التنوع الميكروبى وتطبيقاته

دكتور

محمود محمد عوض الله السواح

أستاذ ورئيس قسم الميكروبيولوجيا – كلية الزراعة - جامعة المنصورة

بكالوريوس فى العلوم الزراعية (مرتبة شرف) - جامعة المنصورة (١٩٨٠)

ماجستير فى الميكروبيولوجيا – جامعة المنصورة (١٩٨٥)

دكتوراه الفلسفة فى الميكروبيولوجيا – جامعة المنصورة (١٩٨٨)

الكتـــــــاب : **التنوع الميكروبي وتطبيقاته**
المؤلـــــــف : أ.د. محمود محمد عوض الله السواح
المقـــــــاس : ١٧×٢٤
عدد الصفحـات : ٢٢٠
الطبعـــــــة : الأولى ٢٠١٠
رقم الإيـــداع : ٧٣٨٨/ ٢٠١٠
ردمـــــــك : ١- ٩٤٦- ٢٨٧- ٩٧٧- ٩٧٨
الناشـــــــر : دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع

© حقوق النشر والطبع والتوزيع محفوظة لدار الكتب العلمية للنشر والتوزيع – ٢٠١٠

لا يجوز نشر جزء من هذا الكتاب أو إعادة طبعه أو اختصاره بقصد الطباعة أو اختزان مادته العلمية أو نقله بأي طريقة سواء كانت إلكترونية أو ميكانيكية أو بالتصوير أو خلاف ذلك دون موافقة خطيه من الناشر مقدمًا.

دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع

٥٠شارع الشيخ ريحان – عابدين – القاهرة

☎ ٢٧٩٤٨٦١٩ – ٢٧٩٥٤٢٢٩

فاكس: ٢٧٩٢٨٩٨٠

لمزيد من المعلومات يرجى زيارة موقعنا على الإنترنت

www.sbhegypt.org
e-mail: sbh@link.net

بسم الله الرحمن الرحيم

إهـــداء

إلـــى زوجتى

نبع الحب والعطاء

رمز الإخلاص والوفاء

مُقَدِّمَة

الشكر لله سبحانه وتعالى الذى علمنى كيف أشكره ، " ربى أوزعنى أن أشكر نعمتك التى أنعمت على وعلى والداى وأن أعمل صالحاً ترضاه " ، ربى لك الشكر والثناء كما ينبغى لجلال وجهك وعظيم سلطانك أن ألهمتنى الصبر ومنحتنى الطاقة لأكمل هذا العمل ، والحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أفضل الأنبياء والمرسلين سيدنا محمد وعلى آله وصحبه وسلم أجمعين .

عملاً بقول الرسول صلى الله عليه وسلم " إذا مات ابن آدم انقطع عمله إلا من ثلاث صدقة جارية أو علم ينتفع به أو ولد صالح يدعو له " أقدمت على إصدار هذا المؤلف راجياً أن يكون خالصاً لوجه الله الكريم ، لعله يكون علماً نافعاً وشفيعاً يوم الدين ، أسأل الله أن يجعل هذا العمل المتواضع فى سبيله ويجعله يسهم فى رفعة وعزة أمتنا وأن يفيد به ويجعله لى فى ميزان أعمالى .

منذ نحو ثلاث قرون ونصف لا أكثر لم يكن الإنسان قد رأى الميكروبات بعد ، وذلك على الرغم من أنها تقطن كوكب الأرض منذ ٣٤٦٥ مليون سنة ، أى قبل الإنسان بحوالى بليونى سنة ، وحين رآها لم يكن يتوقع أنها ستحدث ثورة بيوتكنولوجية مدهشة ، تلك الثورة التى نعيشها فى القرن الحالى .

وقد أحرزت البيوتكنولوجيا تطوراً كبيراً فى عزل الآلاف من الميكروبات ، والحفاظ عليها فى مزارع نقية ، وهناك قدراً كبيراً من التنوع بين الميكروبات التى قد تقارب درجة الاختلاف بين بعضها قدر الاختلاف بين المملكة النباتية والحيوانية .

والميكروبات فى جعبتها – بلا شك – الكثير من الخير للبشرية ؛ فهى الآن تهضم المخلفات المختلفة وتحولها لبروتين يؤكل ، وتفرز البلاستيك الحيوى ، وتستخلص المعادن من الركاز وتجمعها من المياه ، وتحلل الملوثات البيئية ، وتنتج مضادات التجمد ، وتخلق أنسولين لمرضى السكر ، وتوفر العناصر السمادية للنبات ،

وتكافح الآفات المختلفة ، وتنتج الإنزيمات والفيتامينات والصبغات والمضادات الحيوية، وتساهم فى صناعة الأغذية والأدوية .

يقع الكتاب فى سبعة فصول تتناول التنوع الميكروبى ، والبروكاريوتات والأيوكاريوتات ، وأهمية تعريف وتصنيف الكائنات الحية الدقيقة ، والتنوع التقسيمى للبكتيريا ، والفطريات ، والتنوع الميكروبى كمستودع غنى بالإنزيمات ، وأخيراً يعرض الكتاب حفظ السلالات الميكروبية .

والكتاب محاولة للتعريف بالتنوع الميكروبى وتطبيقاته ، على الرغم من أن هناك صعوبة فى الكتابة فى ذلك الموضوع نظراً لطبيعته الديناميكية ، إلا أنها محاولة لتبسيط هذا التنوع ، والتعريف بتطبيقاته .

ومشروع هذا الكتاب قد نشأ من حاجة المكتبة العربية إلى هذا النوع من الكتب فى مجال تصنيف وتعريف الميكروبات حيث زود بعدد وافر من المراجع المختلفة حتى يمكن الرجوع إليها للاستفادة منها فى الدراسات الدقيقة .

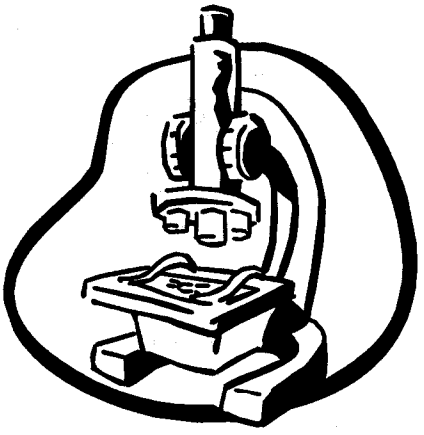
وعند تقديمى لهذا الكتاب للمكتبة العربية لا أدعى فيه الكمال ، كما أرحب بكل ملاحظة واقتراح أو نقد بناء ، وأدعو الله أن يكون هذا الكتاب مصدراً لمعلومات مفيدة، وأن يجد فيه القارئ مزيد من الإفادة والاستزادة .

أدعو الله أن أكون قد وفقت فى عملى هذا وأن أكون قد قدمت إلى المكتبة العربية راجياً من الله حسن القبول والثواب .

والله ولى التوفيق ،،،

المنصورة فى السبت ٢٠٠٩/١٢/١٢م

المؤلف



الفصل الأول

التنوع الميكروبى
Microbial Diversity

■ التنوع الميكروبى وتطبيقاته ■

ماهية الميكروبات :

الميكروبات عبارة عن مجموعة متنوعة من الكائنات الحية يمكن أن تقسم إلى الفيروسات viruses ، ومجموعات وحيدة الخلية (الأركيا archaea – التى كانت تعرف سلفاً بالأركيوبكتيريا archaeobacteria – والبكتيريا bacteria – التى كانت تعرف سلفاً بالأيوبكتيريا eubacteria – وبعض الفطريات fungi كالخمائر yeasts) ، وعدد صغير من الكائنات لها تركيب عديد الخلايا وبسيط (الفطريات الأكبر) .

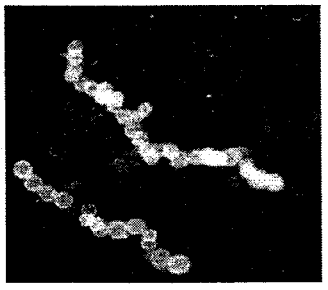
وفى الوقت الذى لا يمكن رؤية معظم الميكروبات بدون استخدام الميكروسكوب ، تتميز قلة من الكائنات الحية الدقيقة بتركيب كبير وضخم يشبه النباتات الصغيرة الحجم كما هو الحال فى فطريات عيش الغراب mushrooms (شكل ١-١) ، وهناك بكتيريا كبيرة بما فيه الكفاية (٢ مم) تعرف باسم ثيومارجاريتا ناميبيانسيز Thiomargarita namibiensis ترى بالعين المجردة فى شكل عقد اللؤلؤ (شكل ١-٢) بسبب حبيبات كبريت مجهرية بداخلها تعكس الضوء الساقط ، وهى بكتيريا تقطن رواسب الطين على الشاطئ الأفريقى فى ناميبيا ، ولها دور بيئى هام ، إذ تستهلك كبريتيد الهيدروجين H_2S لتصبح سامة للحيوانات التى تقطن الطين معها .

ماهية التنوع الميكروبى :

حتى عام ١٦٦٠ ميلادية لم يكن الإنسان قد تمكن بعد من رؤية الميكروبات ذلك العالم غير المعروف وغير المرئى للكثيرين حتى الآن ، ويرجع ذلك التأخير فى رؤية الميكروبات إلى عدم توفر العدسات والمجاهر آنذاك ، إلى جانب محدودية قوة تكبير العين المجردة للإنسان والتى لا ترى الأشياء الدقيقة التى يقل قطرها عن ٠,١ من الملليمتر .

شكل ١-١

أحد فطريات عيش الغراب

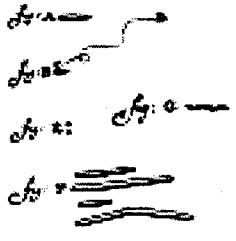


شكل ١-٢

بكتيريا Thiomargarita namibiensis .

ويعتبر الهولندى أنتونى فان ليفنهـوك Antony van Leeuwenhoek (١٦٣٢-١٧٢٣) أول من أستطاع رؤية الكائنات الحية الدقيقة عام ١٦٧٣ (شكل ١-٣) مـن خلال مجهر بسيط صنعه بنفسه حيث كان يهوى صناعة العدسات على الـرغم مـن عمله فى تجارة الأقمشة ، وقد انشغل العلماء لوقت طويل فى دراسة نشأة هذه الكائنات الحية حيث كان يعتقد خطأً فى ذلك الوقت أن هذه الكائنات الحية تنشأ ذاتياً من مـواد غير حية فيما عرف بنظرية " التوالد الذاتى spontaneous generation " .

ولقد تطلب دحض وتفنيد نظرية النشأة الذاتية مئات السنين من الجدل حتـى تمكن العالم الفرنسى الشهير لويس باستير Louis Pasteur (شكل ١-٤) الذى عاش فى الفترة من ١٨٢٢-١٨٩٥ من إنهاء ذلك الجدل الطويـل والعقـيم، بإثباتـه أن نمـو الميكروبات لابد له من أصل حى ، أى أن هذه الميكروبات تنـشأ مـن ميكروبـات موجودة بالفعل .



شكل ١-٣ . أنتونى فان ليفنهوك (١٦٣٢-١٧٢٣) ورسوماته من الأشكال البكتيرية المختلفة .

وقد دخلت البشرية بعد ذلك إلى عالم الميكروبات المثير ، الميكروبات تلك القوة غير المرئية التى تحكم العالم ، حيث تم اكتشاف العديد من الميكروبات بخاصة مسببات الأمراض (شكل ١-٥) ، وفى السنوات الأخيرة تحولت الأنظار تجاه الميكروبات المفيدة فى مجال البيوتكنولوجيا ، وتغيرت النظرة إلى الميكروبات على أنها مجرد مصانع حية تنتج الكثير من أجل تقدم ورفاهية البشرية ، فالبكتيريا على سبيل المثال يستفاد منها الآن فى استخلاص المعادن من الركاز ، وصناعة البروتين الآدمى ، وإفراز البلاستيك الحيوى ، وتحليل وهضم المخلفات إلى منتجات مفيدة كالسماد العضوى والغاز الحيوى والبروتين .

شكل ١-٤

معمل لويس باستير عام ١٨٨٥ .

وحالياً تعرف الكائنات الحية الدقيقة microorganisms بأنها فى غالبيتها كائنات وحيدة الخلية ، أو حتى عديدة الخلايا أحياناً ، وفى جميع الأحوال فإن هذه الكائنات لا تتركب من أنسجة مميزة ، وتشمل الكائنات الحية الدقيقة خمسة مجموعات رئيسية هى البكتيريا والفطريات والفيروسات إلى جانب الطحالب والبروتوزوا . ومن المعتقد أن بداخل

١٥٤٦ اقتراح فراكاستورو أن كائنات غير مرئية تسبب المرض
١٥٩٠-١٦٠٨ جنسن يطور أول ميكروسكوب مركب مفيد
١٦٦٥ هوك ينشر بعض الرسومات الدقيقة
١٦٧٦ ليفنهوك يكتشف الميكروبات
١٧٦٥-١٧٧٦ سبلانزانى يهاجم نظرية التوالد الذاتى
١٧٨٦ ميلر يصنف البكتيريا لأول مرة
١٧٩٨ جينر ينتج فاكسين الجدرى
١٨٣٥-١٨٤٤ باسى يكتشف مرض ديان الحرير بالفطر
١٨٥٧ باستير يصف عملية التخمير
١٨٦١ باستير يدحض نظرية التوالد الذاتى
١٨٦٧ ليستر ينشر عن الجراحة المعقمة
١٨٧٦ اكتشاف ميكروب الجمرة الخبيثة
١٨٧٩ اكتشاف ميكروب السيلان
١٨٨٠ اكتشاف ميكروب التيفود
١٨٨٠ اكتشاف ميكروب الملاريا
١٨٨١ اكتشاف ميكروب تلوث الجروح
١٨٨٢ اكتشاف ميكروب السل
١٨٨٣ اكتشاف ميكروب الكوليرا
١٨٨٣ اكتشاف ميكروب الدفتيريا
١٨٨٥ اكتشاف ميكروب التيتانوس
١٨٨٧ اكتشاف ميكروب الالتهاب السحائى
١٨٨٧ اكتشاف ميكروب الحمى المالطية
١٨٩٢ اكتشاف ميكروب الغرغرينا الغازية
١٨٩٤ اكتشاف ميكروب الطاعون
١٨٩٦ اكتشاف ميكروب التسمم البوتشولينى
١٨٩٧ اكتشاف ميكروب الاجهاض المعدى للأبقار
١٨٩٨ اكتشاف ميكروب الدوسنتاريا (الزحار)
١٩٠٥ اكتشاف ميكروب الزهرى
١٩٠٦ اكتشاف ميكروب السعال الديكى
١٩٠٩ اكتشاف ميكروب حمى جبال روكى المبقعة
١٩١١ اكتشاف الفيروس المسبب للسرطان
١٩١٥ اكتشاف البكتيريوفاج
١٩٣٧ شاتون يقسم الكائنات الحية إلى بروكاريوتات وأيوكاريوتات
١٩٧٧ ووز يقسم البروكاريوتات إلى بكتيريا وأركيا
١٩٩٦ دراسة جينوم بعض البكتيريا والخمائر
١٩٩٧ اكتشاف أكبر بكتيريا
٢٠٠٠ اكتشاف امتلاك ميكروب الكوليرا لإثنين من الكروموسومات
٢٠٠١ الجمرة الخبيثة تهاجم بعض المدن الأمريكية
٢٠٠٢ فيروس بولبو معدى يخلق من كيماويات أساسية
٢٠٠٣ تفشى فيروس سارس فى الصين
٢٠٠٥ اكتشاف سلالة شديدة المقاومة من فيروس الإيدز

شكل ١-٥ بعض الاكتشافات فى عالم الميكروبات

عالم الميكروبات ثلاثة خطوط خلوية رئيسية تطورت كلها من سلف عام مفرد ، حيث تطورت البكتيريا والأركيا والأيوكاريا من خلية واحدة مفردة ، وتعرف هذه الخطوط الخلوية بالمجموعات domains ، وتم إنشائها على أساس تتابع الحمض النووى د ن أ DNA فى الجينات . وقد لاقت البكتيريا والفطريات بصفة خاصة اهتمام كبير فى مجال التكنولوجيا الحيوية، كذلك فقد تم استغلال الفيروسات إلى حد ما فى هذا المجال.

وعلى الرغم من مرور أكثر من ثلاثة قرون منذ أن رأى الإنسان الميكروبات لأول مرة إلا أن الدراسة الجادة لهذه الكائنات ترجع إلى قرن واحد مضى ، ومن الملفت للنظر فى عالم الميكروبات ذلك التنوع الشديد بين أفراده سواء من ناحية الشكل أو النواحى الفسيولوجية البيئية ، أو الموطن أو الأنواع وغيرها ، وسوف يقتصر معظم الحديث على تنوع البكتيريا والفطريات .

١. البكتيريا :

ينطوى مصطلح البكتيريا على عدد ضخم من الكائنات الحية الدقيقة التى تتكاثر خلاياها ذات الأشكال المختلفة بالانفلاق العرضى ، وتختلف أفراد البكتيريا عن بعضها البعض فى المصادر التى تحصل منها على الكربون – وكذلك النيتروجين – اللازم لبناء خلاياها الحية ، كما تختلف فى مصادرها التى تحصل منها على الطاقة اللازمة للعمليات الحيوية ، وتختلف البكتيريا فى مساراتها الأيضية والنواتج النهائية لعملية التمثيل الغذائى ، كما تتفاوت أنواع البكتيريا فى مقدرتها على مهاجمة المركبات العضوية المختلفة التى تتواجد بصورة طبيعية .

وهناك تنوع لا حدود له فى أفراد البكتيريا من شأنه أن يوفر إمداد هائل بالمادة الخام للتطبيقات الميكروبيولوجية ، فمن اللافت للنظر تأقلم أنواع البكتيريا على اختلافها للمناخ والأوساط البيئية المتنوعة على سطح كوكب الأرض الذى نقطنه ، أو بالأحرى على كوكبها الذى نقطنه معها .

