات 349
سلاسل تنفسية 38
سلالة شيروتا 441
سلم الاجسام النووية 195
سليولوز 576
سموم 25, 81, 511, 514, 515, 516,
517, 518, 519, 522, 532, 534, 651
سوط 351

ش

شبكات تنظيم عامة 678
شبه ناضح 10, 33
شجرة الحياة 37, 141, 250, 252, 396,
673, 674
شفرات ختم 62
شفرات مكمل 65

ص

صبغة كرام 49, 143
صمغ الجيلان 576, 577
صمغ الزانثان 542, 576
صناعة الالبان 591
صناعة اللحوم 541, 563, 564, 591

ض

ضراوة 70, 72, 100, 156, 224, 316,
434, 486, 491, 494, 498, 500,
531, 532, 604, 667
ضغط تنافذي 220, 266
ضيقة التحمل 198, 286

ط

طحالب 644, 655, 663
طفرات إزاحة الإطار 227
طفرات الإقحام 73
طفرات أنانية 193
طفرات راجعة 311
طفرات شرطية 121
طفرات عوز غذائي 413, 572, 574, 589

طفيليات 526
طور الارتفاع 27
طور الاستقرار 51, 52, 94, 153, 155,
162, 193, 194, 197, 202, 226,
229, 247, 258, 303, 331, 387,
399, 402, 414, 511, 512, 513,
601, 605, 609, 617, 620, 664,
682, 684
طور الانحدار 47
طور التقابل 53, 56
طور الموت 51, 193

ظ

ظاهرة الاحتباس الحراري 288, 643, 644
ظاهرة التأهل 70, 99, 102

ع

عائي اولي 75
عائيات 102, 120, 130, 137
عامل المجاعة 232, 679
عدد النسخ 72, 434
عضيات 562
علاقات تغذوية 155
علب 17, 444
علم احياء النفط المجهرية 369
عنقوان الطحالب 12
عوامل قاذحة 214
عوامل كبح 503

غ

غازات البيوت الزجاجية 289, 362, 642
غشاء خارجي 143
غشاء خلوي 149
غشاء نووي 2
غشائية الاجنحة 511
غلاف بروتيني 24

ف

فتيتات 367
فجوات 265
فحص التكامل 106, 140

فرمونات 107, 315
فسفرة 40, 41, 43, 58, 157, 165, 201 ,
266, 280, 283, 498, 679
فسفرة تاكسدية 165
فطريات 17, 330, 376, 402, 433, ,
504, 530, 580 445
فعالية التصحيح 682
فوسفيدات 365
فيتامينات 467
فيروس الهربس 468, 482, 651
فيروسات الورم 476, 477, 478, 479 ,
480
فيروسات غدية 483
فيروسات ناقصة 121

ق

قافز اقتراني 75
قافزات 75, 76, 512
قافزات معقدة 76, 512
قبط 102, 157, 171, 177, 183, 187 ,
253, 310, 311, 319, 320, 325,
331, 332, 341, 378, 385, 449, 474
قبط البلازميدات 102
قراءة الشفرات 92
ققيصة 124

ك

كابح 82, 86, 99, 331
كادميوم 302
كاربوهيدرات 44, 474, 579, 597, 602
كاره للماء 297, 317, 595, 604
كاينزات 58, 204, 205, 210, 215, 477
كبريتات 305, 337, 341, 343, 353
كبريتات الامونيوم 341
كبريتيد الهيدروجين 28, 320, 380, 616
كبريتيدات ثنائية 180
كتلة حيوية 52, 381, 382
كحول اثيلي 41, 249, 589
كحولات 370, 561
كروم 302, 325
كروموسومات 60, 67, 76, 77, 130 ,
196, 676

كلوترالديهيد 177
كلوكان 576
كلوكونات 346, 348, 349, 350
كلونة 107, 108, 115, 119, 129, 495 ,
551
كلونة الجينات 107, 119, 495, 551
كليسرول 638
كمون 478
كولسترول 561
كونيديا 533, 535

ل

لبن 465

م

ماكنة الوصيفات 212, 213
مالات 349
مايتوكوندريا 62
مبدأ المراوغة 146
متحسسات 161, 204, 262, 271, 322
متحملة للحموضة 444
متضاعفات 63, 107, 117
متمم 95
مثنخات 542, 543, 576
مثيلة 30, 97, 223, 496
مجاعة 193, 247, 272, 273, 337
مجاعة الكربون 247
مجاميع انتقالية 149
مجسات حيوية 387, 541
محب للحرارة 472
محب للماء 297, 317, 318, 368, 595 ,
604
محب لحرارة متطرفة 345, 346
محب للبرودة 249, 469, 621
محب لملوحة متطرفة 250
محبطي المناعة 480
محليات صناعية 543
مخصبات 359, 390, 657
مخصبات حيوية 657
مخمرات الرفع الهوائي 644

- مدرات البول 459
مدمر 180, 199, 321
مدورات 58
مرض الجذور الشعرية 491
مرض الرعاش 13
مركبات الامونيوم الرباعية 177, 179
مركبات الاوكسجين الفعالة 192
مركبات الثايول 190
مركبات اللاكتام 184
مزامرة 259, 378, 573
مزدوجات الثايمين 90, 95, 252, 405
مزدوجة الكروموسومات 54, 90, 267 ,
271, 272
مسابر DNA 136, 140, 562
مسار التدمير 201
مسار التزاوج 267
مسارات تمثيلية 37
مسارات متوالية 37
مستحلبات حيوية 542
مستضدات 8, 69, 74, 219, 449, 450 ,
483, 487, 510
مستلمات الالكترونات 323, 633
مستلمات العاثيات 6
مشتتات 356, 368, 382, 385, 543 ,
596, 597, 600, 601, 602, 603,
607, 610, 611, 615
مشتتات حيوية 382, 543, 596
مضادات الايض 186
مضادات الهرم 659
مضادات بيبتيديية 186
مضاهيات 158, 186, 422, 572
معادن ثقيلة 334
معامل الإجهاد 301, 304
معامل الإجهاد الدهني 301
معامل علاجي 483
معاهدة كيوتو 643
معطي الالكترونات 319
مفاعلات الغسل الحيوي 353
مفاعلات حيوية 390, 393, 528, 621 ,
644, 652, 653, 661
مفاعلات حيوية ضوئية 653
مقاومة الحشرات 521
- مقاومة المضادات الحيوية 129, 136 ,
428 409
مقاومة لا وراثية 429
مقاومة متداخلة 277, 522
مقاومة وراثية 430
مكتبات الجينومات 197, 552
مكملات 139
مكنون النسخ 410, 439, 666, 669
مكوثرات الفوسفات 3, 330
مكوثرات متعادلة 2
مكورات السيلان البنية 431
مكورات لبنية 587
مكورات مسبحية 584
ممهداث 118, 128, 230, 255, 273 ,
290, 307, 388, 439, 495, 520, 522
منحنى النمو 47, 48, 52
منذرات 240
منظفات 612, 621
منظم 80, 82, 85, 97, 163, 224, 274 ,
323, 331, 668
مهجرات الخلايا 446
مواد الايض الاساسية 35, 37
مواد ابيض اولي 52, 566, 574
مواد ابيض ثانوي 184, 417, 423, 424
مواد جاذبة 29, 30, 157, 159
مواد مسرطنة 369
مواد مطفرة 236
مواد منفرة 159
مواقع الالتصاق 122
موت الخلايا المبرمج 191
مولدات البيروكسيد 180
مولدات الخلايا 640
مولدات الميثان 617, 636, 637, 640 ,
641, 678
- ## ن
- ناقلات 157, 160, 223, 253, 271 ,
279, 310, 314, 315, 316, 317,
318, 320, 321, 326, 332, 333,
369, 405, 434, 507
نترات 667
نتروجين 38, 183, 390
نحاس 302, 357