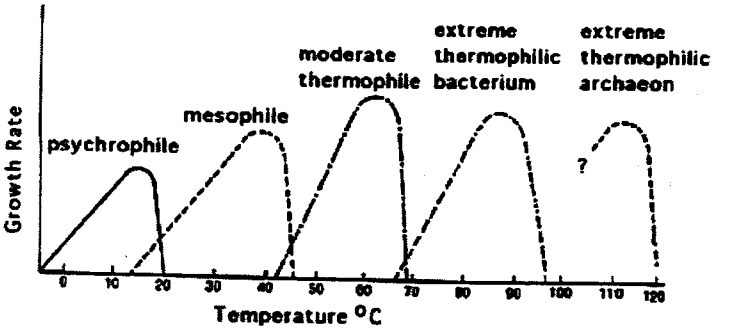
فهناك البكتيريا المحبة للبرودة إجباراً obligate psychrophiles والتى تعيش على ٤°م فى الأعماق السحيقة للبحار وتموت فى خلال دقائق قليلة على ٣٠°م ، وهناك

بكتيريا تنمو على درجات حرارة تقرب من الحدود الصغرى لنمو البكتيريا المحبة للحرارة المتوسطة وتعرف باسم البكتيريا المحبة للبرودة اختياراً facultative psychrophilic ، ومعظم بكتيريا التربة والماء والبكتيريا المسببة للأمراض محبة للحرارة المتوسطةmesophiles تنمو على درجة مثلى فى المدى الحرارى١٥-٤٥°م ، وهناك بكتيريا محبة للحرارة المرتفعة thermophiles لها درجة حرارة نمو مثلى أعلى من ٤٥°م ، وتضم المجموعة الأخيرة أنواع محبة لدرجات الحرارة المرتفعة إجباراً وهى لا تستطيع أن تنمو على درجة حرارة أقل من ٤٠°م ، وأنواع أخرى محبة لدرجات الحرارة المرتفعة اختياراً وهى لايمكنها النمو عند درجات الحرارة المتوسطة، وتنتشر البكتيريا المحبة للحرارة المرتفعة فى التربة والسماد العضوى والأغذية المعلبة المحفوظة بالحرارة (جدول ١-١) .

جدول ١-١ . نطاق النمو الحرارى لبعض المجاميع الفسيولوجية البكتيرية .

المجموعات البكتيرية الفسيولوجية	درجة الحرارة °م		
	الصغرى	المثلى	العظمى
١. بكتيريا محبة للحرارة المنخفضة	صفر	< ١٥°م	٣٠°م
٢. بكتيريا محبة للحرارة المتوسطة	٥-٢٥°م	١٥-٤٥°م	٣٠-٥٠°م
٣. بكتيريا محبة للحرارة المرتفعة	٢٥-٤٥°م	< ٤٥°م	٦٠-٨٠°م
أ. بكتيريا محبة للحرارة المرتفعة إجباراً	< ٤٠°م	< ٤٥°م	٦٠°م
ب. بكتيريا محبة للحرارة المرتفعة اختياراً	< ٤٠°م	< ٤٥°م	٨٠°م

ويتراوح المدى الحرارى للبكتيريا المحبة لدرجات الحرارة العالية جداً extreme thermophilic bacteria بين أعلى من ٦٥°م إلى أعلى من ٩٥°م والدرجة المثلى لنموها حوالى ٩٠°م ، فى حين تعيش الأركيا المحبة لدرجات الحرارة العالية جداً extreme thermophilic archaea على درجة حرارة قد تصل إلى ١٢٠°م (شكل ١-٦) .



شكل ١-٦ . النطاق الحرارى لنمو البكتيريا والأركيا

وفى الوقت الذى تعيش فيه غالبية البكتيريا عند الضغط الجوى العادى (١٥ رطل / البوصة المربعة أى واحد ضغط جوى) ولا تتأثر أنشطتها الحيوية بالتغير الحادث فى الضغط الجوى على مدار اليوم ، نجد أن هناك بكتيريا أخرى محبة للضغط المرتفع إجباراً obligate barophilic ، وبعضها بكتيريا أرضية تتحمل ضغط جوى يصل إلى ٤٠٠ ضعف للضغط الجوى العادى على ٣٠°م ، وأخرى بحرية تعيش فى أعماق البحار على ٣٠٠-٥٠٠ ضغط جوى ، ويتحمل بعضها ضغط قدره ٧٠٠-١٠٠٠ ضغط جوى .

وهناك بكتيريا محبة للملوحة halophiles تتميز بقدرة عالية على تحمل ٢-١٥% ملح طعام ، ولا تنمو جيداً إلا فى وجود هذا التركيز المرتفع من الملح ، وتنمو البكتيريا المحبة للملوحة فى الأغذية وعلى الجلود المملحة وفى البحيرات الملحية .

وتعتبر البكتيريا المحبة للملوحة halophiles والفطريات المحبة للجفاف xerophiles والخمائر المحبة للضغط الأسموزى المرتفع osmophiles من الكائنات الأوزموفيلية ، فى حيين تندرج بقية البكتيريا والخمائر والفطريات ضمن الكائنات غير الأوزموفيلية ، وفى هذا الصدد نجد أن الاحتياج الرطوبى للبكتيريا أكبر من مثيله للخمائر والاحتياج الرطوبى للخمائر أكبر من البكتيريا .

وهناك ميكروبات شديدة المقاومة للجفاف وتتحمله لشهور ، بينما بعض الميكروبات تتحمل الجفاف لأيام قليلة ، وتقاوم الميكروبات التى تكون كابسول capsule الجفاف عن مثيلتها غير المكبسلة .

وتختلف الميكروبات تبعاً لحاجتها للأكسجين إلى عدة أقسام ، قسم يضم ميكروبات هوائية إجباراً oxybiontic تنمو فقط حال توفر أكسجين الهواء الجوى بأوساط نموها حيث تستخدم الأكسجين كمستقبل نهائى للأيدروجين والإلكترونات ، وقسم ثانى يضم ميكروبات لاهوائية إجباراً anoxybiontic تنمو فقط فى غياب أكسجين الهواء الجوى لأن وجوده يؤدى إلى موتها ، وقسم ثالث به ميكروبات ذات طبيعة اختيارية للهواء facultative organisms تنمو فى وجود أو غياب الأكسجين وعلى أساس درجة تفضليها للأكسجين الحر free oxygen أو الأكسجين المرتبط combined oxygen إما أن تكون اختيارية هوائية أو اختيارية لاهوائية ، وأخيراً ميكروبات محبة للهواء بكمية قليلة (شحيحة الاحتياج للأكسجين) microaerophilic organisms ، وهى تنمو فى وجود كمية قليلة من أكسجين الهواء الجوى بأوساط نموها بسبب تثبيط الأكسجين الحر لبعض إنزيماتها .

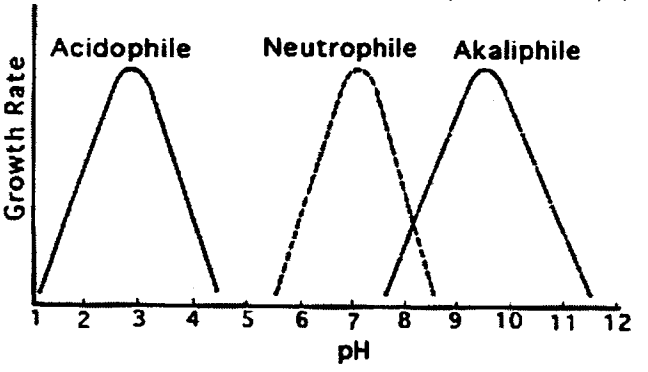
وتنمو بعض البكتيريا اللاهوئية متحملة وجود مستوى من الأكسجين أقل من مثيله الموجود بالجو ، ويشار إلى هذه البكتيريا بالمتحملة للهواءaerotolerant organisms .

ويتوقف نمو الميكروبات فى الأوساط شديدة الحموضة أو شديدة القلوية ، وقد تؤدى هذه الأوساط إلى موت الميكروبات بسبب الضرر الذى تلحقه بالنظم الإنزيمية بخلاياها الحية .

وبصفة عامة تنمو معظم الفطريات والخمائر جيداً فى الأوساط ذات الطبيعة الحامضية (الرقم الأيدروجينى بين ٣-٥) ، فى حين يفضل معظم البكتيريات النمو فى الأوساط المتعادلة أو التى تميل للقلوية قليلاً ، بينما تناسب الأوساط القلوية نمو الأكتينوبكتيريا Actinobacteria التى كانت تحمل الاسم القديم الأكتينوميسيتات Actinomycetes ".

وتقاوم بعض الميكروبات الحموضة المرتفعة acidduric ، كما هو الحال فى بكتيريا الألبان المتخمرة التى تنمو وتتحمل حموضة هذه الألبان (الرقم الأيدروجينى ٤ أو أقل) .

وتقسم البكتيريا إلى بكتيريا محبة للقلوية alkalophiles تنمو فى أوساط رقمها الأيدروجينى فى المدى من ٨-١٠ ، وبكتيريا محبة للوسط المتعادل neutrophiles تنمو فى المدى من ٦-٨ فى بعض الأوساط مثل دم الإنسان واللبن الحليب الطازج ، وبكتيريا محبة للحموضة acidophiles تنمو فى المدى من ١-٦ فى الخل وعصير الليمون والطماطم (شكل ١-٧) .



شكل ١-٧ . نطاق الرقم الأيدروجينى لنمو الميكروبات

وتعيش بعض البكتيريا معيشة تكافلية مع الكائنات الأخرى كما هو الحال فى العلاقة المفيدة التى تنشأ بين أفراد البكتيريا العقدية التابعة لجنس الرايزوبيوم Rhizobium والنباتات البقولية ، وتمثل العقد الجذرية التى تظهر على جذور النباتات البقولية مقراً لحدوث العلاقة وتثبيت النيتروجين الغازى (شكل ١-٨) ، ولهذه العلاقة التكافلية مع النباتات البقولية أهمية خاصة نظراً لكثرة عدد النباتات البقولية والذى يبلغ ١٣٠٠٠ نوع بما فيها المائتا نوع التى يستزرعها الإنسان حالياً .

شكل ١-٨ . عقد على جذر نبات بقولى .

وتنشأ بين البكتيريا وبعضها أو البكتيريا والكائنات الأخرى الكثير من العلاقات المفيدة فى صورة تكافل وتعاون ينجم عنه تحليل المخلفات والبقايا والملوثات فى الطبيعة ، مما يؤدى إلى تنظيف سطح كوكب الأرض الذى نقطنه من هذه المواد .

ويعيش بعض أنواع البكتيريا كطفيليات بداخل خلايا الثدييات ، وتكون بعض أنواع البكتيريا مجموعات ثابتة مع الكائنات الحية الدقيقة الأخرى .

ومثل هذا التنوع البكتيرى الذى لا حدود له يوفر أداة خام هامة للميكروبيولوجيا التطبيقية .

٢. الفطريات :

تنافس مجموعة الكائنات الحية الدقيقة المصنفة كفطريات البكتيريا بشكل كبير ، فالفطريات كائنات أيوكاريوتية ذات تنوع كبير وتمثل عالم آخر لاحدود له إذ تقدر أنواعها بحوالى ١,٥ مليون نوع ، ومن المعتقد أنه تم تصنيف حوالى ٥% فقط من أنواعها .

وتستوطن الفطريات وبشكل فعال الأخشاب الجافة ، وتفرز نظم إنزيمية خارج خلاياها تحلل البوليمرات الحيوية مثل السكريات العديدة واللجنين والبروتينات ، فهى المسئولة عن تحليل معظم البقايا النباتية ، وتنتج الفطريات عدد ضخم من الجزيئات العضوية الصغيرة ذات التركيب غير العادى مثل الكثير من المضادات الحيوية .

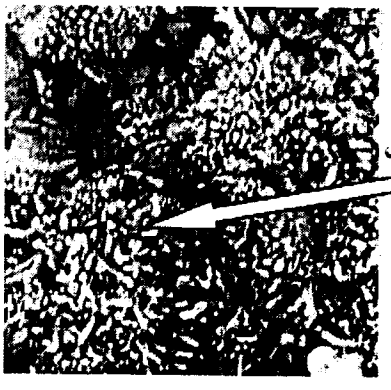
وينقص الفطريات كإحدى مجموعات الكائنات الحية الدقيقة الرئيسية بعض القدرات الأيضية التى تمتلكها البكتيريا ، فالفطريات لاتمثل ضوء الشمس بسبب افتقارها إلى الكلوروفيل ، ولا تثبت نيتروجين الهواء الجوى لعدم امتلاكها إنزيم النيتروجينيز ، ولا تؤكسد المركبات غير العضوية كمصدر للطاقة، ولا تستخدم المركبات غير العضوية بخلاف الأكسجين كمعطى نهائى للإلكترون فى عملية التنفس، وتستخدم الفطريات عدد أقل من المركبات العضوية كمصادر وحيدة لكربون الخلية .

وفى كثير من الأحيان تكمل الفطريات والبكتيريا بعضهما البعض فى تحليل المركبات العضوية المعقدة ، كما هو الحال فى المجتمعات الميكروبية بمكمورات

السماد العضوى compost ، حيث تعمل البكتيريا والفطريات معاً على إنضاج الكومبوست إلى صورة شبه دبالية ثابتة ونظيفة وغنية بالعناصر السمادية .

وتظهر الفطريات تنوعاً كبيراً فى شكلها الخارجى ، وفى أنماطها الغذائية ، حيث تنمو مشاركة لحياة الكثير من الكائنات الحية الدقيقة الأخرى كما هو الحال فى حالة التعاون الفريد الذى يظهر بين الفطريات والطحالب فيما يعرف بالأشنات lichens (شكل ١-٩) ، وبين مجموعة فطريات الميكوريزا mycorhiza وجذور النباتات الراقية (شكل ١-١٠) .

وتنشأ علاقة طبيعية وفسيولوجية بين الفطريات والسيانوبكتيريا (التى كانت تعرف سلفاً بالطحالب الخضراء المزرقة) ، وهى علاقة وثيقة وفريدة تصل إلى الحد الذى تصبح فيه الأشنات المكونة لها بمثابة كائنات مستقلة بذاتها ، تستخدم فيها الفطريات المواد الكربوهيدراتية التى تكونها السيانوبكتيريا من ثانى أكسيد الكربون خلال عمليات التمثيل الضوئى ، كما تستخدم المواد النيتروجينية التى تكونها السيانوبكتيريا خلال عملية تثبيت نيتروجين الغلاف الجوى ، ولمثل هذه العلاقة التكافلية أهمية بيئية تبرز بشكل جلى فى الانتشار الواسع للأشنات فى المناطق الجافة وشبه الجافة وهى مناطق يقل وجود الميكروبات حرة المعيشة بها .



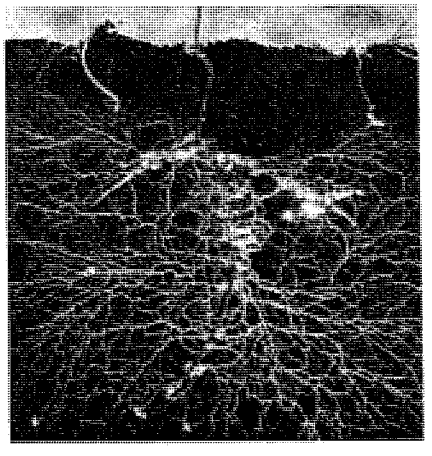
شكل ١-٩ . الأشنات .

وتتعايش الفطريات مع جذور بعض النباتات الراقية فى علاقة فريدة تعرف بالميكوريزا ، حيث تتخذ بعض الفطريات من جذور هذه النباتات موطن بيئى تحصل

منه على احتياجاتها من الكربوهيدرات والفيتامينات والأحماض الأمينية ، وتنتشر الميكوريزا فى الأراضى الفقيرة فى عنصرى الفوسفور والنيتروجين ، وتساعد فى تيسير كثير من العناصر الغذائية وزيادة امتصاصها من قبل النبات النامى .

وتتطفل بعض الفطريات على الكائنات الحية الأخرى وتسبب لها أمراض ، وقد تم الاستفادة من ذلك فى توظيف الكثير من الفطريات فى المكافحة الحيوية لمسببات الأمراض الميكروبية والآفات الزراعية من الحشرات والحشائش والنيماتودا والحلم ، وينتج العالم اليوم عدد من الفطريات الأسكية لمكافحة الحشرات لعل أشهرها فطر ميتاريزيم انيسوبليا Metarhizium anisopliae وفطر بوفاريا باسيانا Beauveria bassiana وغيرها كثير ، كما تنتج بعض الفطريات لمكافحة النيماتودا .

والكثير من الفطريات مترمم على البقايا والمخلفات ، ويساهم بدور كبير فى تنظيف البيئة وتسهيل الحياة على سطح الأرض .



شكل ١-١٠ . فطريات الميكوريزا على جذور النبات .

نظم البكتيريا والفطريات :

يقصد بالمجموعة الميكروبية microbial consortium نظام من الكائنات الحية يتكون فى الغالب من اثنين أو أكثر من الكائنات الحية ، وفى هذا النظام يساهم كل كائن حى ببعض احتياجات الكائن الآخر ، وتساهم مثل هذه النظم من الكائنات الحية فى الكثير من التفاعلات الأساسية التى تحدث فى الطبيعة والتى تؤثر بدورها فى

الغلاف الجوى على مستوى العالم .

فعلى سبيل المثال ، تلعب نظم البكتيريا والفطريات دوراً هاماً فى البيوتكنولوجيا ابتداءً من العلاج الحيوى bioremediation للأوساط البيئية الملوثة ومعالجة مياه المخلفات إلى المساعدة فى هضم الغذاء والأعلاف ، ولهذه النظم الدور الأساسى فى تدوير المادة العضوية ، وتؤدى عملية تحليل النواتج الجانبية العضوية والبقايا النباتية والحيوانية إلى إطلاق العناصر الغذائية التى تدعم نمو كل الكائنات الحية .

وتحتوى الستة بوصات السطحية من التربة الزراعية على أكثر من ٢ طن من البكتيريا والفطريات لكل اكر ، وتساهم البكتيريا والفطريات بأكثر من ٩٠% من إنتاج ثانى أكسيد الكربون فى الغلاف الجوى .

ولقد شهدت السنوات الأخيرة تحديات كبيرة فى علاج الأوساط البيئية الملوثة بالمواد البترولية والمخلفات السامة باستخدام مجاميع من الكائنات الحية الدقيقة ذات قدرات تحليلية فائقة ، ويؤدى استخدام مجموعات ميكروبية مختلطة طبيعية فى موقع التلوث إلى تحسين تحليل المركبات العضوية غير المرغوبة فى المواقع البيئية المختلفة عن إدخال ميكروب مفرد مهندس وراثياً .

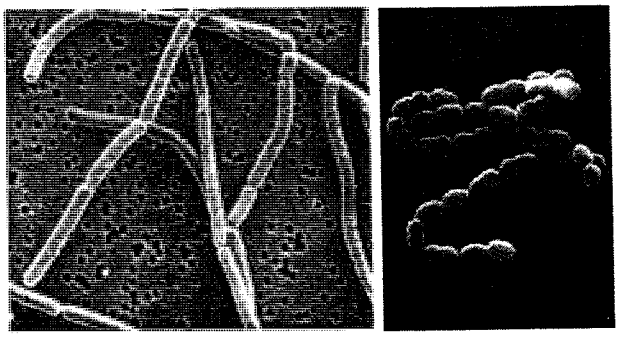
المزارع المختلطة :

وقد استفادت البيوتكنولوجيا من نظم الكائنات الحية بالأخذ بمميزات القدرات الخاصة للمزارع المختلطة mixed cultures من الكائنات الحية الدقيقة فى توظيفها فى عدد من التخمرات الميكروبية ، ومازالت أعداد المزارع المختلطة المستخدمة فى التخمرات الميكروبية على المستوى التجارى صغيرة إلى حد كبير .

ولعل أقدم استخدامات المزارع المختلطة هى استخدام اليابانيين للفطر الأسكى أسبرجلس أوريزا Aspergillus oryzae (شكل ١-١١) فى صناعة صلصة الصويا soy sauce بمساعدة بكتيريا حامض اللاكتيك المقاومة للملح بيدوكوكس صويا Pediococcus soyae ، وكذلك خميرة سكارومييسيس روكسياى Saccharomyces roxuii .

شكل ١-١١ . فطر أسبرجلس أوريزا .

وتعتمد معظم التخمرات اللبنية على المزارع الميكروبية المختلطة ، كما هو الحال فى الزبادى الذى يتم إنتاجه باستخدام مزرعة خليطة من بكتيريا حامض اللاكتيك تعرف بالبادئ starter ، ويتكون بادئ الزبادى من كل من بكتيريا لاكتوباسيلس ديلبركياى تحت نوع بلجاريكس Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus وبكتيريا ستربتوكوكس ساليفاريس تحت نوع ثرموفيلس Streptococcus salivarius subsp. thermophilus (شكل ١-١٢) ، وتلعب هذه الميكروبات دور هام فى إنتاج حامض اللاكتيك ومواد طيارة ، مصحوبة بتكوين خثرة ، وطعم ورائحة مرغوبة تتميز بها مثل هذه المنتجات المتخمرة .



شكل ١-١٢ .

أ. ستربتوكوكس ثرموفيلس .

ب. لاكتوباسيلس بلجاريكس .

ب أ

وتستخدم المزارع الميكروبية المختلطة فى العلاج الحيوى للمياه الملوثة حيث يتم إزالة النترات من المياه بواسطة بكتيريا نيتروزوموناس Nitrosomonas وبكتيريا نيتروباكتر Nitrobacter ، ويبدأ الميكروب الأول الهجوم على الأمونيا ويمكنه أكسدتها

إلى نترات ، وهو مركب شديد السمية يثبط نمو النيتروزوموناس ، أما النيتروباكتر فيؤكسد النيتريت إلى نترات لكن لايؤكسد الأمونيا .

وتستخدم التخمرات الميكروبية التى تنطوى على مزارع مختلطة فى إنتاج العديد من الأحماض العضوية ، مثل إنتاج حمض الأستيك بأكسدة كحول الإيثيل باستخدام أنواع جنس أسيتوباكتر Acetobacter spp .

وحديثاً تستخدم المزارع الميكروبية المختلطة فى عمليات التعدين الحيوى metal leaching لاستخراج المعادن من تراب الركاز ، وتستخلص الكائنات الحية الدقيقة العناصر المعدنية الهامة تجارياً بإذابة هذه المعادن فى المناجم المحتوية عليها ، حيث يمكن فصل الكوبلت والنحاس والزنك والرصاص والزرنيخ واليورانيوم بسهولة من المناجم المحتوية على كميات قليلة من هذه العناصر فى موادها الخام وذلك بالتعدين أو بالاستخلاص بالميكروبات بشكل مباشر أو غير مباشر ، ففى أحيان كثيرة لا تبرر النواحى الاقتصادية والفنية التعدين التجارى المعتاد كأن تكون تكلفة استخراج معدن ما من باطن الأرض أكبر من ثمن المعدن المستخرج نفسه ، وعادة ما يكون ذلك فى الحالات التى يوجد فيها المعدن بتركيز منخفض فى مادته الخام ، أو الحالات التى يتم إهمال المنجم فيها بعد استخراج المعدن منه وذلك لتعذر استخراج المتبقى بسبب قلته أو صعوبة استخراجه .

كذلك تستخدم المزارع الميكروبية المختلطة فى إنتاج الكثير من المنتجات المفيدة الأخرى مثل فيتامين ب١٢ ، وفى تحولات الستيرويدات steroid transformations وغيرها .

المراجع :

Alberton, O., T. Kuyper (2009). Ectomycorrhizal fungi associated with seedlings respond differently to increased carbon and nitrogen availability: implications for ecosystem responses to global change. Global Change Biology, 15 (1), 166-175.

Barea J, M. Pozo, R. Azcón, C. Azcón-Aguilar (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. J Exp Bot 56 (417), 1761–78.

Bruns, T. (2006). Evolutionary biology: a kingdom revised. Nature 443, 758–761.

Desjardin, D.E., A.G. Oliveira, C.V. Stevani (2008). Fungi bioluminescence revisited. Photochem Photobiol Sci. 7, 170–182.

Fang, M., R.J. Kremer, P.P. Motavalli, G. Davis (2005). Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. Appl Environ Microbiol 71, 4132-4136.

Fisher, Bruce; Harvey, P. Richard; Champe, C. Pamela (2007). Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology (Lippincott's Illustrated Reviews Series). Hagerstwon, MD: Lippincott Williams and Wilkins.

Fomina, M., J.M. Charnock, S. Hillier, R. Alvarez, F. Livens, G.M. Gadd (2008). Role of fungi in the biogeochemical fate of depleted uranium. Current Biol. 18 (9), R375–377.

Glazer, A.N.; H. Nikaido (1998). Microbial Biotechnology. Fundamentals of Applied Microbiology. W.H. Freeman and Company.

Jeffries, P; S. Gianinazzi; S. Perotto, K. Turnau, J.-M. Barea (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. Biol. Fertility Soils 37, 1–16.

Kumar, R., S. Singh, O.V. Singh (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J. Ind.. Microbiol. Biotechnol. 35 (5), 377–391.

Leadbetter, E.R. (1997). Prokaryotic Diversity: From Ecophysiology, and Habitat. In: Manual of Environmental Microbiology. Hurst, C.J., G.R. Knudsen, M.J. McInerney, Linda D. Stetzenbach and M.V.

Walter (Eds.). Amer. Soc. For Microbiol. ASM Press, Washington, D.C.

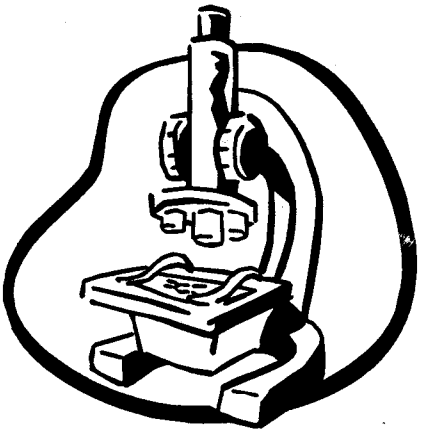
Li, H, S.E. Smith, R.E. Holloway, Y. Zhu, F.A. Smith (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to phosphorus uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive growth responses. New Phytol. 172, 536–543.

Oksanen, I. (2006). Ecological and biotechnological aspects of lichens. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73 (4), 723–734.

Rogers, P.L., Y.J. Jeon, K.J. Lee, H.G. Lawford (2007) Zymomonas mobilis for Fuel Ethanol and Higher Value Products. Advance Biochem. Eng./Biotechnol.

Zahradka, K., D. Slade, A. Bailone, S. Sommer, D. Averbeck, M. Petranovic, A.B. Lindner, M. Radman (2006). Reassembly of shattered chromosomes in Deinococcus radiodurans. Nature 443 (7111), 569–573.

Zoetendal, E., E. Vaughan, W. de Vos (2006). A microbial world within us. Mol Microbiol 59 (6), 1639–1650.



الفصل الثانى

البروكاريوتات والأيوكاريوتات

Procaryotes and Eucaryotes

■ التنوع الميكروبى وتطبيقاته ■

مفهوم البروكاريوتات :

فى العادة يتم تصنيف الكائنات الحية بصفة عامة إلى كائنات لاخلوية مثل الفيروس virus والفيرويد viroid والبريون prion ، وكائنات أخرى خلوية تضم بقية الكائنات الحية على كثرتها .

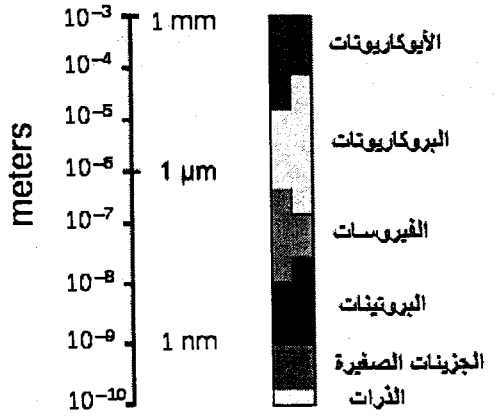
ويتركب البريون من بروتين فقط ، ولا يحتوى على غلاف واقى حول البروتين، ويصيب بعض الحيوانات بأمراض محدودة مثل جنون البقر ، فى حين يتركب الفيرويد من الحامض النووى ر ن أ RNA فقط ، ولا يحتوى على غلاف واقى حول الحامض النووى ، ويسبب أمراض عديدة للنباتات فقط ، أما الفيروس فيتركب من كود نووى (إما من حامض ر ن أ أو حامض د ن أ) بالإضافة إلى بروتين على هيئة غلاف يحيط بالحامض النووى ويطلق عليه كابسيد capsid ، وفى بعض الحالات يحتوى الغلاف البروتينى على الليبيدات ، ويسبب الفيروس أمراض لكل من النباتات والحيوانات والإنسان .

وقد وضع شاتون Chatton (١٨٨٣- ١٩٤٧) فى عام ١٩٣٧ أساس مقبول لتصنيف الكائنات الحية الخلوية إلى مجموعتين كبيرتين يختلفان عن بعضهما البعض فى أساسيات التعضون الداخلى لخلاياهما وهما الكائنات ذات النواة الحقيقية (الأيوكاريوتات) Eucaryotes والكائنات ذات النواة البدائية (البروكاريوتات) Procaryotes .

وتحتوى خلايا الأيوكاريوتات على نواة حقيقية يحيط بها غشاء نووى ، وتحتوى على مجموعة من الكروموسومات يصل عددها ٣ أو أكثر تعمل كمستودعات رئيسية للمادة الوراثية فى الخلية ، وتحتوى خلايا الكائنات ذات النواة الحقيقية أيضاً على عضيات محاطة بأغشية أخرى تحمل المعلومات الوراثية وهى الميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء .

أما البروكاريوتات وهى الأصغر حجماً بالمقارنة بالأيوكاريوتات (شكل ٢-١) ، فهى مجرد خلايا مفردة أو تجمعات لخلايا متشابهة تكون مجموعة تعرف بصفاتها

الخلوية وليست صفاتها ككائنات ، بمعنى تركيب ومكونات الخلايا لكائن ما بدلاً من خصائص الكائن ككل ، والكروموسوم (النيكلويد nucleoid) عبارة عن جزئ د ن أ DNA حلقى مغلق يقع فى السيتوبلازم ، وغير محاط بغشاء نووى ، ويحتوى هذا الكروموسوم على كل المعلومات الضرورية لتكاثر الخلية ، ولا تحتوى البروكاريوتات على عضيات أخرى محاطة بأغشية .



شكل ٢-١ . مدى الحجم الذى تظهره البروكاريوتات بالنسبة للكائنات الأخرى والجزيئة الحيوية

وتمثل البكتيريا والأركيا الكائنات ذات النواة البدائية ، بينما تندرج النباتات والحيوانات والفطريات والطحالب والبروتوزوا ضمن الكائنات ذات النواة الحقيقية .

لكن السؤال الذى يطرح نفسه هنا ؟ هل يتم اختيار بكتيريا مثل بكتيريا القولون النمطية إيشريشيا كولاى Escherichia coli أم يتم اختيار فطر مثل خميرة الخباز سكاروميسيس سيرفيسيا Saccharomyces cerevisiae فى تطبيقات التكنولوجيا الحيوية ؟ ، والإجابة أن الاختيار يعتمد على الاختلافات الوراثية والبيوكيماوية والفسيولوجية الأساسية بين الكائنات ذات النواة الحقيقية والكائنات ذات النواة البدائية .

مجاميع البروكاريوتات :

تضم الكائنات الحية ذات النواة البدائية مجموعتين من الكائنات يختلفان عن بعضهما البعض بشكل واضح هما مجموعة البكتيريا ومجموعة الأركيا .

ويتم التمييز بين كل من البكتيريا والأركيا والايوكاريوتات بما يلى :

١. الاختلاف فى النواحى التركيبية لجدار الخلية وليبيدات الغشاء البلازمى (جدول ٢-١) .

٢. الاختلاف فى التركيب الجينى وعمليات النسخ والترجمة وتتابع الحامض النووى ر ن أ الريبوسومى ribosomal RNA (جدول ٢-٢) .

٣. الاختلاف فى بعض العمليات الأيضية (جدول ٢-٣) .

٤. إلى جانب الاختلاف فى بعض العمليات الأخرى .

جدول ٢-١. بعض النواحى التركيبية لخلايا البكتيريا والأركيا والأيوكاريوتات .

الخاصية	البروكاريوتات		الأيوكاريوتات
	البكتيريا	الأركيا	
عدد الكروموسومات	١ *	١	> من ١
الغشاء النووى	-	-	+
النوية	-	-	+
الجهاز الميتوزى	-	-	+
الأنابيب الدقيقة	-	-	+
ليبيدات الغشاء	جلسرول ثنائى الاستر	جلسرول ثنائى أو رباعى الإثير	جلسرول ثنائى الاستر
ستيرولات الغشاء	نادرة	نادرة	شائعة
الببتيدوجليكان	+	-	-

* ٢ فى ميكروب الكوليرا .

وعلى سبيل المثال ، يتركب الجدار الخلوى للبكتيريا من بوليمرات مرتبطة تصالبياً تسمى الببتيدوجليكان peptidoglycan (وقد تسمى ميكوببتيد mucopeptide أو ميورين murein أو mucopolysaccharide أوجليكوببتيد glycopeptide أو جلوكو امينو ببتيدو glucoaminopeptide) ، ويتكون الببتيدوجليكان من وحدات من السكريات الأمينية هى اسيتايل جلوكوز أمين N-acetyl glucose amine – حمض الاسيتايل ميورواميك N-acetyl muramic acid (شكل ٢-٢) .

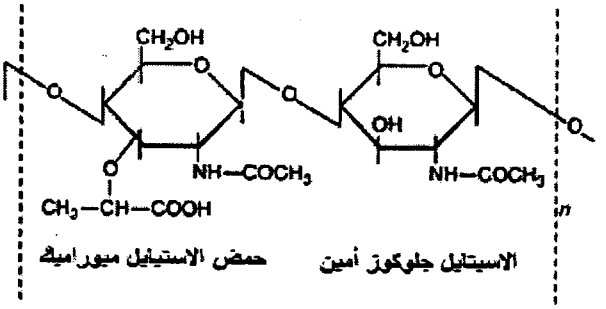
جدول ٢-٢ . التركيب الجينى والنسخ والترجمة فى خلايا البكتيريا والأركيا والأيوكاريوتات .

	البكتيريا	الأركيا	الأيوكاريوتات
وجود الانترونات introns فى الجينات	-	نادرة	شائعة
اقتران النسخ بالترجمة	نعم	؟	لا
وجود حامض mRNA المنظم لأكثر من جين	نعم	؟	لا
حدوث polyadenylylation طرفية لحامض mRNA	-	+	+
أحجام تحت الوحدات الريبوسومية (معامل الترسيب)	30S, 50S	30S, 50S	40S, 60S
أول حامض أمينى لتخليق سلسلة جديدة عديدة الببتيدات	فورمايل مثيونين	مثيونين	مثيونين

وبسبب الوجود العام للبتيدوجليكان فى البكتيريا وغيابه فى الأيوكاريوتات ، فيعتبر حمض الميورامیك بمثابة مركب فريد لايوجد فى أى تركيب بيولوجى آخر فى الطبيعة غير البكتيريا أى أنه بصمة signature بكتيرية .

جدول ٢-٣ . مقارنة بعض العمليات الأيضية فى خلايا البكتيريا والأركيا والأيوكاريوتات .

	البكتيريا	الأركيا	الأيوكاريوتات
الفسفرة التأكسدية	مرتبطة بالغشاء	مرتبطة بالغشاء	فى الميتوكوندريا
التمثيل الضوئى	مرتبطة بالغشاء	مرتبطة بالغشاء	فى البلاستيدات
المركبات غير العضوية المختزلة كمصدر للطاقة	قد تستخدم	قد تستخدم	لا تستخدم
المسارات غير الجليكولية لتوليد الطاقة لاهوائياً	قد توجد	قد توجد	لا توجد
البولى بيتا هيدروكسى بيوترات	قد توجد	قد توجد	لا توجد
تثبيت النيتروجين	قد توجد	قد توجد	لا توجد



شكل ٢-٢ . وحدة السكر العديد للبتيدوجليكان

وتمتلك الأركيا عدد من بوليمرات الجدار الخلوى لكن ليس بينها حمض الميورامیك وأحماض ثنائية الأمين ، وأهم فرق بين هذه الكائنات هو فى طبيعة ليبيدات الجليسرول التى يتركب منها الغشاء السيتوبلازمى للخلية ، فالأجزاء الكارهة للماء فى الأركيا عبارة عن سلاسل أليفاتية متفرعة ومرتبطة مع الجلسرول بروابط إثير ether ، بينما تلك فى البكتيريا والأيوكاريوتات عبارة عن سلاسل أليفاتية مستقيمة مرتبطة مع الجلسرول بروابط إستر ester (شكل ٢-٣) .

١- الأركيا :

تضم الأركيا خمسة مجاميع متميزة ، وكلها توجد فى بيئات متطرفة وشديدة التميز وهى :

أ- أركيا الميثان methanogens :

تعيش فقط فى الأوساط الخالية من الأكسجين ، وتولد غاز الميثان عن طرق اختزال ثانى أكسيد الكربون ، قد تختزل الكبريت إلى كبريتيد الهيدروجين دون إنتاج طاقة ، تحتوى خلاياها على المرافق الإنزيمى M والعوامل ٤٢٠ و ٤٣٠ والميثانوبترين methanopterin .