نخر 448, 483, 492

ندبة الولادة 16

نظام اصلاح عدم التلاؤم 96

نظام الاشارة ذو المكونين 156

نظام ايمس 91

نظام تثبيت النتروجين 321, 341

نقاط السيطرة 48, 54, 56, 476

نقطة التقيد 55

نقل الاشارات 81, 156, 157, 159, 160 ,

161, 198, 204, 205, 408

نكازاكي 470

نكهة 177, 538, 541, 542, 543, 564 ,

574, 575, 587, 588

نمط طبيعي 90

نمو المجموع البكتري 202

نواضح اللبن 458

نواقل 32, 88, 107, 117, 118, 120 ,

123, 125, 126, 127, 128, 129,

130, 131, 132, 322, 329, 331,

411, 497, 588, 676

نواقل الاستبدال 123

نواقل الاقحام 123, 130

نواقل التعبير 128

نواقل الفطريات والخمائر 129

نواقل الكلونة 88, 131

نواقل مكوكية 118, 588

هـ

هايفات 16, 60, 271, 535

هايفات خضرية 16

هايفات كاذبة 271

هبوط السكر الفعال 592

هشاشة العظام 455

هندسة البلاستيدات 500

هندسة وراثية 500

هيدروكاربونات 386, 644, 663

هيروشيما 470

و

واسعة التحمل 198, 286

واسمات الورم 476

واسمة وراثية 76

وصيفات 209, 215, 218, 252, 408

وقت الجيل 48, 49, 50, 290, 568

وقود حيوي 630 ,

ي

يورانيوم 324, 335, 344, 351, 353,

355, 356, 357, 365, 366, 394, 631

يوربا 237, 238, 285, 309, 329, 559

, 560, 609, 615

يوكالت 468

A

- A. calcoaceticus* 576, 597, 601, 603, 608
 ABC signature 315
 ABC transporters 275
 Abortive transduction 103
 Acceleration phase 47
 Accepting site 65
 ACE 458, 460, 461
 Acetaldehyde 44, 372
Acetobacter aceti 110, 542, 544
Acetobacter agrobacterium 576
Acetobacter methanolicus 346
 Acetogens 637
Acidianus ambivalens 345, 358
Acidianus brierleyi 345
Acidianus infernus 345, 358
Acidimicrobium ferrooxidans 346
Acidiphilium angustum 346
Acidiphilium cryptum 346
Acidiphilium symbioticum 346
Acidobacterium capsulatum 347
Acidocella sp 347
 Acidogens 637
 Acidolysis 338
Acidomonas methanolica 347
 Aciduric 444
Acinetobacter calcoaceticus 382, 384, 386
Acinetobacter radioresistens 384
Acinetobacter spp 384, 629
 Actin 14, 213
Actinomucor sp 349
 Adaptors 114
 Adenoviridae 23
 Adhesins 16
 Adjuvant 219
Aeromonas sp 386
 Aerosol vaccine 487
 Aerotaxis 159
Agrobacterium 66, 316, 379, 490, 491, 494, 495, 498, 499, 500, 520, 542, 543, 576
Agrobacterium radiobacter 542, 543
Agrobacterium tumefaciens 490
 AIDS 20, 436
 Alarmons 163, 232
 Alasan 384
Alcaligenes 317, 352, 365, 381, 386, 543, 576, 577, 626, 627
Alcaligenes faecalis 543, 576
Alcaligenes latus 386
 Aldehyde 373, 374
 Algaenan 643
 Algal bloom 12, 644
 Algorithms 666
 Alkaliphiles 616
 Alkylating agents 183, 275, 682
 Allosteric proteins 45
 Allosteric site 45
Alternaria sp 349
Alteromonas sp 386
 Altruistic apoptosis 196
 Aminoglycosides 8, 170, 186, 421, 434
Anabaena cylindrica 392, 655
Anagrapha falcifera nuclear polyhedrosis virus 529
 Anamorphic 17
 Anaphase 53, 59
 Anti-apoptotic 197
 Antibioassay 443
 Antibiotics 417
 Antichaperone autoantibodies 218
 Anticoagulant 489
 Antifeedants 532
 Antimony 322
 Antiparallel 61
 Antiport 32
 Antisense RNA 84, 481, 482

Ap repair system 96
 Aphids 511
 Apoptosis 24, 191
 Apoptosomes 283
 AppppN 238, 239
Araneus diadematus 623
 Archaea, 2, 10, 144, 145, 150, 670
Armillaria spp 537
 Arsen 319
Arthrobacter parafineus 384
Arthrobacter sp 347
Arthrospira 658
Ascoidea hylacoeti 575
 Ascomycetes 17
 Ascomycotina 17
Ashbya gossipii 542
Asp. foetidus 579
Asp. nidulans 567
Asp. niger 175, 581, 582
Asp. terreus 568
Aspergillus 349, 473, 531, 542, 544, 553, 554, 555, 556, 568, 579, 600
Aspergillus awamori 349
Aspergillus fisheri 568
Aspergillus fumigatus 349
Aspergillus niger 349, 542
Aspergillus ochraceus 349, 568
Aspergillus spp 542, 579
 Astaxanthin 660, 661, 662, 663
 Atopic diseases 450
 Atopic eczema 453
 ATPases 236, 310, 316, 317, 320, 321, 322, 324, 326, 327, 332, 405, 493, 674
 Attenuation 82
 Attractants 29
Aureobacterium liquifaciens 347
Aureobasidium pullulans 576
 Autocrine 153, 154
 Autophagy 255
 Autotroph 27
 Avidin 117