ب- الأركيا المحبة للملوحة الشديدة halophiles :

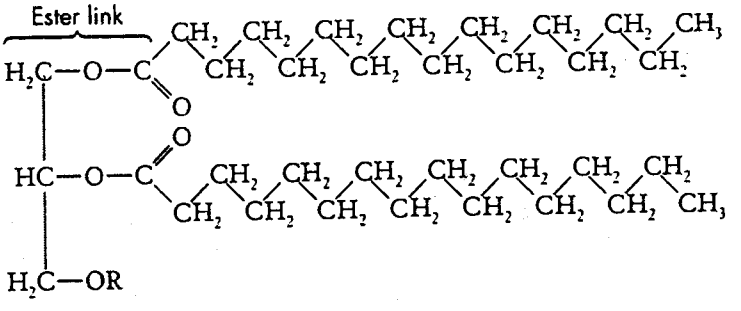
تحتاج تركيزات عالية جداً من ملح كلوريد الصوديوم ≥ مول لكى تظل حية ، وبعضها يعيش فى تركيزات ملح أقل من ٠,٥ مول ، وتوجد فى أوساط طبيعية مثل البحيرات الملحية والبحر الميت .

ج- الأركيا الممثلة للكبريت المحبة للحرارة الشديدة the extreme thermophiles :

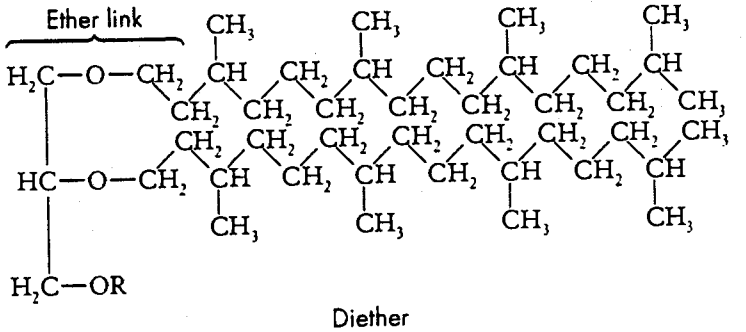
توجد فى بعض الأوساط مثل الينابيع الحارة والمنافس الحرارية البحرية ذات درجة الحرارة بين ٧٠-١١٠°م وهى الدرجة المثلى لنموها ، وتستخدم الكبريت لأيض الطاقة، والبعض يعيش فى الأوساط شديدة الحموضة(pH أقل من ٢) .

وتضم الآركيا أيضاً كل من مجموعة الأركيا المختزلة للكبريت archaeal sulfate reducers ومجموعة الأركيا التى تفتقر إلى الجدار الخلوى cell wall-less archaea .

ليبيدات البكتيريا



ليبيدات الأركيا



Diether

شكل ٢-٣ . ليبيدات الغشاء

وتمتلك الأركيا خصائص وراثية وأيضية تمكنها من التأقلم مع الظروف غير المعتادة والمتطرفة ، وتعتبر الأركيا مصدر مستقبلى فريد للاستخدام فى مجال البيوتكنولوجيا ، فأنواع جنس سلفولوبس Sulfolobus على سبيل المثال وهى من الأنواع المحبة للحرارة الشديدة من الأدوات الحيوية الواعدة للاستخدام فى استخلاص المعادن .

٢- البكتيريا :

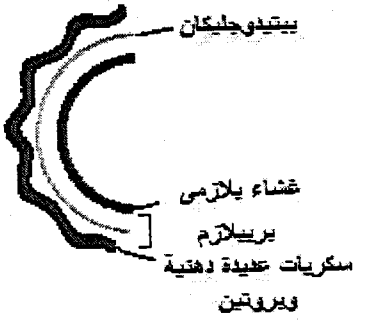
تمثل البكتيريا أغلبية البروكاريوتات الشائعة والمعروفة والتى تستخدم فى كثير من التطبيقات الحالية .

صبغ جرام :

ترجع طريقة صبغ جرام إلى الطبيب الألمانى هانز كريستيان جرام Hans Christain Gram الذى وصفها عام ١٨٨٤ أثناء عمله بمستشفى ببرلين ، حيث طور طريقة للكشف عن البكتيريا فى الأنسجة المصابة بها بواسطة هذا النوع من الصبغ التفريقى ، وفى هذه الطريقة يتم صبغ غشاء من البكتيريا مثبت بالحرارة على شريحة زجاجية بواسطة صبغة الجنسيان ثم بمحلول اليود المخفف لتكوين معقد غير ذائب من صبغة الجنسيان ومحلول اليود ، ثم يغسل التحضير إما بالكحول أو الأسيتون ، ويطلق على البكتيريا التى ينزع منها اللون بسرعة بهذه الطريقة بكتيريا سالبة لصبغ جرام ، أما التى تظل بنفسجية اللون فيطلق عليها موجبة لصبغ جرام ، وترتبط سهولة إزالة elution الصبغة ومن ثم سلوك صبغ جرام فى البكتيريا مع تركيب الجدر الخلوية ، وتمتلك البكتيريا الموجبة لجرام جدار خلوى سميك بينما تمتلك البكتيريا السالبة لجرام عادة طبقة ببتيدوجليكان رقيقة مغطاة بغشاء خارجى ، الغشاء الخارجى عبارة عن غشاء دهنى من طبقتين غير متماثلتين ، تكون السكريات العديدة الدهنية الطبقة الخارجية بينما تشكل الفوسفوليبيدات الطبقة الداخلية (شكل ٢-٤) .

موجبة لجرام

سالبة لجرام



شكل ٢-٤ . الجدر الخلوية البكتيرية

ويعطى الغشاء الخارجى للبكتيريا السالبة لصبغ جرام مقاومة عالية لكل من المضادات الحيوية مثل البنسلين والإنزيمات المحللة مثل إنزيم الليزوزيم lysozyme المحلل للجدر الخلوية للبكتيريا ، وتتوزع البكتيريا بين السالبة لجرام والموجبة لجرام ، وتظل نتيجة صبغ جرام صفة هامة إلى حد كبير فى تصنيف البكتيريا .

الميتابوليزم Metabolism :

تلعب الميكروبات دور محورى فى دورات المادة على كوكب الأرض ، وترجع أهميتها فى تحليلها للمادة العضوية التى تنتجها الكائنات ذاتية التغذية القائمة بعملية التمثيل الضوئى ، وتستخدم هذه الكائنات الطاقة الضوئية لتخليق البيوماس من عدد من الجزيئات غير العضوية البسيطة .

وتعتمد البكتيريا بشكل مطلق على تثبيت منتجات الكائنات ضوئية التغذية ، فهى تستخدم هذه المنتجات كمادة بادئة لتكوين خلاياها ، أو هى تحلل هذه المنتجات لكى تحصل على الطاقة ، وهذا وصف مبسط ومختصر لما يعرف بدورة الكربون فى الطبيعة .

ويطلق على الكائنات الحية الدقيقة التى تستخدم المركبات العضوية كمصدر رئيسى لكربون الخلية مسمى كائنات غير ذاتية التغذية heterotrophs ، فى حين يطلق على الكائنات الحية التى تستخدم ثانى أكسيد الكربون كمصدر رئيسى للكربون مسمى كائنات ذاتية التغذية autotrophs .

وتعرف الكائنات الحية التى تستخدم طاقة الروابط الكيميائية لتوليد الأدينوزين ثلاثى الفوسفات ATP مسمى كيميائية التغذية chemotrophs ، بينما تلك التى تستخدم الطاقة الضوئية لهذا الغرض تعرف باسم ضوئية التغذية phototrophs ، ويطلق على الميكروبات ذاتية التغذية الكيماوية chemoautotrophs أى التى تحصل على الطاقة من أكسدة المركبات غير العضوية مسمى كيموليثوتروفية chemolithotrophs أيضاً .

ويبين جدول ٢-٤ أنواع الميتابوليزم فى البروكاريوتات مقارنة بالأيوكاريوتات، ومن الواضح أن البروكاريوتات تظهر مدى واسع من العمليات المولدة للطاقة مقارنة بالإيوكاريوتات .

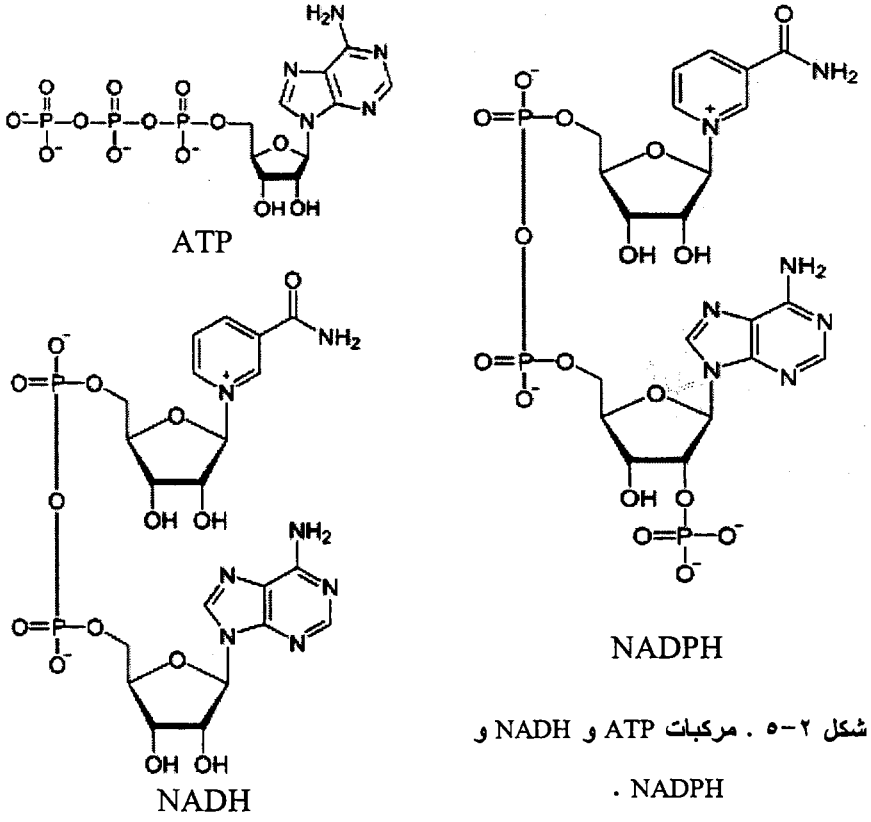
جدول ٢-٤ . أنواع الميتابوليزم فى البروكاريوتات مقارنة بالأيوكاريوتات .

المعيشة	البروكاريوتات	الإيوكاريوتات
الكيموأوتوتروفية	+	-
الكيموهيتروفية	+	الحيوانات والفطريات
الفوتوأوتوتروفية	+	النباتات
الفوتوهيتروتروفية	+	-

وتحتاج كل الكائنات الحية الدقيقة إلى طاقة وقوة اختزالية حتى يمكنها مواصلة تفاعلاتها التخليقية اللازمة لعمليات نموها ، وفى كل الحالات تنتج العمليات المولدة للطاقة مركب الأدينوزين ثلاثى الفوسفاتATP وهو جزئ معطى لمجموعة الفوسفات، وتخزن القوة الاختزالية فى النيكوتين أميد أدنين داى النيوكلوتيدات NADH وNADPH وهى جزيئات معطية للإلكترونات (شكل ٢-٥) .

١- **المعيشة الكيموهيتيروتروفية** Chemoheterotrophy :

تعتبر مسارات الهدم مجرد تتابعات للتفاعلات الكيميائية التى يتم فيها تحليل المركبات الكربونية ، حيث تتكسر الجزيئات إلى أجزاء صغيرة عادة بواسطة التفاعلات التى تتضمن إزالة الإلكترونات (بالأكسدة) ، وعادة توجد الإنزيمات التى تحفز تفاعلات الهدم فى سيتوبلازم الخلية الميكروبية الحية . وهناك قسمين من المسارات الهدمية المنتجة للطاقة هما التخمر والتنفس .



شكل ٢-٥ . مركبات ATP و NADH و NADPH .

أولاً : التخمر Fermentation :

التخمر عبارة عن المسارات الهدمية التى تعمل عندما لا يوجد مستقبل خارجى للإلكترون ، وفى عملية التخمر يعاد ترتيب تركيب مركبات الكربون مرة أخرى ، ومن ثم إطلاق الطاقة الحرة التى تستخدم لتصنيع الجزيئات الغنية بالطاقة الأدينوزين ثلاثى الفوسفات ATP ، وتعتبر هذه الجزيئات الغنية بالطاقة بمثابة وقود عمليات التصنيع والنمو للخلية الميكروبية التى تعتبر بمثابة مصنع حى .

والتخمر عملية أكسدة - اختزال غير كاملة تتوزع فيها الكترونات المادة بين النواتج ، فمثلاً فى العملية الميكروبيولوجية المعروفة بالتخمر اللاكتيكى والتى تقوم بها بعض البكتيريا والفطريات يتحول ١ جزئ من سكر الجلوكوز

جدول ٢-٥ . الميتابوليزم الميكروبى .

مصدر الطاقة	مصدر الكربون	العملية	توليد ATP و NADH (NADPH) معطى الإلكترون ($-e^-$) معطى مؤكسد	مستقبل الإلكترون ($+e^-$) مستقبل مختزل	المجاميع الميكروبية
المعيشة الكيماوية (طاقة الروابط الكيميائية)	المعيشة الكيموأورجانوتروفية (المركبات العضوية)	التخمر	مركب عضوى ← مركب عضوى مختزل وفى بعض الحالات CO_2	مركب عضوى ← مركب عضوى مختزل وفى بعض الحالات H_2	الكثير من البكتيريا الكيموليثوتروفية اللاهوائية إجبارا والاختيارية ، والخمائر .
		التنفس	مركب عضوى ↓ CO_2	O_2 ↓ H_2O	الكثير من البكتيريا الكيموليثوتروفية الهوائية إجبارا والاختيارية ، والكثير من الفطريات .
		التنفس اللاهوائى		$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$	مختزلات النترات
				$NO_2^- \rightarrow N_2$	عكس التأزت
				$SO_4^{2-} \rightarrow H_2S$	مختزلات الكبريتات
	المعيشة الكيمولليثوتروفية (أكسيد الكربون)	التنفس	$H_2 \rightarrow H_2O$	O_2	بكتيريا الهيدروجين
			$NH_3 \rightarrow NO_2^-$		مؤكسدات الأمونيا
			$NO_2^- \rightarrow NO_3^-$		مؤكسدات النيتريت
			$H_2S \rightarrow S$	H_2O	مؤكسدات الكبريت
			Or $S \rightarrow SO_4^{2-}$		
		التنفس اللاهوائى	H_2 ↓ H_2O	CO_2 ↓ CH_4	البكتيريا المنتجة للميثان
المعيشة الضوئية (طاقة الضوء)	المعيشة الفوتوأورجانوتروفية (المركبات العضوية)	النقل الضوئى	مركب عضوى ↓	Bacteriorhodopsin	الهالوبكتيريم
		التخليق الضوئى	مركب عضوى مؤكسد	NADP ↓ NADPH	البكتيريا غير الكبريتية القرمزية والبكتيريا الخضراء المنزلقة
	المعيشة الفوتوليثوتروفية (ثانى أكسيد الكربون)		$H_2S \rightarrow S$		بكتيريا الكبريت الخضراء والقرمزية
			Or $S \rightarrow SO_4^{2-}$		
			H_2O ↓ O_2	NADP ↓ NADPH	السيانوبكتيريا

إلى ٢ جزئ من الناتج الأيضى حامض لاكتيك بالإضافة إلى إنتاج طاقة بالخلية الميكروبية ، ويطلق على العملية التى يتم فيها حفظ بعض الطاقة الحرة المنطلقة من تفاعل ما فى المركبات الوسطية المنشطة المتكونة فى عملية الهدم واستخدامها مرة ثانية لتوليد الأدينوزين ثلاثى الفوسفات مسمى الفسفرة على مستوى المادة substrate-level phosphorylation .

ثانياً : التنفس Respiration :

التنفس عبارة عن المسارات الهدمية التى تتأكسد بواسطتها المركبات العضوية بشكل كامل إلى ثانى أكسيد الكربون (بصفة رئيسية من خلال دورة الأحماض ثلاثية الكربوكسيل) بسبب وجود مستقبل إلكترون نهائى خارجى ، وتحفظ الطاقة الحرة المنطلقة على هيئة بروتونات ، أو قوة محركة للبروتون، تتولد بالنقل الاتجاهى (فى اتجاه واحد) للبروتونات عبر غشاء توجد بداخله مكونات سلسلة نقل الإلكترون ، ويحدث النقل الإتجاهى للبروتونات بمرور الإلكترونات على طول سلسلة نقل الإلكترون إلى الجزئ الذى يعمل كمستقبل نهائى للإلكترون ، ويتولد الأدينوزين ثلاثى الفوسفات ATP على حسب تدرج البروتون على أثر رجوع البروتونات خلال معقد انزيمى ينتقل عبر الغشاء F_0-F_1-type adenosine triphosphate (ATPase) ، ويطلق على هذه العملية مسمى الفسفرة التأكسدية oxidative phosphorylation .

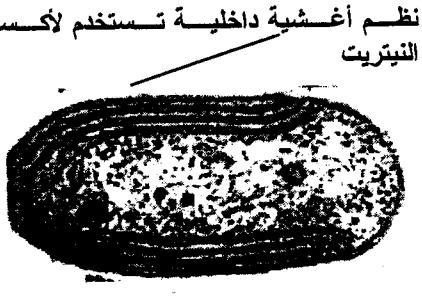
وفى عملية التنفس الهوائى aerobic respiration يستخدم الأكسجين الجزيئى O_2 كمستقبل نهائى للإلكترون ، أما فى التنفس اللاهوائى anaerobic respiration فتستخدم مادة غير عضوية غير الأكسجين O_2 كمستقبل نهائى للإلكترون لسلسلة نقل الإلكترون، ومن أمثلة مستقبلات الإلكترون أيون النترات NO_3^- الذى تستخدمه بعض البكتيريا مثل الباسيلس Bacillus والسيدوموناس Pseudomonas حيث يختزل إلى أيون النيتريت NO_2^- أو أكسيد النيتروز N_2O أو غاز النيتروجين N_2 ، ومن مستقبلات الإلكترون الأخرى الكبريتات SO_4^{2-} التى تستخدمها بعض الميكروبات لتكوين كبريتيد الهيدروجين H_2S ، والكربونات CO_3^{2-} التى تستخدمها بكتيريات أخرى لتكوين غاز الميثان CH_4 .

٢- المعيشة الكيموليثوتروفية Chemolithotrophy :

فى المعيشة الكيموليثوتروفية – التى يمكن أن يطلق عليها أيضاً مسمى المعيشة الكيموأوتوتروفية Chemoautotrophy – تستخلص طاقة الروابط الكيميائية من المركبات غير العضوية المختزلة ، حيث تستخدم بعض أنواع البكتيريا مثل بكتيريا نيتروباكتر وينوجرادسكى Nitrobacter winogradskyi (شكل ٢-٦ ، ٢-٧) المركبات غير العضوية المختزلة مثل الهيدروجين H_2 والأمونيا NH_3 والنيتريت NO_2^- والكبريت S وكبريتيد الهيدروجين H_2S وأيونات الحديدوز كمعطيات للإلكترون إلى سلاسل نقل الإلكترون المتخصصة ، الشائعة مع الأكسجين O_2 كمستقبل نهائى للإلكترون ، لكن فى بعض الأمثلة مع ثانى أكسيد الكربون أو الكبريتات لتوليد أدينوزين ثلاثى الفوسفات بالفسفرة التأكسدية .