Azadirachta indica 508
Azoarcus sp. strain EB1 375
Azoarcus sp. strain T 375
Azoarcus tolulyticus Td15 375
Azoarcus tolulyticus To14 375
Azotobacter chroococcum 324, 537
Azotobacter vinelandii 541, 576, 577

B

B- cells 20
B. bassiana 530
B. brevis 418, 597, 599, 603
B. brongniartii 530
B. cereus 503, 510, 512, 516, 543, 552
B. licheniformis 381, 542, 543, 596, 600, 609
B. megaterium 579, 626
B. polymyxa 418, 543, 597, 599
B. subtilis 99, 148, 156, 158, 162, 179, 214, 233, 314, 398, 543, 574, 592, 596, 597, 606, 610, 626
Bacillis pumilis 384
Bacillus 102, 110, 162, 175, 347, 381, 382, 384, 386, 396, 418, 504, 523, 553, 554, 555, 616, 619
Bacillus brevis 384
Bacillus coagulans 347
Bacillus licheniformis 347, 382, 384
Bacillus megaterium 347
Bacillus polymyxa 347, 382, 384
Bacillus subtilis 384, 386, 418
 Bacitracin 186, 418, 420
 Bacteriophage 587
 Basidiomycetes 17, 491
 Basidiomycotina 17
 Basidium 17
Beauveria bassiana 530, 534
Beauveria brongniartii 530
 Betain 223, 253

- Bif. bifidum* 465, 466, 473
Bif. infantis 465, 473
Bif. lactis 465, 466, 471
Bif. longum 465, 466, 471, 474
Bifidobacterium 451, 452, 473, 586
 Binary – vector system 495
 Bioaccumulation 364
 Bioaccumulator 364
 Biocatalysis 544
 Biochips 488
 Biocides 174
 Biocomposting 635
 Bioconversation 544
 Biocorrosion 337, 653
 Biodesulfurization 379
 Biodispersan 384, 597, 601, 611
 Biodispersion 356
 Bioemulsan 601
 Bioemulsifiers 291
 Bioengineering 665
 Bioethanol 643
 Bioethics 140
 Bioextraction 337
 Biofertilizers 657
 Biofilms 152, 167, 377, 392
 Bioflocculation 363
 Bioflotation 363
 Biofortification 138
 Biogas 635
 Biogenic amines 565
 Biohydrometallurgy 337
 Bioindicators 203
 Bioinformatics 140, 665
 Bioleaching 291, 337, 338, 353
 Biolistics 132
 Biological response modifiers 422
 Bioluminescence 152, 295
 Biomarkers 299
 Biomining 291, 337
 Biooxidation 338
 Biopiling 390
 Bioplastics 626
 Biopol 626, 627
 Biopreservation 591
 Bioprospecting 669
 Biopsies 488
 Biorecovery 337
 Bioremediation 161, 291, 363
 Biosensors 307, 387
 Biosorption 337
 Biosurfactants 367, 594
 Biotransformation 369, 490, 544
 Biotroph 424
 Bioventing 390
Blakeslea trispora 542
Blastochloris sulfovirdidis 375
Borrelia 66, 100
 Botrycocenes 644
Botrytis cinerea 535, 537
 Bovine spongiform 13
Brassica 426, 506, 521, 583
Brev. flavum FAI-30 572
Brev. lactofermentum 572, 573
Brev. lactofermentum 487 573
Brevibacterium viscogenes 382
 Broad host range 71
 BTEX 387, 389, 393
 Bud scar 16
 Bulking agents 592
 Buoyant density 13
- ## C
- C. albicans* 78, 175, 191, 254, 272, 316, 434
C. curvata 567, 568
C. glutamicum 572, 573, 574
C. glutamicum KY9276 572
C. glutamicum Pr-20 573
C. lipolytica 568, 602
C. utilis 575, 579, 589, 613, 630
 Ca- dipicolinate 166
 Cabbage army worm nuclear polyhedrosis virus 529
 Calcineurin 271
 Calvin cycle 37

- cAMP 80, 86, 87, 224, 273, 285, 678
Campylobacter 159, 638, 661
Candida 16, 17, 179, 350, 384, 542, 557, 563, 579, 589, 597, 599, 622
Candida albicans 17, 179
Candida curvata 579
Candida famata 563
Candida lipolytica 350, 384, 542, 597
Candida tropicalis 384, 597
Candida utilis 384
Capnocytophaga spp 384
 Carbomycin 417
 Carbonylation 237
 Casocidin 456
 Casokinins 456
 Casomorphins 456
 Casoplatelins 456
 Caspase proteases 195
 Casxins 456
 Catabolite operon 86
 Catabolite repression 32
 Cataract 209
 Catheters 168
 cccDNA 132
 CD4⁺ 452, 565
 CD8⁺ 452
 cDNA 115, 121, 136, 552, 588
 Cell envelope 3
 Cell membrane 7, 9
 Cell tropism 20
Cephalosporium acremonium 418, 419
Cephalosporium spp 579
Ceratocystis moniliformis 543
Ceratocystis spp 543
 Cervical cancer 477
Chaetominum cellulolyticum 579
Chaetominum globosum 568
 Chaperone 212, 217
 Check points 48, 54, 200
 Chemiosmotic 32
 Chemolithotroph 35
 Chemostat 51, 307
 Chemotaxis 28, 157
 Chimera 151
 Chimeric genes 519
 Chiral petrochemicals 383
 Chitin 177
Chlamydia 117, 137, 676
Chlamydomonas reinhardtii 655
 Chloramphenicol 417, 432
Chlorella vulgaris 655, 659
 Chlorophyta 175, 643
 Chloroplast 372
 Christian Gram 143
 Chromium 325
Chromobacterium violaceum 155, 347
 Chromosome walking 136, 676
Cl. difficile 450, 467, 471
Cl. tetani 72
Cladosporium resinae 349
Cladosporium sp 349
 Clone 136, 152
Clostridium acetobutylicum 382, 383
Clostridium pasteurianum 382
Clostridium spp 382
 CMC 367, 368, 385, 596, 600, 602, 607, 608, 610, 612
 CMV 520
 Co A 401
 Cobalt 329, 330
 Cochaperones 208, 216
 Coding sequence 93
 Codling moth granulosis virus 529
 Codon preference 146
 Coencyte 16
 Coenzyme Q 33
 Cohesive sites 122
 Coleoptera 511, 519
 Coliform 450