٣- المعيشة الضوئية Phototrophy :

يقصد بالمعيشة الضوئية تحويل الطاقة الضوئية إلى طاقة كيميائية ، وتتم عملية التمثيل الضوئى بداخل معقدات جزيئية كبيرة مرتبطة بالغشاء السيتوبلازمى تحتوى على صبغات البكتيريوكلوروفيل والكلوروفيل والكاروتينات والبيلينات التى تمتص الطاقة الضوئية ، وتنقل الطاقة الممتصة إلى مراكز التفاعل ، حيث تنفصل الطاقة a charge separation فى زوج خاص من جزيئات الكلوروفيل (أو البكتيريوكلوروفيل) ، ومراكز التفاعل عبارة عن سلاسل نقل للإلكترون متخصصة ، وتبدأ عملية فصل الطاقةa charge separation تدفق الإلكترون بداخل مراكز التفاعل ، ويولد تدفق الإلكترون المشتق من الطاقة الضوئية تدرج اتجاهى للبروتون بطريقة مناظرة لتدفق الألكترون التنفسى .

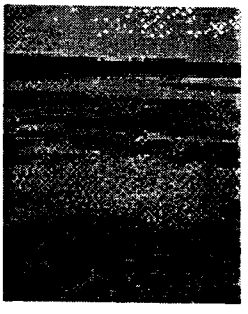


شكل ٢-٦ . ميكروب Nitrobacter winogradskyi ، كيموليثوتروف

شكل ٢-٧. ميكروب بيجياتوا البا Beggiatoa alba كيموليثوهيتروتروف (ميكستروف) .

أ- التمثيل الضوئى غير المنتج للأكسجين :

تقوم بعض أنواع البكتيريا المتخصصة مثل البكتيريا الخضراء والأرجوانية بالتمثيل الضوئى تحت الظروف اللاهوائية فقط ، وذلك لأن وجود الأكسجين يثبط عملية تخليقها لصبغاتها الضوئية ، ولا تستخدم هذه البكتيريا الماء كمادة قابلة للاختزال، كما أنها لا تطلق الأكسجين كناتج نهائى من تمثيلها الضوئى ، ولذلك يعرف هذا النوع من التمثيل الضوئى بالتمثيل الضوئى غير المنتج للأكسجين anoxygenic photosynthesis (شكل ٢-٨) .



شكل ٢-٨ . بكتيريا الكبريت الأرجوانية.

وتحتوى البكتيريا الممثلة للضوء غير المنتجة للأكسجين على صبغة كلوروفيل بكتيرى bacteriochlorophyll ، وتمثيل هذه البكتيريا للضوء يعنى استخدامها له كمصدر للطاقة لاختزال غاز ثانى أكسيد الكربون فى وجود مواد معطية للإلكترون كالهيدروجين وكبريتيد الهيدروجين وبعض الأحماض العضوية ، ولا تستطيع هذه البكتيريا استخدام الماء كمعطى للإلكترون .

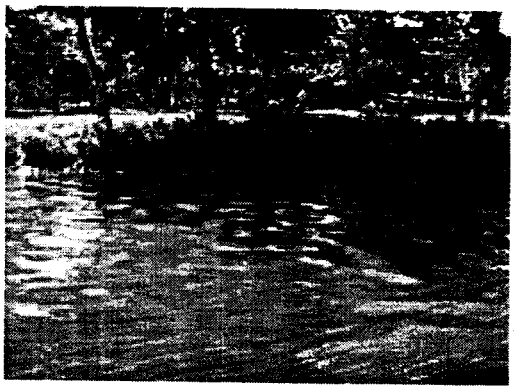
وإلى جانب صبغة الكلوروفيل البكتيرى تحتوى هذه البكتيريا على صبغات أخرى مساعدة هى الكاروتينويدات ، وهى تمتص الضوء ، وتنقل الطاقة الضوئية إلى الكلوروفيل البكتيرى ، كما تحمى الكلوروفيل البكتيرى من الضرر الذى قد يحدث له نتيجة عملية الأكسدة الضوئية .

وتتبع هذه البكتيريا فى تمثيلها الضوئى نظام الفسفرة الحلقية cyclic phosphorylation ، حيث تمتلك خلاياها صبغات النظام الضوئى رقم ١ فقط pigments of photosystem 1 ، وتنتج هذه الصبغات $NADPH^+$ ولا تنتج O_2 .

ب- التمثيل الضوئى المنتج للأكسجين :

فى بعض البكتيريا الأخرى الممثلة للضوء كالسيانوبكتيريا يختزل ثانى أكسيد الكربون أثناء عملية التمثيل الضوئى إلى كربوهيدرات وإلكترونات تزال من الماء مما يؤدى إلى انطلاق الأكسجين فى الغلاف الجوى (تشبه عملية التمثيل الضوئى فى البلاستيدات الخضراء) ، ويطلق على عملية التمثيل الضوئى التمثيل الضوئى المنتج للأكسجين oxygenic photosynthesis ، ويحدث التمثيل الضوئى المنتج للأكسجين فى كل من مجموعة السيانوبكتيريا (شكل ٢-٩) الواسعة الانتشار فى الطبيعة ، ومجموعة البروكلوروفايتات prochlorophytes المكتشفة حديثاً فى عام ١٩٩٩ والمحدودة الانتشار والأهمية .

وتمثل البكتيريا المنتجة للأكسجين الضوء فى ظروف هوائية شأنها فى ذلك شأن النباتات الخضراء ، إذ تحتوى على كلوروفيل أ وكاروتينويدات وفايكوبليبروتينات ، وتستخدم الضوء كمصدر للطاقة فى اختزال غاز ثانى أكسيد الكربون فى وجود الماء كمادة معطية للإلكترون ، مع انطلاق الأكسجين كناتج نهائى لعملية التمثيل الضوئى .



شكل ٢-٩ . السيانوبكتيريا .

وتحتوى خلايا السيانوبكتيريا على صبغات كلا النظامين الضوئيين رقم ١ ورقم ٢ بالحويصلات الغشائية المعروفة بالثايلاكويدات ، وتوجد أجسام الفايكوبلينات Phycobilisomes المحتوية على صبغات الفايكوبيلين على سطوح الثايلاكويدات .

الهالواركيا haloarchea :

تعيش الهالواركيا فى المياه المشبعة أو شبه المشبعة بالملح ، والأوساط التى يتوفر بها كميات كبيرة من الملح والرطوبة والمادة العضوية ، وتقوم الهالواركيا بنوع فريد من التمثيل الضوئى عندما يكون الضغط الجزئى للأكسجين منخفضاً ، ففى هذه المجموعة يؤدى امتصاص الضوء إلى تماثل جزئ شبكى مرتبط تساهمياً بنوع من بروتين الغشاء السيتوبلازمى يوجد بوفرة ويطلق عليه البكتيريورودوبسين bacteriorhodopsin ، بعد ذلك يعود الغشاء الشبكى إلى طبيعته الأصلية ، وينتج عن الدورة الضوئية الشبكية ضخ اتجاهى للبروتونات بواسطة البكتيريورودوبسين إلى خارج الخلية مع توليد قوة محركة للبروتون ، ويتولد الأدينوزين ثلاثى الفوسفات نتيجة تدرج البروتون .

أساليب توليد الطاقة :

تستخدم أنواع البكتيريا المختلفة عملية أو أخرى من العمليات السابقة كأسلوب مفضل لتوليد الطاقة ، وعلى أى حال ، تستطيع كل البكتيريا تقريباً النقل من أحد أشكال إنتاج الطاقة لشكل آخر ، اعتماداً على طبيعة المادة المتاحة لها وعلى ظروف

البيئة حولها ، فعلى سبيل المثال ، تنمو البكتيريا الأرجوانية غير الكبريتية على عدد من الأحماض العضوية وتحصل على طاقتها بالتنفس عندما يتواجد الأكسجين ، وعلى أى حال ، فتحت الظروف اللاهوائية وفى وجود الضوء تخلق هذه الكائنات أغشية داخل خلاياها تمتلك المعقدات اللازمة للتمثيل الضوئى ، ثم تستخدم الطاقة الضوئية لتوليد جزيئات الأدينوزين ثلاثى الفوسفات ATP .

وتحت الظروف الهوائية ، تؤكسد بكتيريا القولون النمطية ايشريشيا كولاى E. coli بعض المواد مثل السكسنات واللاكتات ، وتستخدم نظام نقل إلكترون مع الأوبيكينون ubiquinone والسيتوكروم b والسيتوكروم o كمكونات ومع الأكسجين O_2 كمستقبل نهائى للإلكترون .

أما تحت الظروف اللاهوائية ، ومع مادة الفورمات تستخدم بكتيريا ايشريشيا كولاى E. coli نظام نقل إلكترون مع الأوبيكينون ubiquinone وسيتوكروم b كمكونات ومع النترات كمستقبل نهائى للإلكترون .

وعندما تنمو بكتيريا ايشريشيا كولاى على مادة الأوكسالواسيتات تحت الظروف اللاهوائية فإن تتابع الحوامل يكون نيكوتين اميد ادنين داى نيكلوتيد NADH والفلافوبروتين والميناكوانون والسيتوكروم b، والفيومارات كمستقبل نهائى للإلكترون.

وهناك مئات من الأمثلة الأخرى لمثل هذا التنوع الأيضى الواسع بين الأنواع البكتيرية ، ومثل هذه المرونة فى أسلوب توليد الطاقة مقصور فقط على البروكاريوتات ويعطى هذه الكائنات نوع من الاحتكار الافتراضى على استيطان بعض الأماكن البيئية ، إلى جانب امتلاك البكتيريا من القدرات ما يجعلها تزدهر تحت ظروف يصعب على الكائنات الراقية أن تعيش فيها ، وتستوطن البكتيريا كل الأوساط البيئية ، وهى مرنة جداً فيما يتعلق بالمواد المستخدمة والتغيرات البيئية ، وبسبب كبر نسبة سطحها إلى حجمها surface area / volume بشكل غير عادى مقارنة بذات النسبة فى بقية الأحياء فإنها تقوم بمعدلات عالية جداً من الأيض والتكاثر ، ولديها قدرات تحليلية غير عادية تسمح بمعدنة المادة العضوية المنتجة .

المراجع :

Agogué, H, M. Brink, J. Dinasquet, G.J. Herndl (2008). Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. Nature 456, 788–791.

Bauman, W. Robert; Tizard, R. Ian; Machunis-Masouka, Elizabeth (2006). Microbiology. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

Biebl, H., I. Wagner-Döbler (2006). Growth and bacterochlorophyll formation in taxonomically diverse aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in chemostat culture: influence of light regimen and starvation. Process Biochem 41, 2153–2159.

Bryant, D.A., N.U. Frigaard (2006). Prokaryote photosynthesis and phototrophy illuminated. Trends Microbiol 14, 488–495.

Casamayor, E.O., J. García-Cantizano, C. Pedrós-Alió (2008). Carbon dioxide fixation in the dark by photosynthetic bacteria in sulphide-rich stratified lakes with oxic–anoxic interfaces. Limnol Oceanogr 53, 1193–1203.

DasSarma, S. and P. Das Sarma (2006). Halophiles, Encyclopedia of Life Sciences, Wiley, London.

Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), (2006). The Prokaryotes: Vols. 1-7 (Set) (v. 1-7), Springer, Berlin.

Howland, J.L. (2000). The Surprising Archaea (New York and Oxford: Oxford University Press).

Kastritis, P.L., N.C. Papandreou, S.J. Hamodrakas (2007). Haloadaptation: insights from comparative modeling studies of halophilic archaeal DHFRs. Int J Biol Mac 41 (4), 447-453.

Liu, Y., W.B. Whitman (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic Archaea. Ann NY Acad Sci 1125, 171–189.

Martin, W (2005). Archaebacteria (Archaea) and the origin of the eukaryotic nucleus. Curr. Opin. Microbiol. 8 (6), 630–637.

Raven, J.A., C.S. Cockell, C. De La Rocha (2008). The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363, 2641–2650.

Roger, A.J., A.G.B. Simpson (2009). Evolution: Revisiting the Root of the Eukaryote Tree. Current Biology 19 (4): R165–167.

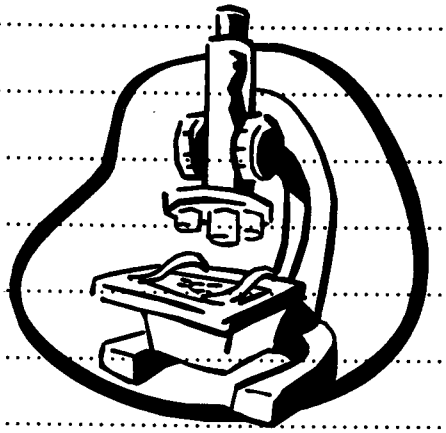
Sapp, J. (2005). The prokaryote-eukaryote dichotomy: meanings and mythology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69 (2): 292–305.

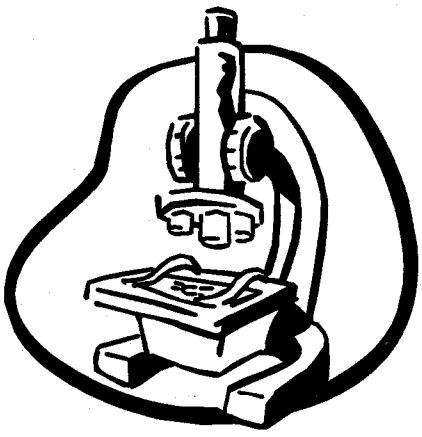
Thanbichler, M., S. Wang, L. Shapiro (2005). The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure. J Cell Biochem 96 (3), 506–521.

Thauer, R.K., S Shima (2006). Biogeochemistry: Methane and microbes, Nature, 440, 878-879.

Yool, A., A.P. Martin, C. Fernández, D.R. Clark (2007). The significance for nitrification for oceanic new production. Nature 447, 999–1002.

Zimmer, C. (2009). Origins. On the origin of eukaryotes. Science 325 (5941), 666–668.





الفصل الثالث

أهمية تعريف وتصنيف الكائنات الحية الدقيقة

■ التنوع الميكروبى وتطبيقاته ■

مقدمة :

تتميز الكائنات الحية الدقيقة بأنها كائنات متناهية فى الصغر ، ومن الصعب التعرف عليها والتمييز بينها بمجرد عملية الفحص باستخدام المجهر الضوئى ، وكثيرا ما يصنف البعض الميكروبات معطياً إياها أسماء غير أسمائها الحقيقية دون دراية . وفى عمليات البحث الدؤوب عن كائنات حية دقيقة للاستخدام فى عملية تقنية بعينها أو فى إنتاج مواد أيضية غير معتادة ، قد تتمخض العملية عن عزل وتسمية ميكروبات سبق عزلها بالفعل وهو جهد مضنى وضائع .

ولتصنيف كائن حى دقيق ، يجب أولاً عزل عدد كبير من الأفراد لها شكل موحد أى مزرعة نقية axenic culture ، وفى الطرق المعتادة للتقسيم ، يتم فحص الخصائص المظهرية ، وهى الخصائص التى تنتج من صفات الكائن الوراثية التى يحملها طاقم جيناته ، وتشمل الخصائص المظهرية الصفات المظهرية مثل الحجم والشكل للخلايا الفردية ، ونظام تجمع وترتيب الخلايا ، ووجود وتوزيع الأسواط وطبيعة طبقات الغلاف مثل الغشاء السيتوبلازمى والجدار الخلوى ، والخصائص السلوكية مثل الحركة ، والاستجابة الكيماوية ، والاستجابة الضوئية ، والخصائص المزرعية مثل شكل وحجم المستعمرة ، ودرجة الحرارة المثلى للنمو ، ومدى تركيز الأس الهيدروجينى ، والاحتياجات من الأكسجين ، والتركيزات المرتفعة من الأملاح ، والقدرة على تحمل الظروف البيئية المغايرة بتكوين الجراثيم spores ، وأنواع المركبات التى ينمو عليها الميكروب ، وطرق هدمها ، وطبيعة النواتج النهائية بما فيها دخول الأكسجين فى العملية من عدمه .

وكما هو معتاد يتم فحص العشرات من الصفات الخاصة بالميكروب للاستفادة بها فى عملية التصنيف بمساعدة الحاسب الآلى فيما يعرف بالتقسيم العددى numerical taxonomy ، ومن الصفات التى يتم فحصها يمكن الرجوع إلى مرجع برجى لتقسيم البكتيريا Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – وهو المرجع الأساسى على مستوى العالم فى تصنيف البكتيريا – لتعريف الميكروب الذى تم عزله .

ويشار إلى علم التصنيف البيولوجى بعلم التقسيم Taxonomy ، ويتكون علم التقسيم من ثلاثة أجزاء منفصلة ، لكنها ذات علاقة ببعضها البعض ، هى التصنيف classification (ترتيب الميكروبات فى مجموعات تعرف بالوحدات التقسيمية taxa على أساس التشابه المتبادل) ، والتسمية nomenclature (إعطاء أسماء للمجموعات التقسيمية طبقاً للقواعد العلمية المتعارف عليها) ، والتعريف identification (وهو الجانب العملى فى علم التقسيم ، أى الاستخدام العملى للتصنيف فى تعريف ميكروب معزول) .

وعادة يتم تعريف جنس ونوع أحد البروكاريوتات المكتشفة حديثاً على أساس تقسيمى متعدد polyphasic taxonomy ، ويشمل هذا المدخل التصنيف الطبيعى والتصنيف التطورى والتصنيف الوراثى .

التصنيف الطبيعى Phenetic (Phenotypic) classification :

استخدم التصنيف الطبيعى لفترة طويلة جداً فى تصنيف الميكروبات فى مجموعات أيضاً على أساس التشابه المتبادل فى صفاتها الطبيعية مثل الخصائص الشكلية ككل والأنماط البيوكيماوية ، ويرتب هذا النظام التنوع البيولوجى ويوضح وظيفة التركيبات المظهرية ، فمثلاً يجمع هذا النظام الميكروبات المتحركة معاً .

ومع أن التصنيف الطبيعى قد يظهر العلاقات التطورية الممكنة إلا أنه لايعتمد على التحليل التطورى ، ويقارن هذا التصنيف الكثير من الصفات دون افتراض أن هناك صفات أكثر أهمية من ناحية التطور عن صفات أخرى ، أى أن هذا النوع من التصنيف يقارن الكثير من الصفات قدر الإمكان ، والكائنات التى تشترك فى الكثير من الصفات تمثل مجموعة منفردة أو وحدة تقسيمية .

التصنيف التطورى Phylogenetic (Phyletic) classification :

يقارن هذا التصنيف الكائنات على أساس العلاقات التطورية ، وقد تم إدراك الاختلافات والتشابهات بين الميكروبات كنتيجة لعملية التطور التى أقرها العلماء القدامى ، وفى القرن العشرين وجد العلماء أن نظم التصنيف القائمة على التطور لم

تعد بذات قيمة بسبب عدم وجود تسجيلات حفرية جيدة ، إلا أن اقتراح Woese and Fox استخدام تتابعات نيوكلوتيدات حمض ر ن أ الريبوسومى لتقدير العلاقات التطورية بين الميكروبات فتح الباب على مصراعيه لتوضيح منشأ وتطور الميكروبات.

وقد تم دراسة الاختلاف فى التتابعات فى الآلاف من نيوكلوتيدات حمض ر ن أ الريبوسومى وذلك فى قواعد البيانات العالمية الخاصة ببنك الجينات وقواعد البيانات الخاصة بالريبوسومات ، وترتكز قوة الحمض النووى ر ن أ الريبوسومى كأداة تطورية وتقسيمية على خصائص جزئ ر ن أ الريبوسومى التى تجعله أداة جيدة للتاريخ التطورى والحجم المتزايد لقواعد بيانات التتابع لحمض ر ن أ الريبوسومى، ويتركز الاهتمام بجزئ ر ن أ الريبوسومى بسبب وجوده فى كل خلايا البروكاريوتات، كما أن حجمه يسهل تحليل التتابع(مؤلف من حوالى ١٥٠٠نيوكلتيدة)، كما أنه ينظم جزئ له تاريخ طويل جداً ، فليس هناك خلية حية فى أى مملكة على سطح الأرض اليوم تخلو من الجزيئات الريبوسومية .

التصنيف الوراثى Genotypic classification :

يقارن هذا التصنيف التشابه الوراثى بين الكائنات الحية من خلال مقارنة الجينات المفردة أو الجينومات ككل ، وقد أصبح من المقبول منذ عام ١٩٧٠ أن البروكاريوتات التى لها جينومات متناظرة بنسبة ٧٠% على الأقل تنتمى إلى نفس النوع ، وتأخذ قيمة الحد الحرج ٧٠% لتجنب التشتت لتصميم الأنواع الموجودة ، وهو غير مبنى على اعتبارات نظرية لتعريف الأنواع ، وتتفق البيانات الوراثية المتحصل عليها من المداخل الجزيئية الأحدث عادة مع التصميمات الأقدم .

التصنيف العددى Numerical classification :

يطلق عليه أحياناً مسمى taxometrics ، ويعتمد التصنيف العددى على قواعد قديمة وضعها ادانسون Adanson منذ مايربو على قرنين ، ولذلك يعرف التصنيف العددى بتصنيف أدانسونيان Adansonian classification ، وقد سهلت أجهزة الحاسب

المطورة الاستخدام الحالى للمدخل الكمى المعروف بالتصنيف العددى ، ويقصد بالتصنيف العددى تجميع الميكروبات بالطرق العددية فى وحدات تقسيمية على أساس خصائصها .

وفى هذا التصنيف يتم تجميع البيانات لعدد ٥٠ صفة إلى عدة مئات من الصفات المظهرية والبيوكيماوية والفسيولوجية على أساس أن لكل صفة وزنها وتأثيرها المتساوى مع غيرها من الصفات ، ويشار لكل صفة بعلامة + أو – على أساس وجودها من عدمه ، وبمساعدة الحاسبات يتم عمل الارتباطات المتبادلة بين الصفات المدروسة لمقارنة الصفات ببعضها البعض .

وتقدر درجة القرابة بين السلالات من عدد التشابهات – سواء الموجبة أو السالبة – بين الصفات المختلفة للسلالات ، ودرجة القرابة بين سلالة وأخرى إذن هى نسبة عدد الصفات المتشابهة بين السلالات إلى عدد الصفات المختبرة .

وعند تقدير ١٠٠ صفة مختلفة لعدد من الميكروبات ، قد تكون المائة صفة موجبة مع بعض الميكروبات ، أى أن نسبة التشابه ١٠٠% ، وقد تكون هناك ٩٠ صفة متشابهة ، أى نسبة التشابه ٩٠% ، وهنا يمكن وضع تقسيم يرتكز على النسبة المئوية للتشابه ، حيث تجمع أعداد كبيرة من الميكروبات ويدرس التشابه لعدد كبير من الصفات بمساعدة الحاسبات .

الرتب التقسيمية :

تعتبر المجموعة Domain أعلى مرتبة تقسيمية ، وتنتمى كل البروكاريوتات إما إلى البكتيريا أو الأركيا ، ويرتب الوضع التقسيمى للميكروب تنازلياً من قبيلة إلى صف ورتبة وعائلة وجنس حتى نوع ، ويعتبر النوع species هو الوحدة التقسيمية الأساسية فى التصنيف الميكروبى ، والنوع فى البروكاريوتات prokaryotic species مجموعة من السلالات التى تشترك فى الكثير من الصفات الثابتة وتختلف بشكل حقيقى عن مجموعة أخرى من السلالات ، والنوع النمطى (المرجع) type species هو النوع الممثل للجنس والذى يحمل كل صفاته وتتم مقارنة الأنواع الأخرى به .

أما السلالة strain فهى مزرعة ميكروبية نقية مفردة ، وتتعدد صفات سلالات النوع الميكروبى الواحد ، ولذلك تقسم سلالات النوع على حسب صفاتها إلى سلالات حيوية Biovars (.BV) تختلف فى صفاتها البيوكيماوية أو الفسيولوجية ، وسلالات مظهرية Morphovars (.Mv) تختلف فى صفاتها المظهرية ، وسلالات سيرولوجية Serovars (.Sv) تختلف فى صفاتها الأنتيجينية ، وسلالات مرضية Pathovars (.Pv) تختلف فى صفاتها الإمراضية بالنسبة لبعض العوامل ، وسلالات فاجية Phagvars (.Phv) تختلف فى قابلية السلالة للتحلل بفاج معين .

أما الكلون Clone (النسيلة) فهى مستعمرة بكتيرية أفرادها متماثلة وأصلها خلية واحدة تكاثرت لا جنسياً بالانقسام الثنائى .

وفى العادة تسمى الميكروبات طبقاً لنظام التسمية الثنائية binomial nomenclature الذى وضعه السويدى لينيوس Carl von Linne عام ١٧٦٠ ، ويتضمن الاسم العلمى للميكروب مقطعين الأول اسم الجنس والثانى اسم النوع .

التقسيم والتطور :

كقاعدة عامة ، يمكن تصنيف أى عدد من الكائنات الحية طبقاً لمجموعة من المعايير ، ومهما كان طول مخطط التعريف فإنه فى النهاية ينتج عنه تعريف للسلالات الجديدة ، على أى حال فإن مخطط التقسيم المبنى على خصائص اعتباطية كلية من المحتمل أن يكون استعماله بشكل عملى محدود جداً ، وهكذا يجمع علماء التقسيم الأنواع القريبة المتشابهة بوضوح معاً فى جنس ، والأجناس ذات القرابة فى عائلة ، على أمل أن هذا التقسيم يعكس بوضوح العلاقات التطورية بين الكائنات المختلفة .

وفى مرجع بيرجى تم أيضاً التأقلم مع هذا التصنيف الترتيبى ، لكن كيف يبنى شخص ما مثل هذا المخطط التصنيفى ، ولبناء مخطط تصنيف على أساس الصفات المظهرية يجب أن يقرر القائم بالتقسيم أى الخصائص أساسية وهكذا تكون مفيدة لتصنيف الكائنات إلى مجموعات رئيسية مثل العائلات ، وأى الصفات أكثر قيمة

وملائمة لتصنيف المجموعات الرئيسية إلى أخرى أصغر مثل الأنواع ، وفى التصنيف التقليدى فإن شكل الخلية البكتيرية على سبيل المثال تم استخدامه لتصنيف البكتيريا فى مجموعات أكبر ، ففى حالة بكتيريا حمض اللاكتيك والتى تحصل على الطاقة من تخمير السكريات السداسية إلى حمض لاكتيك وإيثانول وثانى أكسيد الكربون فى بعض الأحيان وهى بكتيريا لها خلايا مستديرة ولها خلايا عصوية تم وضعها فى مجموعتين مختلفتين تماماً فى مرجع بيرجى .

وفى السنوات الأخيرة توفرت المعلومات الكمية عن العلاقات التطورية بين الكائنات خلال مقارنة تتابعات أحماضها النووية د ن أ ، ولأن عالم البكتيريا متنوع ، فإن هذه الطريقة تكون مفيدة فقط فى مقارنة أنواع البكتيريا ذات العلاقة الوثيقة ، ماعدا ذلك ، فإن تتابعات الحامض النووى د ن أ تكون غير متشابهة بمعنى عدم الحصول على بيانات لها قيمة معنوية ، ولذلك استخدمت تتابعات الحامض النووى ر ن أ الريبوسومى فى عملية المقارنة ، وترجع الريادة فى هذا المجال إلى عالم الميكروبيولوجى الأمريكى كارل ووز Carl Woose فى بداية السبعينيات والتى أحدثت ثورة حقيقية فى هذا المجال ، فالحامض النووى ر ن أ الريبوسومى يوجد ويؤدى وظيفة فى كل كائن خلوى ، والأكثر أهمية أن تتابعاته قد تغيرت ببطء شديد أثناء وقت التطور ، كما أنه لذلك معلم مثالى لمقارنة الكائنات ذات القرابة المتباعدة ، ويتم حفظ التتابعات المميزة للنيوكلوتيدات ، أو التتابعات التى تعتبر بمثابة بصمة ، لوقت طويل فى فرع معين فى فى شجرة التطور ، ويمكن هذا العلماء من تصميم كائنات لمختلف الفروع بثقة كبيرة .

وسوف يعتمد التقسيم المستقبلى للبكتيريا على علاقاتها التطورية ، وعلى أى حال فعندما صدرت الطبعة التاسعة من مرجع بيرجى ، فإن قليل من هذه العلاقات هو الذى تم فهمه ، ومن ثم فإن التصنيف فى مرجع بيرجى قد بنى على النموذج التقليدى، وقد خلق ذلك مشاكل جمة ، فمع أن بكتيريا حمض اللاكتيك وضعت بعيداً عن البكتيريا ذات الشكل العصوى فى مرجع بيرجى ، فإن تتابعات الحامض النووى ر ن أ

الريبوسومى قد أوضح أن الكثير من بكتيريا حمض اللاكتيك ذات علاقة وثيقة جداً بالبكتيريا ذات الشكل العصوى .

وفى الوقت الراهن ، فإن التصنيف فى مرجع بيرجى ، هو النظام المقبول عالمياً فقط ، والسؤال الذى يطرح نفسه هل توجد أى قيمة فى استخدام التقسيم التطورى لكارل ووز ومرافقوه ، بالتأكيد لكن يجب أن يوضع فى الاعتبار دائماً الوقت الطويل الذى نتعامل فيه مع تطور البكتيريا ، فحتى البكتيريات التى يعتقد أنها ذات قرابة وثيقة من الناحية التطورية تكون متباعدة تماماً ، وقياساً على الوقت التطورى بالنسبة للتغيرات التى حدثت بين الكائنات الأرقى ، وهكذا إذا نظرنا للصفات التى تتغير سريعاً أثناء وقت التطور ، فإن العلاقة التطورية لاتقدم المساعدة ، على أى حال فإنها ستساعدنا بالتأكيد فى دراسة الخصائص التى تتغير ببطء ، وكمثال التعضون وتنظيم المسارات التخليقية الحيوية ، ولأن عالم البروكاريوتات متنوع ، يتم رؤية المسارات المختلفة فى التخليق الحيوى لمثل هذه المركبات كالأحماض الأمينية .

الخصائص الكلاسيكية Classical characteristics :

تستخدم المداخل الكلاسيكية للتصنيف الخصائص المظهرية والفسيولوجية والبيوكيماوية والبيئية إلى جانب الخصائص الوراثية ، ويتم توظيف مثل هذه الخصائص فى التصنيف الميكروبى منذ سنوات طويلة ، وهى مفيدة تماماً فى التعريف الروتينى ، وقد تفيد فى الإمداد بالمعلومات التطورية .

الخصائص المظهرية Morphological characteristics:

هناك أكثر من سبب يجعل الصفات المظهرية (جدول ٣-١) مفيدة فى تصنيف البكتيريا ، منها سهولة دراسة وتحليل الصفات المظهرية ، ومقارنة الصفات المظهرية له قيمة فى التصنيف لأن الصفات التركيبية المعتمدة على التعبير الجينى عادة ثابتة وراثياً ولا تختلف كثيراً بالتغيرات البيئية ، وهكذا يعتبر التشابه المظهرى بمثابة دلالة جيدة للقرابة التطورية .

جدول ٣-١ . بعض الخصائص المظهرية المستخدمة فى التصنيف والتعريف .

شكل الخلية
حجم الخلية
الشكل المظهرى للمستعمرات
الخصائص التركيبية الدقيقة
المحتويات الداخلية
اللون
الأهداب والأسواط
السلوك الصبغى
آلية الحركة
شكل الجراثيم الداخلية وموضعها فى البكتيريا المكونة للجراثيم
الشكل المظهرى للجرثومة والموضع

الخصائص الفسيولوجية والأيضية :

Physiological and metabolic characteristics

ترجع فائدة الخصائص الفسيولوجية والأيضية (جدول ٣-٢) أنها ترتبط بشكل مباشر بطبيعة ونشاط النظم الإنزيمات الميكروبية وبروتينات النقل ، وطالما أن البروتينات هى نواتج جينية فيمد تحليل هذه الصفات بمقارنة غير مباشرة الجينوم الميكروبات .

الخصائص البيئية Ecological characteristics :

تعتبر قدرة الميكروب على استيطان وسط بيئى متخصص بمثابة صفة تصنيفية مفيدة ، وقد تكون بعض الميكروبات متشابهة جداً فى كثير من النواحى الأخرى ، لكن تقطن أماكن بيئية متباينة ، مما قد يلقى بظلال من الشك على قرابتها .

ومن الخصائص البيئية الهامة فى التصنيف دورة الحياة ، وطبيعة العلاقات التكافلية ، والمقدرة على إحداث المرض فى عائل معين ، وتفضيلات الموطن من حيث درجة الحرارة ورقم الحموضة والأكسجين والتركيز الأسموزى .

جدول ٣-٢ . بعض الخصائص الفسيولوجية والأيضية المستخدمة فى التصنيف والتعريف .

مصادر الكربون والنيتروجين
مكونات الجدار الخلوى
مصادر الطاقة
منتجات التخمير
طرز التغذية
درجات الحرارة المثلى والمدى الحرارى
الحركة
التحمل الأسموزى
احتياجات الأكسجين
رقم الحموضة الملائم
صبغات التمثيل الضوئى
الاحتياجات الملحية والمقاومة للملوحة .
المواد الأيضية الثانوية المتكونة
الحساسية لمثبطات الأيض والمضادات الحيوية
المواد المخزنة بالخلية

التحليل الوراثى Genetic analysis :

على الرغم من عدم تكاثر البروكاريوتات جنسياً فإن دراسة التبادل الجينى الكروموسومى خلال التحول والتزاوج والاستقطاع يفيد فى تصنيفها .

أ. التحول Transformation :

يحدث فقط بين الأنواع البروكاريوتية ونادراً مايحدث بين الأجناس ، وحدوث التحول بين سلالاتين يعطى دليل على علاقة قرابة طالما أن التحول لايحدث مالم تكن الجينومات متشابهة .

ب. التزاوج Conjugation :

تمد دراسات التزاوج ببيانات مفيدة فى التصنيف بصفة خاصة فى حالة البكتيريا المعوية ، فبكتيريا الإيشريشيا Escherichia تتزاوج مع بكتيريا السالمونيلا Salmonella والشيجلا Shigella لكن لاتتزاوج مع البروتيس Proteus والإنتروباكتر Enterobacter ، ويتوافق هذا مع المعلومات الأخرى التى تظهر أن الأجناس الثلاثة الأولى أكثر قرباً لبعضها البعض عن قربها لجنسى البروتيس والإنتروباكتر .

ج. البلازميدات Plasmids :

توجد المعلومات الوراثية الخاصة بالكثير من أفراد البروكاريوتات (وبعض الخمائر والفطريات الأخرى) ليس فقط على الكروموسوم ، لكن توجد على عناصر من الحامض النووى د ن أ خارج الكروموسوم ، لاتندمج معه وتظل خارجة عنه ، وتعرف باسم البلازميدات plasmids ، وتتكرر البلازميدات ذاتياً داخل الخلية ، ويمتلك الكثير من البلازميدات عدد من الجينات تمكنها من التحرك من خلية بكتيرية إلى أخرى ، ولا يؤثر فقد الخلية البكتيرية لبلازميداتها على وظائفها الأساسية ، ومن ثم يمكن النظر إلى الخلية على أنها بمثابة عائل host للبلازميدات ، وتشبه البلازميدات الكروموسومات البكتيرية إلا أنها أصغر حجماً .

والبلازميدات عبارة عن جزيئات من خيط مزدوج من الحامض النووى د ن أ لها شكل دائرى أو خطى ، لكن معظم البلازميدات المعروفة ذات شكل دائرى ، وتمتلك البلازميدات الخطية تركيب خاص أو تتابع فى نهايتها يمنع تحليلها ويسمح بتكرارها .

وللبلازميدات القدرة على التكرار بشكل تلقائى ، وفى الغالب يتكرر البلازميد بمعدل مختلف ، وأحياناً بجدول زمنى مختلف من الحامض النووى د ن أ الكروموسومى ، وقد تحتوى الخلايا نسخ متضاعفة من البلازميدات المتخصصة ، وتنظم بعض البلازميدات المقاومة لبعض المضادات الحيوية أو أيونات المعادن الثقيلة أو الإشعاع فوق البنفسجى ، ومن الأمور المدهشة أن بعض البلازميدات الأخرى تحمل الجينات المنظمة للوظائف التى يعتقد أنها تميز النوع العائل ، فعلى سبيل المثال،

فإن معظم الخصائص المميزة لبكتيريا سيدوموناس Pseudomonas الفلوروسنتية ، يعتقد أنها مقدرتها على تحليل عدد كبير من المركبات العضوية ، وعلى أى حال فإن الكثير من هذه الجينات والتى تجعل عملية التحليل ممكنة موجودة على البلازميدات ، ونفس الوضع فى حالة جينات تثبيت نيتروجين الهواء الجوى فى أفراد جنس الرايزوبيوم Rhizobium ، تلك الأفراد التى تقوم بمعظم عمليات تثبيت النيتروجين على الأرض ، ونفس الوضع فى حالة جينات العوامل المسببة للمرض (السموم وإنزيمات تحليل البروتين والهيموليسين وهى البروتينات التى تحلل كرات الدم الحمراء والخلايا الحيوانية الأخرى) فى الكثير من البكتيريا الممرضة ، ولأن البلازميدات فى بعض الأحيان تمنح عوائلها صفات مظهرية ملحوظة تماماً ، فإنها تؤثر فى تصنيف الكائنات العائلة ، وعلى سبيل المثال ، فإن سلالات معينة من النوع ستربتوكوكس لاكتيز Streptococcus lactis المصنفة على أنها S. lactis subsp. diacetyllactis تحمل بلازميد يمكنها من استعمال السترات ، وهذه هى السلالات المسئولة عن النكهة المميزة لمنتج لبنى كالزبدة ، والتى تنتج من الداى أسيتيل حيث تنتج عدما يتم تخمير السترات فى اللبن .