Colletotrichum gloeosporioides 537
Comamonas testosteroni 347
 Combinatorial chemistry 502
 Compatibility 71
 Competence 70, 99, 102
 Competent cells 101
 Complement 106, 448
 Complexolysis 338
 Composite transposons 512
 Conidia 16
 Conjugative plasmid 71
 Consortia 46, 152
 Copper 328
 Copy number 71
 Corepressor 82
Coriolus versicolor 349
 Correndonuclease 95
 Corynebacteria 3, 153
Corynebacterium fasciens 382
Corynebacterium glutamicum 542, 543, 552
Corynebacterium lepus 384, 597
Corynebacterium petrophilum 386
 Cosmeceutics 613
 Cosmids 125
 Cosmopolitan species 670, 671
 Cotranslational chaperoning 214
 Covellite 339, 353, 357
 Crenarchaeota 151
Crenothrix sp 347
 Cristae 15
 Cryoprotectants 464
Crypthecodinium 657, 658
 Cryptic plasmids 73
Cryptococcus terricolus 567
Cryptococcus neoformans 78
 CSTR 360, 361, 528
Cunninghamella elegans 567
Cunninghamella echinulata 568
 Cyanobacteria 2, 149
 Cyclases 408
 Cyclohexidine 196

Cyclopropyl fatty acids 303
 Cycloserine 186, 418, 419
 Cyclosporine 17, 286, 498
Cylindrocladium scoparium 537
 Cystic fibrosis 92, 315
 Cyt.P450 383
 Cytokines 153
 Cytokinesis 52
 Cytomegalovirus 468

D

D. geothermalis 395, 396, 410, 411, 412
D. grandis 395
D. murrayi 395
D. radiophilus 395
Debaryomyces hansenii 254, 563
Debaryomyces kloeckeri 579
Dechloromonas sp. strain JJ 375
Dechloromonas sp. strain RCB 375
 Decline phase 51
 Deconjugation 454
 Defective viruses 121
 Defesin 440
 Degeneracy codons 146
 Degenerate codons 62
Deinococcus 149, 227, 291, 395, 398, 410, 411
Deinococcus radiodurans 227
 Dematiaceous 17
 Dental plaques 168
 Dentric cells 446
 Derepression 82
 Desizing 622
 Desorption 356
 Destruixins 532, 534
 Desulfonases 379
Desulfobacterium cetonicum 376
Desulfobacula toluolica To12 376
 Dialysates 458
 Diaminopimelic acid 6, 399, 416
 Diaphorase 240

Diatomes 15
 Didermata 149
 Dienes 235
 Dimethyl sulfoxide 102
 Dimorphism 271
 Dioxygenases 371, 383
 Diptera 511
 Diuretics 459
 DNA glycosylase 96
 DNA mutases 683
 DNA polymerase 78, 95
 DNA probes 136
 Domain 149
 Drosophila 281, 401
 DSBs 396, 402
 dsDNA 11, 21, 22, 121, 527
Dunaliella salina 653, 654, 655

E

E. coli K12 572, 627
 Eclipsed period 26
 Ectoine 223
 Edible vaccine 139
 Effectors 81, 166
 Electroporation 102, 132
 Embden Meyerhof pathway 41
 EMP 41, 44, 398, 407, 631, 638
 Emulsan 356, 384, 385, 576, 597, 600, 601, 608, 611, 612
 Encystment 167
 Endemic species 670
 Endocrine response 463
 Endocyst 167
 Endocytosis 20
Endomycopsis vernalis 567
 Endoplasmic reticulum 14
 Endosomes 20
 Endospore 165
 Endosymbiosis 143
Endothia 554
 Enhancers 88, 130, 496
Enterobacter aerogenes 382, 383
Enterobacter agglomerans 347

Enterobacter cloacae 347
Enterococcus faecalis 453
Entomophthora coronata 567
 Epitope 136
 Erwinia 156, 316
 Erythromycin 186, 417
 ESBLs 432
Escherichia 7, 67, 111, 389, 553
Escherichia coli 7, 111, 389
Escherichia coli DH5 389
Eubacterium 475
 Euryarchaeota 151, 314
 Excision repair 95, 404
 Exocisionase 89
 Exons 77, 117
 Exosporium, 165
 Exothermic 241, 355
Exporters 316
 Expression vectors 128
 Extragenic suppression 94

F

F plasmid 103
 FAE 450, 451
Ferroplasma acidiphilum 345
 Fertility plasmid 72
 Fibronectin 69
 Filamentation 247, 271
 Filamentous phages 124
 Firmicutes 143, 314, 673
 FISH 295, 673
 Flaviviridae 23, 477
 Flavivirus 21
 Flavoproteins 165
 Focal metabolites 35
 Formic acid 466
 Formulated foods 592
 Forward mutants 93
 Fructose 593
 Functional foods 540, 653
Fusarium bulbigenum 568
Fusarium graminearum 542, 580
Fusarium moniliform 537

Fusion biopharmaceuticals 489

G

Galena 354
Gallionella sp 347
 GALT 448, 449
 Gel electrophoresis 116
 Gellan 577
 Gene cloning 107
 Gene conversion 90, 683
 Gene therapy 132, 487
 Generalized recombination 73
 Genetic engineering 665
 Genetic repertoire 68
 Genome libraries 197
 Genome reshuffling 148
 Genome sequence 12
 Genomics 498, 666, 667
 Genotoxic 415
 Genotype 62
 Gentamycin 186, 417
Geobacter grbiciae TACP-2T 376
Geobacter grbiciae TACP-5 376
Geobacter metallireducens GS15 376
Geotrichum candidum 557, 568
 Geovar 670, 671
 Germination 164, 190
Giardia lamblia 77
Gibberella fugikuroi 539
 Gibberellins 539
Gliocladium deliquescens 579
Gliocledium spp 579
 Global regulation 81
 Global transcriptional response 97
 Glucan 423
Gluconobacter oxydans 542
 Glucosamine 6, 40, 601, 602
 Glucuronic acid 6
 Glutamine 40, 45, 147, 150, 605
 Glutamine synthetase 40, 45, 147, 150, 605

Glutaraldehyde 177
 Glycan 271
 Glycocalyx 4, 156
 Glycolysis 165, 183, 398, 566
 Glyphosate 535
 Golden rice 138
 Golgi apparatus 14
 Gracilicutes 143
 Gramicidin S 384, 418
 Grapefruit 545
 GRAS 443
 Great plate count anomaly 672
 Green chemistry 504
 Green sulfur bacteria 149
 Greenhouse effect 642
 GroEL 210, 211, 212, 213, 240, 243, 245, 246, 251, 257, 413
 GroES 211, 212, 213, 245, 246, 251, 257, 413
 Group translocation 32
 GrpE 211, 213, 216, 217, 250, 251, 257

H

Haemophilus 70, 101, 111, 112, 666
Haemophilus influenzae 70, 666
 HAIs 429
 Haloalkaliphiles 616
Halobacterium cutirubrum 254
Halobacterium halobium 253
Haloferax mediterranei 254
Halomonas eurihalina 384, 603
Hansenula anomala 579
 Hardware 674
 Hayflic limit 196
 Heat shock proteins 209
 Helicase 410
Helicoverpa zea nuclear polyhedrosis virus 529
 Herpes simplex 468, 482, 483, 614
 Herpesviridae 23

Heterocysts 38
 Heteroduplexes 230, 683
 Heterokaryon 60, 538
 Heterologous proteins, 128, 661
 Heterotrophic 27
 Hfr 73, 104, 105, 106
 High throughput screens 438
 High velocity projectiles 520
 Hirudin 489
 HIV 19, 20, 328, 477, 479, 480, 487, 662
 hnRNA 84
 HOG pathway 263
 Holdases 216
 Homofermentative 41
 Homologous recombination 56
 House cleaning 409
 Hsp33 216, 243
 Hsp60 150, 210, 211, 212, 217, 248, 251, 255, 256, 257
 Hsp90 210, 214, 218, 255, 256, 258, 282, 283, 408
 Hsps 193, 201, 214
 Hybrid replicon 107
 Hybrid vector 107
 Hydrogenases 318, 329, 330, 508
 Hydrogenosome 15
 Hydroxymethyl cytosine 78
 Hymenoptera 511
 Hypertonic stress 201
 Hypochlorites 179
 Hypoosmotic 262
 4
 Idiolites 52
 Idiophase 52
 IMD 669
 Immobilization 479
 Immunophilins 286
 Importers 315
 Importins 249
 Inclusion bodies 24, 209
 Incompatible group 71
 Indels 145

Innate 446
Inocybe corydalina 575
 Insertion mutation 73
 Insertion sequence 69, 73
 Insertion vectors 123
 Integrase 89, 512
 Intergenic regions 400
 Interphase 52
 Intragenic suppression 94
 Introns 76, 281
 Inverted repeats 19, 74
 Involution form 47
 Ionophores 223, 420
 IR 19, 74
 Ischemia 199
 Isoprenoid diether 11
 Isracidin 456
 Iterons 72

J

JNK 215, 277, 283

K

Kanamycin 186, 417
Kingella kingae 347
 Klenow 115, 131
Kluyveromyces fragilis 457, 579
Kluyveromyces lactis 575
 Kuru 13

L

Lactalbumin 456
 Lactic acid bacteria 441
Lactobacillus 347, 384, 441, 453, 457, 458, 469, 475, 576, 579
Lactobacillus acidophilus 347
Lactobacillus bulgaricus 579
Lactobacillus fermentii 384
Lactococcus lactis 316, 434, 467, 473, 574
 Lactoferricin 456, 459

Lactoferrodoxins 456
 Lactokinins 456
 Lag phase 47
 Laminin 69
 Lantibiotics 590
 Latent 24, 27, 478
 Latent infection 24
 Latent period 27
 Lateral gene transfer 99, 674
 Latex, 628
Lb. acidophilus 443, 444, 451, 452, 455, 458, 465, 466, 471, 472, 473, 579, 586, 591
Lb. acidophilus La1 452
Lb. bulgaricus 449, 451, 452, 453, 466, 467, 586
Lb. bulgaricus 1489, 452
Lb. casei 443, 451, 452, 455, 458, 465, 466, 468, 471, 473
Lb. casei B ATCC 11578 452
Lb. casei LC-H2, 473
Lb. curvatus 563, 584
Lb. helveticus 457, 458, 459, 460, 466, 469
Lb. paracasei 465, 466, 471, 565
Lb. plantarum 466, 544, 563, 564, 584, 588
Lb. rhamnosus GG, 443, 466, 467, 471
Lb. sakei 451, 563, 584
 Lead 324
 Leader sequence 82
Leconostoc mesenteroides 576
 Lepidoptera 511
Leptospirillum 339, 340, 341, 345, 347, 355, 358, 359, 361
Leptospirillum ferrooxidans 339, 347
Leptothrix discophora 347
Leuconostoc cremoris 542
Leuconostoc mesenteroides 382, 542
Lex A 406

Ligase 96, 131
 Lincomycin 186, 418
Lipomyces lipofer 567
Lipomyces starkeyi 567
Lipomyces tetrasporus 567
 Liposan 384, 597, 600, 602, 611
 Lithotroph 28
 Log phase 47
 Luciferase 212, 308, 388
LuxCDABE 307
 Lysogeny 25
 Lytic growth 25
 Lytic replication 127

M

M cells 450, 451
M. flavoviride 530, 534
 M13 78, 120, 124, 125, 126
 Mabinlin 593
Macrophomina phaseolina 537
 MACs 130
 Magnesium 326
 Magnetite 3
 Magnetotaxis 3
Malassezia furfur 17
 Mallophaga 511
 MALT 448
 Manganese 326
 Manganous chloride 91
 MAPK 205, 260, 262, 263, 266, 267, 268, 269, 271, 272, 277, 280, 283
 Mast cells 448
 Mat 174, 392
 MCPs 29, 30, 370
 MDR 315, 432, 434
 Meiosis 17
 Membrane potential 159
 Mercury 323
 Metabolic quotient 289
 Metabolome 666, 669
 Metachromatic granules 3
Metallogenium sp 347

- Metallosphaera prunae* 345
Metallosphaera sedula 345
 Metallothioneins 275
Metarhizium 530, 531, 532, 533
Metarhizium anisopliae 530
Methanobacterium sp 383
Methanococcus, 112, 222, 253, 254
Methanosarcina acetivorans 254
Methanosarcina mazei S-6 254
Methanosarcina thermophila 253
 Methionine sulfoxide 237, 239, 241
 Methylases 405
 MHC 256, 480
 Micelle 367, 385, 596
 Microalgae 568, 652, 653
Microbacterium ammoniphilum 572
 Microdeletion 92
 Microfilaments 14
 Microinsertion 92
Micromonospora purpurea 417
 Microsatellite 77
 Microtiter plates 117
 Microtubules 14, 423
 MICs 188
 Minisatellite 77
 Mismatch repair 96, 404, 405, 679
 Miso 470
 Missense mutants 93
 Mitogen 204
 Mitomycin C 25, 409
 Mitosis 52
 MMR , 96, 101, 199, 225, 226, 228, 229, 230, 231, 405, 414, 415, 679, 680, 682, 683, 684
 MOA 439
 Molecular chaperones 212
 Monoclonal antibodies 136, 258
 Monooxygenases 370, 379, 392
Mortierella vinacea 568
 mRNA 21, 22, 37, 64, 65, 76, 78, 79, 82, 84, 85, 93, 117, 128, 136, 209, 215, 224, 264, 265, 266, 278, 281, 421, 481, 482, 513, 520, 669
 MRSA 429
Mucor 17, 349, 554, 557, 567, 568, 576
Mucor albo-ater 567
Mucor circincelloides 568
Mucor muceus 567
Mucor racemosus 349
Mucor ramannianus 568
Mucor spinosus 567
Mucor spp 557 576
 Mucosa 448, 451
 Multidrug efflux 275
Mucor rouxii 175
 Mushroom 17
 Mutator genes 91, 231, 682
My. genitalium 69, 152
 Mycobacteria 153, 176
Mycobacterium sp 374, 384, 596
Mycobacterium tuberculosis 69
 Mycoparasitism 535
 Mycopesticides 504, 529
 Mycophages 440
 Mycoplasma 6, 62, 66, 69, 141, 143
 Mycorrhizae 537
 Myosin 14
- ## N
- N. erythropolis* 597
 N-acetylmuramic acid 6
 NADH 38, 40, 41, 43, 44, 233, 234, 236, 239, 240, 241, 242, 559, 631, 638
Nannochloropsis 658, 659, 660, 661
 Nanotechnology 489
 Naphthalene 371, 372, 373, 374, 375, 376, 383