وتمتلك بعض البلازميدات المقدرة على نقل نفسها من عائل بكتيرى لآخر ، وأحياناً يكون العائل بمثابة جنس أو نوع مختلف ، ومن ناحية أخرى فإن جينات البلازميدات يمكن أن تتكامل فى كروموسوم العائل حيث تصبح بعد ذلك جزء دائم من الهيئة الوراثية للخلية ، وإذا تكرر حدوث هذا النقل الجانبى lateral للمعلومات الوراثية فى المجموعات المختلفة للبكتيريا ، فإنه يجعل كل خلية بكتيرية بمثابة تشكيلة معقدة جداً للجينات من كثير من المصادر المختلفة .

وقد تم الاستفادة من مقدرة البلازميدات على تكرار نفسها فى إنشاء نواقل النسخ، إذ يحتوى الكثير من البلازميدات على وظيفة تضاعف مشتقة من البلازميدات، ولذلك تحفظ تحديداً فى سيتوبلازم البكتيريا العائلة ، وعلى أى حال ، ففى حالات كثيرة ، يحتاج تضاعف البلازميدات مشاركة وظائف العائل أيضاً ، وهذه واحدة من أسباب بقاء البلازميدات فى مدى محدد من العوائل ، وهناك طريق واحد لإنشاء حامل

يمكنه التضاعف فى مدى واسع من العوائل وهو استخدام جينات التضاعف من بلازميد له مدى عوائلى واسع ، وهنا مرة أخرى ، فإن المعرفة بالعلاقات التطورية تساعدنا على التنبؤ بمدى البكتيريات العائلة التى تدعم تضاعف مثل هذه النواقل ، فعلى سبيل المثال ، فإن الكثير من البلازميدات ذات المدى العوائلى الواسع والمعزولة من البكتيريا الممثلة للضوء والمعروفة بمجموعة البكتيريا الأرجوانية purple bacteria يحتمل أن تتضاعف فى معظم أفراد هذه المجموعة ، أو على الأقل فى أفراد نفس تحت المجاميع .

الخصائص الجزيئية Molecular Characteristics :

فى الوقت الراهن يعتمد فهمنا لتطور وتصنيف الميكروبات بشكل أساسى على دراسة حمض د ن أ DNA وحمض ر ن أ RNA والبروتينات .

١- تركيب قواعد الحامض النووى Nuclic acid base composition :

يمكن مقارنة جينوم الميكروبات بشكل مباشر ، ويمكن تقدير التشابه بينها بعدة طرق أولها وأبسطها تقدير تركيب قواعد الحمض النووى د ن أ ، ويحتوى الحامض النووى د ن أ أربعة قواعد بيورين purine وبيريميدين pyrimidine هى الأدنين adenine (A) والجوانين guanine (G) والسيتوزين cytosine (C) والثيمين thymine (T) ، وتعكس النسبة المئوية لجزيئات القواعد النووية الجوانين + السيتوزين إلى المحتوى الكلى لجزئ الحمض النووى د ن أ التتابع الأساسى وتختلف بالتغيرات فى التتابع كما بالمعادلة التالية ، وتتراوح نسبة

$$\text{Mol\% G + C} = \frac{G+C}{G+C+A+T} \text{ X } 100$$

الجوانين + السيتوزين فى البروكاريوتات بين ٢٥ إلى ٨٠% تقريباً ، وعلى الرغم من هذا المدى الواسع من الاختلاف إلا أن هذا المحتوى ثابت فى سلالات النوع الواحد ، وإذا بلغت نسبة الاختلاف بين ميكروبين فى محتوى الجوانين + السيتوزين أكثر من حوالى ١٠% فذلك يعنى أن تتابع القواعد مختلف تماماً بجينوم كل ميكروب عن الآخر، ولايعنى التشابه الشديد بين ميكروبين فى محتوى الجوانين + السيتوزين أن

هناك تشابه فى تتابع قواعد الحمض النووى د ن أ .

ويعتبر محتوى الجوانين + السيتوزين بمثابة مقياس جيد لأنه يؤكد عمليات التقسيم التى تم إجراؤها بطرق أخرى ، كما يفيد هذا المحتوى فى توصيف أجناس البروكاريوتات لأن الاختلاف داخل الجنس يقل عادة عن ١٠% ، بينما يختلف كثيراً بين الأجناس المختلفة .

٢- تزاوج الحامض النووى Nuclic acid hybridization :

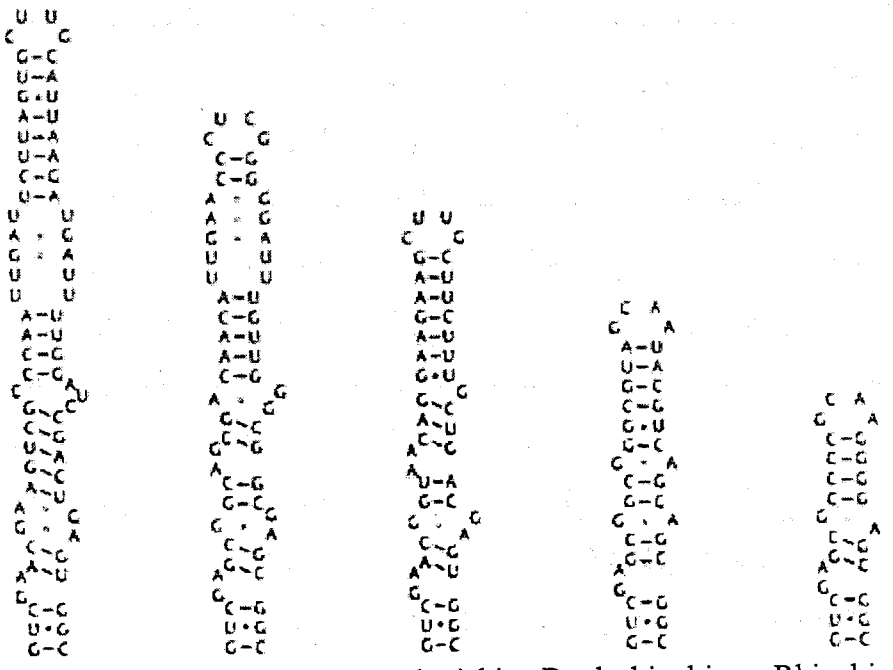
يمكن مقارنة التشابه بين الجينوم فى الميكروبات المختلفة سواء من البكتيريا والفطريات بشكل مباشر تماماً باستعمال طريقة تزاوج الحامض النووى ، وتقيس هذه الطريقة التشابه فى درجة التتابع التى تترتب بها أحجار البناء الجزيئية (القواعد) فى حمض د ن أ ، فعند تحضين خيط مفرد من حمض د ن أ مع خيط مفرد ثانى من نوع آخر من البكتيريا (متشابهان فى نسبة الجوانين + السيتوزين) تحت ظروف معملية تسمح بالتزاوج ، تتكون روابط فى أماكن التتابع المتشابهة بين خيط الحامض النووى من البكتيريا الأولى مع خيط الحمض من الثانية بما يعنى وجود قرابة وثيقة بين هذه البكتيريات حتى مستوى النوع .

٣- تتابع الحمض النووى Nucleic acid sequencing :

تستخدم الأحماض النووية الريبوسومية rRNAs من تحت الوحدات الريبوسومية الصغيرة small ribosomal subunits (16S rRNAs) من البروكاريوتات فى دراسة التصنيف على مستوى الجنس ، وتعتبر تحت الوحدات الصغيرة للأحماض النووية الريبوسومية مثالية لدراسة التطور الميكروبى والعلاقات الميكروبية لأنها تلعب نفس الدور فى كل الميكروبات ، بالإضافة لأن الريبوسوم ضرورى بشكل مطلق لبقاء الميكروبات حية ، كما أن تحت الوحدات الصغيرة هذه جزء ريبوسومى ولايمكن للجينات المنظمة لتحت الوحدات الصغيرة مقاومة التطفر على مستوى واسع ، ومن ثم فهى تتغير ببطء شديد مع الوقت ، كما أنها لا تخضع للنقل الجينى الأفقى ، وهو عامل هام فى مقارنة التتابعات من القبائل الميكروبية المختلفة ، ويظهر استخدام تحت

الوحدات الصغيرة تتابعات معينة مختلفة بين الكائنات ومناطق ثابتة تماماً ، وتمكن المناطق المتباينة من المقارنة بين الميكروبات وثيقة القرابة فى حين تسمح التتابعات الثابتة بمقارنة الميكروبات التى ليس بينها قرابة (شكل ٣-١) .

ويستخدم تفاعل البوليمريز المتسلسل PCR وتقنيات التتابع الأتوماتيكية للحمض النووى فى هذا الصدد . وقد أوضح التحليل المقارن لتتابعات تحت الوحدات الريبوسومية S rRNA١٦ وجود تتابعات مميزة من النيوكلوتيدات الأحادية ، وهذه التتابعات المميزة الموجودة فى البكتيريا لا توجد إطلاقاً فى الأركيا ، وباستخدام أجهزة الحاسب يمكن المقارنة بين أى عدد من الميكروبات ، وتمثل القرابة بمعامل association coefficient ، وقيم الـ S_{ab} value الأعلى يكون بينها قرابة ، وتماثل القيمة يعنى أن قيمة المعامل ١ ، ويحسب الكمبيوتر قرابة الميكروبات وعلاقتها .



Lactobacillus sanfranciscensis | Vibrio furnissii | Escherichia coli | Bradyrhizobium Japonicum | Rhizobium meliloti

شكل ٣-١ . تركيب تتابعات حمض ر ن أ الريبوسومى .

٤- البصمة الجينومية Genomic fingerprinting :

تستخدم طرق البصمة الجينومية فى تصنيف الميكروبات ودراسة العلاقات التطورية ، ولا تضمن طرق البصمة الجينومية دراسة تتابع النيوكلوتيدات فيما عدا أنها توظف إنزيم القطع اندونيوكليز endonuclease لإدراك تتابعات نيوكلوتيدة متخصصة ، وتعتبر أجزاء حمض د ن أ الناتجة عن فعل هذا الإنزيم والمسماة أجزاء القطع بمثابة نموذج تمثيل مباشر لتتابع النيوكلوتيدة ، ومقارنة الأجزاء المقطوعة بين الأنواع والسلالات هى أساس تحليل restriction fragment length polymorphism (RFLP) .

٥- تتابع الأحماض الأمينية Amino acid sequencing :

تعكس تتابعات الأحماض الأمينية للبروتينات بشكل مباشر تتابعات الحمض النووى mRNA ، ولذلك تمثل الجينات المنظمة لتخليقها ، وفى الغالب تتغير التتابعات فى البروتينات التى لا تتشابه فى وظائفها بمعدلات مختلفة ، وتتغير بعض التتابعات بسرعة كبيرة بينما يظل البعض ثابت ، ,إذا كانت تتابعات البروتينات التى لها نفس الوظائف متشابه فإن الميكروبات التى تمتلكها تكون ذات قرابة وثيقة ، وتستخدم تتابعات السيتوكرومات وبروتينات نقل الإلكترون الأخرى ، والهستون ، وبروتينات الصدمة الحرارية ، وبروتينات النسخ والترجمة ، وبروتينات الإنزيمات فى تصنيف الميكروبات ، ولا تلاءم كل البروتينات دراسة التتابعات ، على الرغم من أن مقارنة البروتينات الملائمة تعتبر أفضل من مقارنة حمض ر ن أ الريبوسومى rRNA لما يلى : ١. كمية المعلومات المتحصل عليها لكل موقع من دراسة التتابع لعشرين حمض أمينى أكثر من مثيلتها من دراسة التتابع لأربعة نيوكلوتيدات . ٢. تتأثر تتابعات البروتينات بدرجة أقل بالاختلافات الخاصة بالكائن فى محتوى الجوانين + السيتوزين عن تتابعات حمض ر ن أ أو د ن أ . ٣. دراسة تتابع البروتين أسهل لأنه لا يعتمد على الترتيب الثانوى كما فى حالة تتابع حمض ر ن أ الريبوسومى rRNA .

وهناك طرق كثيرة لمقارنة البروتينات بعضها مباشر مثل تقدير تتابعات الأحماض الأمينية التى تتكون منها البروتينات والتى لها نفس الوظيفة ، وبعض هذه الطرق غير مباشر مثل حركة الهجرة الكهربائية للبروتينات وذلك على مستوى الأنواع وتحت الأنواع ، والأجسام المضادة المميزة بين البروتينات المتشابهة جداً وتستخدم الطرق المناعية لمقارنة البروتينات من الميكروبات المختلفة .

وهكذا تستخدم التحليلات الجزيئية بما فيها تشخيص البروتين فى تعريف الميكروبات (شكل ٣-٢) .

العائلة	الجنس	النوع	تحت النوع	السلالة

شكل ٣-٢ . الأهمية النسبية للطرق الجزيئية المختلفة فى التقسيم

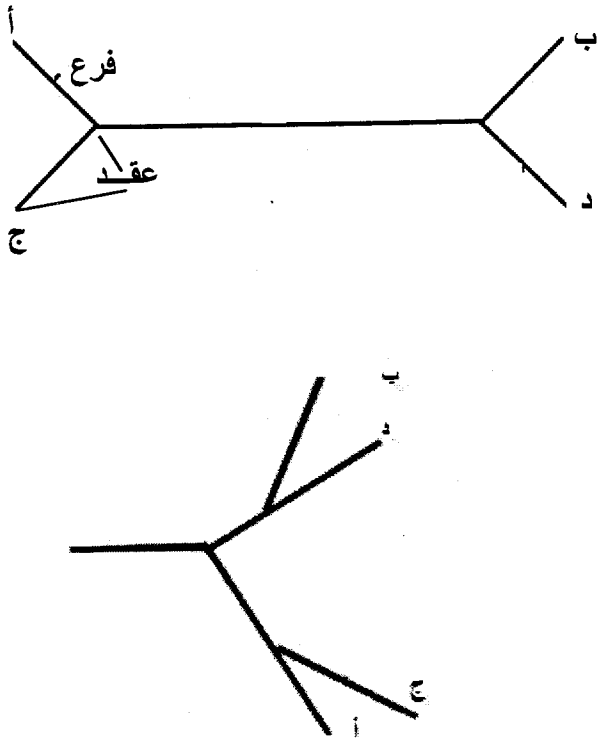
٦- الساعات الجزيئية Molecular chronometers :

تتغير تتابعات الأحماض النووية مثل حمض ر ن أ الريبوسومى rRNA والبروتينات المحفوظة مثل ubiquitin مع الوقت ، ولذلك تعتبر بمثابة ساعات جزيئية، وهذه الساعات هامة فى توظيف التتابعات الجزيئية فى تقدير العلاقات التطورية ، والأساس افتراض أنه توجد ساعة تطورية ، وطبقاً لهذه الفكرة تتغير تتابعات الكثير من الأحماض النووية الريبوسومية rRNAs والبروتينات تدريجياً مع الوقت دون هدم أو تغيير وظائفها ، وتحدث هذه التغيرات بشكل عشوائى وتزيد مع الوقت ، ويعتبر التحليل التطورى باستعمال الساعات الجزيئية عملية معقدة ومازالت تمر بجدل لأن معدل تغير التتابع يمكن أن يختلف .

٧- أشجار النسب Phylogenetic trees :

يتم توضيح العلاقات التطورية بين الكائنات الحية على شكل دياجرامات أو أشجار متفرعة ، والشجرة التطورية هى مجرد رسم يتألف من فروع تصل عقد ببعضها ، وتمثل هذه العقد الوحدات التقسيمية كالنوع أو الجنس ، وتمثل العقد الخارجية فى نهاية الفروع الكائنات الحية الموجودة ، وتمثل أطوال الفروع عدد التغيرات الجزيئية التى حدثت بين العقدتين .

وهناك طرازين من الأشجار التطورية ، فقد لا يكون أو يكون للشجرة جذور ، وببساطة تمثل الأشجار التى ليس لها جذور العلاقات التطورية لكن لاتزود بالطريق التطورى ، وفى الشجرة التى ليس لها جذور يلاحظ أن أ أكثر قرابة إلى ج عن ب أو د ، إلا أن الشكل لايخصص السلف الشائع للأربعة أنوع أو اتجاه التغير ، وعلى النقيض ففى الشجرة التى لها جذور توجد عقدة تبين السلف الشائع وتوضح تطور الأنواع الأربعة من هذا الجذر (شكل ٣-٣) ، ومن الصعب أن نطور شجرة لها جذور .



شكل ٣-٣ . أشجار النسب

وتنشأ الأشجار التطورية من خلال مقارنة تتابعات النيوكلوتيدات أو الأحماض الأمينية ، ولمقارنة نيوكلوتيدتين يجب أولاً معرفة التتابع فيهما ومقارنه الأجزاء المتشابهة ، ويعنى التشابه بينها أن لهما منشأ شائع فى الماضى ، وهذه ليست مهمة سهلة ، وتستخدم فيها الحاسبات والرياضيات لمقارنة التتابعات .

وبمجرد معرفة مواضع الاختلاف فى التتابعات ، يحسب الاختلاف بين التتابعات ، ويعبر عنه بما يعرف بالمسافة التطورية evolutionary distance ، وهى دلالة كمية لعدد مواضع الاختلاف بين الجزيئات التى تم دراسة التتابع فيها ، وتجمع الكائنات الأكثر تشابهاً معاً وتقارن مع الكائنات الأخرى . ويمكن تقدير العلاقات

التطورية باستخدام طريقةparsimony analysis وهو يحدد العلاقات بتقدير أقل عدد من التغير فى التتابع .