Necrosis 195, 492
 Neem 508
Neisseria 100, 101, 112, 320
 Neomycin 417
 Neoplastic 477
Nephila clavipes 623
 Neurons 13
 Neutral polymers 2
 Nikase 227
 Nikel 329
 Nisin 543, 586, 591
 Nitrogenase 38
Nitzschia 658
Nocardia amarae 386
 Northern blot 136
 Novobiocin 186, 418, 419
 NTG 396
 Nuclear matrix proteins 282
 Nucleases 95
 Nucleolus 14
 Nucleosomal ladder 195
 Nucleotide excision repair 95
 Nutraceuticals 441, 656
 Nystatin 188

O

Ochrobacterium anthropi 347
 OCT plasmid 370
 Oily sludge 390
 Oligotroph 293, 648
 Oncogenes 84, 476
 Oncolytic viruses 482, 483
 Operator 86
 Opiate 455
 Opioid 462
 Opsonic antibodies 172
 Organelles 14
Orgyia psuedotsugata nuclear
 polyhedrosis virus 529
 Orphan drugs 439
 Orthomyxoviridae 23
 Osmolytes 220
 Osmosensors 262

Osmotic pressure 202
 Osteoporosis 455
 Outer membrane 4, 5
 Overlapping sequences 22
Oxalobacter 475
 Oxidative phosphorylation 33
 Oxyanions 309, 325
 Oxygenases 381
 Ozonides 235

P

Pactamycin 417
Paecilomyces fumosoroseus 530
Paecilomyces variotii 349
 Palindromic sequence 108
 Palisade 47
 Panmicticism 143, 148
 Paracrine 154
 Paramyxoviridae 23
 Parasexual cycle 59
 Parasporal body 511
 Paroviruses 21
 Particle gun 132
 Parvoviridae 23
 Passive diffusion 176
 PBPs 419, 433
 PCR 11, 116, 121, 137, 293, 297,
 486, 667, 673
Ped. acidilactici 563
Ped. pentosaceus 563
Pen. decumbens 575
Pen. nalgiovense 563
Penicillins 418
Penicillium chrysogenum 349,
 418, 543
Penicillium funiculosum 349
Penicillium notatum 350, 417
Penicillium simplicissimum 350
Penicillium sp 349, 384, 557, 579
 Peptidoglycan 4, 5, 192
 Peracetic acid 180, 181
 Perferryl 235, 236
 Performed antifungal 424

- Peroxygens 180
 PHA 626, 628
 Phaeophyta 175
 Phage conversion 25
 Phage typing 25
 Phagmids 126
 Phagocytes 195
 Pharma foods 540
 PHB 413, 626, 627, 628
 Phenazine 155, 508
 Phenol oxidases 505
 Phenotype 62
 Phenotypic lag 101
 Phenylketone urea 592
 Phoneme 667
 Phosphoenol pyruvate 35, 41, 157
 Phosphotransferase 32
 Photoreactivation 95
 Photosensors 161
 Phototaxis 159
 Phototrophic bioreactor 653
 Phycomycetes 17
 Phytoalexins 424, 505
 Phytoanticipins 424
 Phytochelatins 275
Phytophthora infestans 537
Phytophthora spp 537
 Phytoremediation 325, 364
 Phytotoxins 653
Pichia spartina 579
 Picomole 153
 Picornaviridae 23
 Picornavirus 21
Picrophilus oshimae 346
Picrophilus torridus 346
 Pili 4, 68, 70
Pityrosporum orbiculare 17
 Plankton 156
 Plasma cells 448
 Plasmodium 18, 434, 667
 Pleiotropic 93, 249, 277
 PLFAs 297, 300, 301, 303, 304, 345
 pmf 32, 34, 35, 160, 166, 182, 333, 340, 434, 618, 640
 Polarity 85
 Poliovirus 20
 Polyadenylation 131
 Polyethylene glycol 102, 497, 587
 Polyhedral 24
 Polymerase 116, 399
 Polymyxin 186, 418
 Polyphasic taxonomy 149
 Polysomes 421
 Polyunsaturated fatty acids 235, 657
 Porins 7, 176, 433
Porphyridium 655, 658, 663
Porphyridium cruentum 655
 Postreplicative repair 98
 Poxviridae 23
 ppGpp 87, 162, 224, 232, 233, 408, 679
 Prebiotics 454
 Predation 345
 Prefoldin 213, 217, 254
 Presistors 51, 171
 Primary metabolites 52
 Probiosis 455
 Probiotics 441, 442
 Prodrug 440
 Proferin 586
 Proline isomerases 256, 259
 Promoter 64
 Promutagens 585
 Propagules 536
 Prophase 53
Propionibacterium 326, 347, 469, 471, 542, 569, 582
Propionibacterium acnes 347
 Proproteins 546
 Proteasome 209, 214, 215
 Protein biogenesis 255
 Proteome 666, 667
 Proteomics 667
 Proteus 113, 150, 155, 554

Protoplasts 132, 419
 Prototroph 91, 588
 Protoxin 513
 Protozoa 179
Ps. aeruginosa 92, 155, 156, 168,
 170, 179, 182, 184, 225, 290,
 365, 366, 378, 462, 468, 577,
 596, 597, 598, 600, 604, 605,
 608, 684
Ps. fluorescens 184, 325, 388,
 510, 518, 519, 521, 597, 613
Pseudomonas 7, 29, 173, 184,
 290, 324, 331, 347, 348, 356,
 364, 368, 370, 372, 373, 374,
 375, 378, 381, 382, 384, 386,
 389, 411, 416, 432, 508, 510,
 514, 541, 554, 555, 557, 577,
 582, 583, 596, 598, 609, 614,
 616, 622, 650
Pseudomonas aeruginosa 7, 384
Pseudomonas cepacia 347
Pseudomonas fluorescens 384, 389
Pseudomonas fluorescens HK44
 389
Pseudomonas putida 29, 348, 372,
 373, 389
Pseudomonas putida B2 389
Pseudomonas putida RB1401
 389
Pseudomonas putida TVA8 389
Pseudomonas rubescens 382
Pseudomonas sp 373, 375, 596
Pseudomonas tralucida 384
 Pseudoreversion 93
 Pseudoviruses 121
 Psoralen 284
Psychrobacter glacincola 348
 Psychrophiles 249
 Pulmonary surfactant 614
 Purines 61
 Purple bacteria 33, 150
Py. furiosus 253
 Pyrethroids 508

Pyrite 339, 354, 355
Pyrococcus AL585 254
Pyrococcus woesei 253
Pythium spp 537
Pythium ultimum 567

Q

Quorum sensing 50, 152

R

R factor 72, 76, 431
 R plasmid 72
R. erythropolis 600, 614
 Radiography 120
 Radiolysis 234
 Radionuclides 394
 Radiophiles 411
 Rapeseed 610, 628
 Reactive hypoglycemia 592
 Reactive oxygen species 192, 234
recA 69, 88, 90, 96, 193, 226,
 243, 246, 247, 403, 404, 405,
 415, 431, 682
 Recombinant chromosome 60
 Recombination 88, 96
 Recombination repair 96
 Redoxylsysis 338
 Reducing equivalents 159
 Regulon 80, 247, 668, 678, 679
 Rennet 588
 Reoviridae 23
 Reovirus 21
 Repairosome 95
 Repellants 29
 Replacement vectors 123
 Replica plating 92
 Replicative factor 124
 Reporter gene 101, 307
 Repression 48
 Repressors 82
 Reservoir souring 380
 Restriction enzymes 108

Restriction maps 114, 120, 139
 Restriction point 55
 Retinoblastoma 57, 477
 Retinopathy 219
 Retroviridae 23, 477
 Retroviruses 19, 78
 Reuterin 590, 591
 Reverse transcriptase 78, 478
 Revertants 93
 Reverted mutants 93
 Rhabdoviridae 23
 Rhamnolipids 597
Rhizobium 38, 155, 316, 408, 503, 519
Rhizobus spp 579
Rhizoctonia solani 510, 535, 537
Rhizopus 17, 350, 557, 568, 610
Rhizopus arrhizus 557, 568
Rhizopus japonicus 350
Rhodococcus aurantiacus 386
Rhodococcus erythropolis 379, 384, 596
Rhodococcus rhodochrous 386
Rhodococcus rubropertinctus 386
 Rhodophyta 175
 Rhodopsins 259
Rhodospirillum centenum 160
Rhodosporidium toruloides 567
Rhodotorula glutinis 384, 567
Rhodotorula graminis 384
Rhodotorula sp 350
 Ribosome binding site 65, 128
 Ribosomes 64
 Ribothymine 150
 Ribozyme 65
 Rifampin 186, 418
 RNA splicing 278
 RNAase H 84
 RNAP 12, 21, 64, 81, 82, 83, 85, 86, 92, 147, 150, 162, 163, 196, 211, 214, 232, 278, 306, 323, 421, 433, 513, 674, 679
Rosellinia necatrix 537

Ruberdoxin 370
Ruminococcus 641
 Rusticyanin 342, 351

S

S. aureofaciens 417
S. cerevisiae 77, 175, 177, 183, 184, 195, 196, 247, 254, 314, 366, 460, 544, 576, 579, 630, 632
S. garyphalus 418
S. halstidii 417
S. kanamyceticus 417
S. lincolnesis 418
S. mediterranei 418
S. niveus 418
S. orientalis 418
S. pactum 417
S. rouxii 579
S. spectabilis 417
S. tenebrarius 417
Saccharomyces 54, 350, 402, 553
Saccharomyces cerevisiae 54, 350, 402
Sal. typhimurium 157, 229, 244, 245, 246, 305, 316, 326, 332, 415, 453, 468, 471
 Salicylate 371, 372, 374
Salmonella 8, 25, 89, 100, 189, 224, 243, 563, 564
 Saponins 424, 425
 Scaffold proteins 206
Scenedesmus obliquus 655
Schizosaccharomyces pombe 401
 Sclerotia 293
Sclerotinia sclerotiorum 537
Sclerotium rolfsii 576
 SCO 567
 SCP 578, 579, 613
 Segregation lag 101
 Selective toxicity 418
Selenomonas 638, 641
 Semiconservative 63
 Semilog paper 50

- Sensors 204
 Septicemia 511
Serratia 113, 155, 348, 381, 384, 554, 597, 599, 603
Serratia ficaria 348
Serratia marcescens 113, 384, 597, 599
 Sessile cells 156, 167
 Sexual identity 17
 Sheath 397
Shigella 81
 Short sequence repeats 67
 Short tandem repeats 77
 sHsp 210
Siderocapsa sp 348
 Siderophores 328
 Sigma factor 162
 Signal stress genes 278
 Signal transduction pathway 128
 Signature sequence 145
 Skim milk 586
 Slime molds 18
 smf 618, 619
 SOD 241, 243, 244, 253, 284, 326, 330, 403
 Software 674
 Solanaceae 426
 Sophorolipids 597
 SOS 80, 87, 96, 97, 98, 99, 171, 191, 206, 226, 230, 238, 246, 247, 406, 682
 SOS regulon 226
 Southern hybridization 140
 Spectinomycin 186, 417
 Sphalerite 354
Sphingomonas paucimobilis 384
Spirulina maxima 655
Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus 529
Spodoptera littoralis nuclear polyhedrosis virus 529
 Spontaneous mutations 91
 Sporangiospores 17
Sporolactobacillus 162
Sporopolimyces odor 543
 Sporulation 51, 161, 164
 SSB 256, 257, 399, 406, 494, 683
 ssDNA 11, 21, 124, 562
 SSF 547
 ssRNA 11, 21
 SSU rRNA 144, 672, 675
St. pneumoniae 156, 193
St. thermophilus 449, 451, 452, 455, 466, 467, 469, 472, 586
 Staling 612
 Standard curves 562
Staph. aureus 69, 72, 92, 319, 322, 329, 330, 432, 450, 553, 564
Staph. carnosus 563, 564
Staph. xylosus 563
Staphylococcus aureus 69, 113, 429
 START 55, 269
 Starvation 87, 202, 224
 Stationary phase 47, 51
Stenotrophomonas maltophilia 348
 Stimulon 80, 668
Strep. coelicolor 572
 Streptobacilli 47
 Streptobacteria 584
 Streptococci 47, 70, 584, 587
Streptococcus 101, 106, 469, 542, 544, 576, 587, 610, 638
Streptomyces 2, 66, 113, 114, 153, 417, 440, 505, 553, 554, 555, 563, 592, 616, 620, 622, 623, 675
Streptomyces griseus 417, 563
 Streptomycin 186, 417
 Stress lipid index 301
 Stress metabolism 198
 Stress proteome 198, 203, 286
 Stresses 14, 91, 161, 174
 Stressors 202
 Stringent response 231
 Substantial equivalence 538

- Subtilisin 409, 597
Sulfobacillus thermosulfidooxidans 341, 348, 358
Sulfolobus acidocaldarius 346, 355, 405
Sulfolobus ambivalens 346
Sulfolobus brierleyi 346
Sulfolobus hakonensis 346
Sulfolobus metallicus 346, 358
Sulfolobus solfataricus 346
Sulfolobus thermosulfidooxidans 346
Sulfolobus yellowstonii 346
Sulfurococcus mirabilis 346
Sulfurococcus yellowstonii 346
 Supernatant 458
 Superoxide 234, 241, 244, 326
 Suppressive factors 503
 Surface exclusion 229
 Surfactin 384, 597, 599, 600, 606, 607, 610, 611, 622
 Symport 32
 Synbiotics 474
 Synchronous culture 184
Synechococcus sp 655
 Synergism 345
Syntrophobacter wolinii 639
 Systemic lupus erythematosus, 468
- ## T
- T – cells 446, 468
 T – DNA 491
T. apicola 596, 599
T. petrophilum 596, 599
T. viridis 579
Talaromyces trachyspermus 384
 Taxis 10, 28
 Telomerase 77
 Telophase 53, 58
 Tenderization 564
 Termites 532, 636
 Tetracyclines 186, 417
 Th1 447, 450, 468
 Th2 447, 450, 468
Thauera aromatica K172 376
Thauera aromatica T1 376
Thermoplasma acidophilum 252, 346
Thermoplasma volcanicum 346
 Thermosensor 211
 Thermostat 274
Thermothrix thiopara 348
Thermotoga maritima 677
 Thermotolerance 274
 Thermozyms 677
Thermus 11, 114, 117, 149, 395, 397, 398
Thermus aquaticus 11, 114, 117
Thiobacillus acidophilus 348
Thiobacillus albertis 348
Thiobacillus caldus 348
Thiobacillus capsulatus 348
Thiobacillus concretivorus 348
Thiobacillus delicatus 348
Thiobacillus denitrificans 348
Thiobacillus ferrooxidans 351
Thiobacillus intermedius 348
Thiobacillus kabobis 348
Thiobacillus neapolitanus 348
Thiobacillus novellus 348
Thiobacillus organoparus 348
Thiobacillus perometabolis 348
Thiobacillus prosperus 348
Thiobacillus pumbophilus 348
Thiobacillus rubellus 349
Thiobacillus tepidarius 349
Thiobacillus thiooxidans 384
Thiobacillus thioparus 349
Thiobacillus versutus 349
Thiomonas cuprinus 349
 Thiophenes 379
 Thioredoxin 239, 240, 241, 275, 277, 319
 Thymine dimmers 91
 Tissue tropism 13, 481

TnA 74
 Tobramycin 170, 186, 417
 Togaviridae 23
 Togavirus 21
 Tol plasmid 290, 370, 416
 Toluene 387
Torulopsis bombicola 384, 386, 599
Torulopsis sp 350
 Total count 153
 Tow component system 156
Trametes odorata 575
 Trans 300, 301, 302, 303, 335, 336, 377, 378
 Transaconitate 407
 Transcriptase 13
 Transcription 12, 520
 Transcriptome 410, 439, 666, 669
 Transduction 100, 102
 Transfection 102
 Transformation 70, 660
 Transformed cells 477
 Transgenic plants 495
 Transient mutators 225
 Transition 93
 Translation 64, 495
 Transposable elements 19
 Transposons 68, 73
 TRic 213
Trichoderma lignorum 350
Trichoderma spp 579
Trichoderma viride 350, 575
Tricholoma nudum 568
 Trichomes 392
Trichomonas vaginalis 15, 77
Trichosporon 345, 350, 562, 567, 579
Trichosporon cutaneum 567
Trichosporon pullulans 567
 Triclosan 182
 Triplex DNA 62
 Trophophase 52
 Trophozoite 179

Tubulin 212, 213, 217, 257
 Tumor marker 476
 Tumor suppressor genes 476
 Tungsten 322, 402
 Turgor pressure 220
 Tyrothricin 418

U

U. maydis 596
 Ubiquinone 33, 234, 240
 Ubiquitin 201, 215
 Unculturable 154
 Unfoldase 211
 Uniport 32
 Uptake 1
Ustilago zeae 568

V

Vanadium 324
 Vancomycin 176, 186, 418, 419, 420, 454
Verticillium lecanii 530
 Viable count 47, 153
Vibrio cholerae 81, 302
Vibrio sp. strain NAP-4 376
 Viral nucleocapsids 23
 Virotherapy 482
 Virulence 17
 Viruses 11
 Vitronectin 69
 Volutin 3

W

Water activity 262
 Western blot 136
 Wild type 294

X

Xanthomonas campestris 382, 542, 576, 577, 589
 Xenobiotics 290

Xenoenzymes 541
Xylene 306, 387

Y

YACs 130
Yakult 468
Yeast artificial chromosome, 130
Yeast episomal plasmid 129
Yeast integrated plasmid 129
Yeast replicative plasmid 130
Yersinia enterocolitica 81
YIP 129
Yoghurt 466

YRP 130

Z

Zinc 332
Zygomycotina 17
Zygospores 17
Zygote 268
Zymomonas mobilis 382, 596, 632

α -Lactorphin 456

β -Lactorphin 456

رقم الايداع في دار الكتب والوثائق ببغداد 83 لسنة 2008

*Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
& Scientific Research
University of Baghdad
Institute of Genetic Engineering &
Biotechnology for Postgraduate Studies*

*Microbial Biotechnology
(Molecular Approaches)*

Dr. Zahra M. Al-Khafaji

2008

Republic of Iraq
Ministry Higher Education
& Scientific Research
University of Baghdad

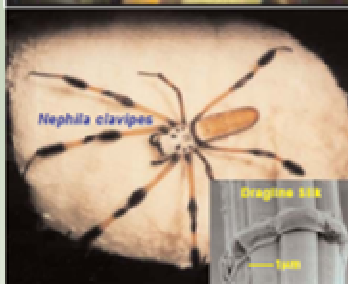
Microbial Biotechnology

(Molecular Approaches)



Dr. Zahra M. Al-Khafaji

Institute of Genetic Engineering
& Biotechnology
for Postgraduate Studies
University of Baghdad



2008