تحليل المجتمعات الميكروبية فى الأوساط الطبيعية :

يستفاد من دراسة تتابع S rRNA١٦ فى تصنيف البروكاريوتات ومعرفة العلاقات التطورية ، وقد نتج عن القبول العام لمثل هذا المعلم الجزيئى (S rRNA١٦) تحديد عدد ضخم جداً من تتابعات S rRNA١٦ فى البروكاريوتات ، ويتوفر الآن الآلاف من قواعد البيانات الخاصة بهذه التتابعات ، ومن ثم فإن تكبير وفحص تتابعات S rRNA١٦ فى ميكروب مجهول يجعل من الممكن معرفة علاقته التطورية بتتابعات S rRNA١٦ للأجناس المعروفة من البروكاريوتات .

وتسمح معلومات التتابع المقارنة للجينات المنظمة للبروتين باستخدام معلمات جزيئية أخرى غير S rRNA١٦ للاستكشاف فى الطرق المكملة فى التقسيم والتطور والتنوع الوظيفى فى البروكاريوتات وقد فتح الباب على مصراعيه لعمليات التحليل فى الموقع In situ للمجتمعات الميكروبية فى الأوساط الطبيعية .

الطرق القائمة على تتابع الحامض النووى فى الميكروبيولوجيا البيئية :

نظراً لدخول علم الميكروبيولوجى العصر الجزيئى ، واستكمال دراسة تتابع الجينوم لعدد كبير جداً من الميكروبات ، تستخدم حالياً الطرق القائمة على تتابع الحامض النووى فى تعريف وتصنيف الميكروبات ، وتمد هذه الطرق بمعلومات عن التنوع الميكروبى ، والمحتوى الجينى ، والوفرة النسبية للميكروبات فى العينات البيئية، وهناك ثلاثة طرق لدراسة المجتمعات الميكروبية الطبيعية :

١- مجسات الحامض النووى Nucleic acid probes :

تسمح هذه الطريقة بالكشف السريع وعد خلايا البكتيريا والأركيا فى المجتمعات المختلطة التى تحتوى على تتابع حمض نووى معين ، وعادة يستخدم حمض ر ن أ لهذا الغرض .

٢- تفاعل البوليمريز المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) :

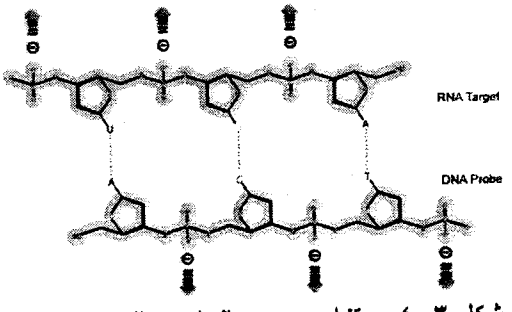
تسمح هذه الطريقة بالتكبير الاختيارى بشكل كلى لتتابع من مخلوط معقد من الأحماض النووية .

٣- تتبع بندقية الجينوم الكامل whole genome shotgun sequencing :

تمد طريقة تتبع بندقية الجينوم الكامل وذلك للحامض النووى د ن أ لمجتمعات ميكروبية بإشارات فريدة فى كل من تعقد المجتمعات الميكروبية الطبيعية والوظائف الخاصة ببعض الكائنات الموجودة .

مجسات الحامض النووى DNA probes :

هى طريقة من طرق التعريف السريعة للكائنات الحية الدقيقة تستخدم بكثرة فى تطبيقات الميكروبيولوجيا البيئية ، ويمكن وصف مجسات الحامض النووى بأنها قطع من خيوط مفردة من الحامض النووى ، لديها القدرة على الارتباط بشكل متخصص مع نظائرها مكملة تتابعات الحامض النووى ، وتسهل المجسات الكشف عن جزيئاتها المستهدفة بناءً على تركيبها الأساسى ، ويتم هذا فى كثير من الحالات بتعليم الجزء القابل للكشف للجزيئات المستهدفة (شكل ٣-٤) .



شكل ٣-٤ . تزاوج مجس الحامض النووى بجزئ

تفاعل البوليمريز المتسلسل :

عندما لا يمكن زراعة ونمو كائن حى دقيق بالطرق التقليدية فإنه يصعب التعرف على الميكروب المسبب للمرض ، ويمكن باستخدام تكنيك تفاعل البوليمريز المتسلسل زيادة كمية الحامض النووى د ن أ الميكروبى إلى المستوى الذى يمكن معه

اختباره بواسطة تكنيك الهجرة الكهربائية gel electrophoresis ، فإذا تم استخدام بريمر لكائن حى دقيق معين فيدل وجود حامض د ن أ الذى تم زيادته على أن الكائن الحى الدقيق موجود .

وفى عام ١٩٩٢ استخدم تكنيك تفاعل البوليميريز المتسلسل فى الكشف عن الميكروب المسبب لمرض Whipple's disease وهو ميكروب لم يكن قد عرف بعد (يعرف الآن باسم تروفيريما ويبليای Tropheryma whippelii) ، وقد وصف جورج ويبل هذا المرض لأول مرة فى عام ١٩٠٧ على أنه مرض يسبب متاعب للجهازين الهضمى والعصبى بواسطة ميكروب عصوى استعصى على الجميع زراعته بقصد تعريفه حتى أمكن بواسطة اختبار تفاعل البوليميريز المتسلسل توفير طرق ذات مصداقية لتشخيص وعلاج هذا المرض .

وقد استخدم تكنيك تفاعل البوليميريز المتسلسل فى السنوات الأخيرة فى تحديد العلاقة بين البكتيريا القديمة والتى ترجع إلى ملايين السنين والبكتيريا الحديثة .

وقد أمكن كذلك تعريف فيروس Hantavirus كمسبب لتفشى حمى hemorrhagic fever بأمريكا بواسطة تكنيك تفاعل البوليميريز المتسلسل وذلك فى أقل من أسبوعين .

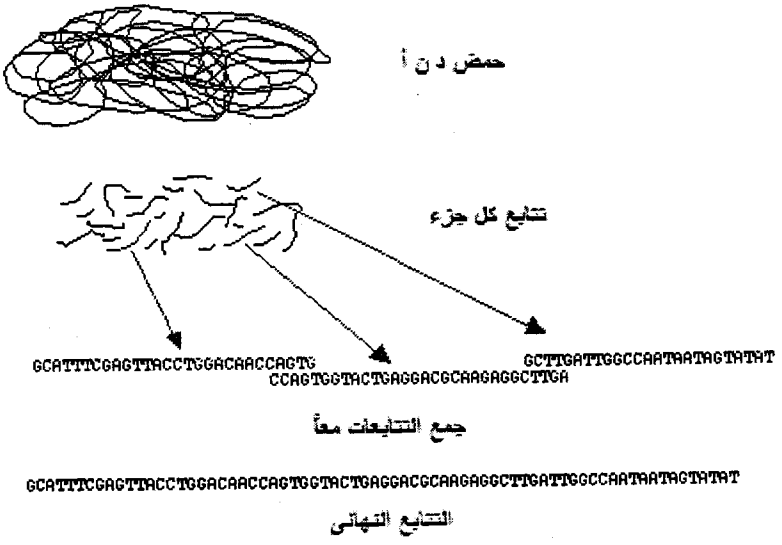
وتستخدم الطريقة التجارية المعروفة باسم تاك مان TaqMan اختبار تفاعل البوليميريز المتسلسل فى تعريف بكتيريا القولون إيشريشيا كولای E. coli الممرضة فى الغذاء والماء ، وفى هذه الطريقة يعطى الحامض النووى د ن أ لبكتيريا ايشريشيا كولای الذى تم زيادته ضوءً فلورسنتياً ويمكن الكشف عنه بطريقة الهجرة الكهربائية على الجل .

تتبع بندقية الجينوم الكامل :

هى إحدى إستراتيجيات دراسة التتابع فى الجينوم الكامل ، ويمثل استخدام تكنيك تتبع بندقية الجينوم الكاملة فى حالة المجموعات الميكروبية تطور كبير فى مجال تقنيات الجينوم الحديثة Metagenomics ، وتستخدم هذه التقنية فى تعريف الميكروبات

بواسطة أدوات التحليل الجينى الحديث بشكل مباشر فى بيئاتها الطبيعية دون حاجة إلى العزل والزراعة فى المعمل للأنواع الميكروبية ، وتتميز تقنية تتبع بندقية الجينوم الكامل بالسرعة إذ يمكن إنجاز العمل فى خلال شهور إلى سنة .

وفى هذه الطريقة يتم تقطيع الحامض النووى د ن أ إلى قطع صغيرة ، ويتم دراسة التتابع بشكل كامل ، ويتم تنظيم هذه الأجزاء إلى contigs بناءً على تداخل السلاسل (شكل ٣-٥) .



شكل ٣-٥ . إستراتيجية دراسة التتابع فى الجينوم الكامل من تتبع بندقية الجينوم الكامل

المراجع :

Baquero F.I.; M.C. Negri; M.I. Morosini; J. Blázquez (1998). Selection of very small differences in bacterial evolution. Int. Microbiol.;1 (4), 295-300.

Chaer, G.M., M.F. Fernandes, D.D. Myrold, P.J. Bottomley (2009). Shifts in Microbial Community Composition and Physiological Profiles across a Gradient of Induced Soil Degradation. Soil Sci. 73, 1327-1334.

Ciccarelli, F.D. (2006). Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. (Pubmed). Science 311(5765), 1283–1287.

Ciccarelli, F.D., T. Doerks, C. von Mering, C.J. Creevey, B. Snel, P. Bork (2006). Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life. Science, 311 (5765), 1283–1287.

Dworkin, M., S. Falkow., E. Rosenberg., K.H. Schleifer, E. Stackebrandt (Eds.), (2006). The Prokaryotes: Vols. 1-7 (Set) (v. 1-7), Springer, Berlin.

Felsenstein, J. (2004). Inferring Phylogenies Sinauer Associates: Sunderland, MA.

Gupta, R.S. (2009). Protein signatures (molecular synapomorphies) that are distinctive characteristics of the major cyanobacterial clades. Int J Syst Evol Microbiol 59, 2510-2526

Hanno, S., M. Mann (2004). The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 5, 699-711.

Isenbarger, T.A., M. Finney, C. Ríos-Velázquez, J. Handelsman, G. Ruvkun (2008). Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. Appl. Environ. Microbiol. 74, 840–849.

Krzywinski, M., J. Schein, I. Birol, J. Connors, R. Gascoyne, D. Horsman, S.J. Jones and M.A. Marra (2009). Circos: An information aesthetic for comparative genomics. Genome Res. 19, 1639-1645

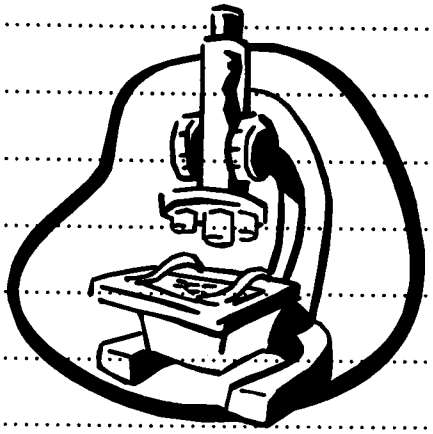
Kumar, S. (2005). Molecular clocks: four decades of evolution. Nat Rev Genet 6(8), 654-662.

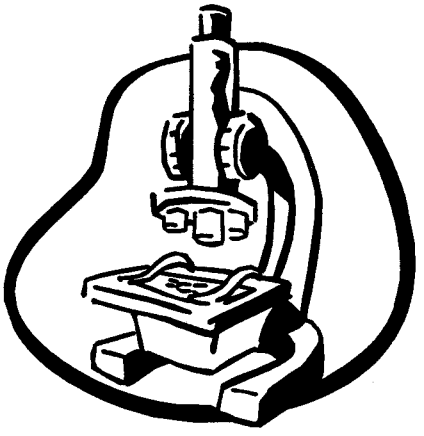
Pavlov, A.R., N.V. Pavlova, S.A. Kozyavkin, A.I. Slesarev (2006). Thermostable DNA Polymerases for a Wide Spectrum of Applications: Comparison of a Robust Hybrid TopoTaq to other enzymes. in Kieleczawa J. DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup. Jones and Bartlett. pp. 241–257.

Roberts, K., M. Raff, B. Alberts, P. Walter, J. Lewis, A. Johnson (2002). Molecular Biology of the Cell 4th Edition, Routledge, 1616 pages.

Schwartz, J.H., B. Maresca (2006). Do Molecular Clocks Run at All? A Critique of Molecular Systematics. Biological Theory 1, 357–371.

Woese C, O. Kandler, M. Wheelis (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc Natl Acad Sci USA 87 (12), 4576–4579.





الفصل الرابع

التنوع التقسيمى للبكتيريا المفيدة

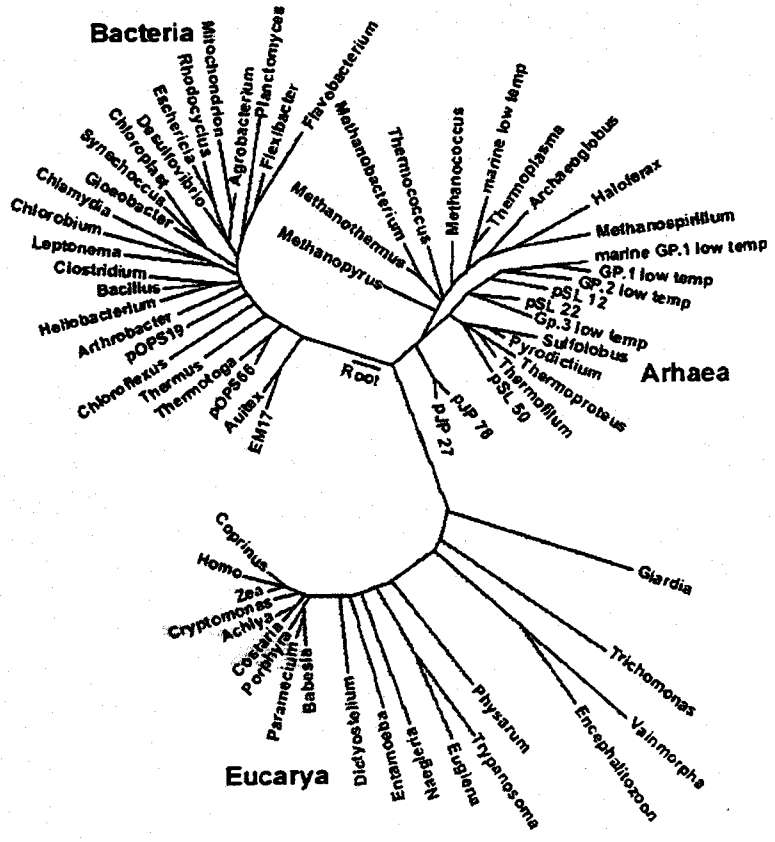
■ التنوع الميكروبى وتطبيقاته ■

تضم شجرة التطور ثلاثة مجموعات domains للحياة هى البكتيريا Bacteria والأركيا Archaea والأيوكاريا Eucarya (شكل ٤-١) ، ويعتمد حالياً على الحامض النووى ر ن أ RNA بشكل أساسى فى عملية تصنيف الكائنات .

ونظراً للتنوع الميكروبى يتم وضع الكائنات الحية المتشابهة معاً فى مجموعات، وتفيد الصفات المظهرية والفسيولوجية والأيضية والبيئية والوراثية والجزيئية فى عملية التصنيف ؛ لأنها تعكس تشكيل ونشاط الجينوم genome ، وتعتبر تتابعات الأحماض النووية أفضل أدلة للتطور الميكروبى والقرابة بين الميكروبات لأن الأحماض النووية إما أن تكون هى المادة الوراثية ذاتها أو نواتج النسخ الجينى ، وتلعب تحت وحدات الحامض النووى ر ن أ الريبوسومى rRNA والجينات المنظمة لها دوراً مفيداً فى تحديد التطور الميكروبى .

ويجب أن نضع فى الاعتبار أن تصنيف البكتيريا يتغير بسرعة بسبب توفر المعلومات الجديدة وبصفة خاصة نتيجة استخدام الطرق الجزيئية مثل مقارنة تركيب الحامض النووى ر ن أ الريبوسومى والتتابعات الكروموسومية .

وتظهر البكتيريا كمجموعة domain تنوع أيضى كبير ، أما الأركيا فى المقابل فمع أنها تأقلمت بشكل كبير على الأوساط البيئية شديدة التميز والمتطرفة ، وتحصل على احتياجاتها من الطاقة بطرق غير معتادة ، إلا أنها أقل تنوعاً من الوجهة التقسيمية بالنسبة لأيضها ، وتضم البكتيريا أفراد تحلل عدد من المركبات غير المعتادة ، وتثبت نيتروجين الهواء الجوى ، وتحصل على الطاقة من أكسدة المركبات غير العضوية المحتوية على النيتروجين ، وتنتج عدد من المركبات العضوية المفيدة كنواتج نهائية لعملية التخمير . . . إلخ .



شكل ٤-١ . شجرة التطور العامة

وهكذا تستخدم البروكاريوتات بكثرة فى تطبيقات التكنولوجيا الحيوية، ومعظم البروكاريوتات المستخدمة فى التطبيقات البيوتكنولوجية عبارة عن بكتيريا ، وفيما يلى نستعرض بعض مجموعات البكتيريا الهامة فى مجال التكنولوجيا الحيوية ، وسوف يقتصر العرض على البكتيريا المألوفة للكثيرين منا .

الأركيا والبكتيريا شديدة التفرع والبكتيريا الضوئية

The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria

أولاً : مجموعة الأركيا Domain Archaea :

توجد الأركيا – أو البكتيريا العتيقة كما يطلق عليها أحياناً – فى أوساط بيئية مختلفة تتميز بملوحتها الشديدة ، أو طبيعتها الحامضية ، أو درجة حرارتها العالية ، أو بغياب الأكسجين عنها .

وتمتلك الأركيا خصائص وراثية وأيضية تمكنها من التأقلم للظروف غير المعتادة والمتطرفة بأوساط نموها ، ومن المتوقع أن الأركيا ستمثل مصدر مستقبلى فريد للاستخدام فى مجال التكنولوجيا الحيوية فى السنوات القليلة القادمة ، فأنواع جنس سلفولوبس Sulfolobus – وهى من الأنواع المحبة للحرارة الشديدة – من الأدوات الحيوية الواعدة للاستخدام فى عملية استخلاص المعادن (التعدين الحيوى biomining) وغيره من تقنيات التكنولوجيا الحيوية بسبب بروتيناته الثابتة للحرارة ، إذ بمقدور السلفولوبس النمو فى الينابيع البركانية عند تركيز أس هيدروجينى pH من ٢–٣ على درجة حرارة ٧٥–٨٠°م .

وتتميز الأركيا بصفات أساسية مختلفة عن البكتيريا على النحو التالى :

- لا يحتوى ببتيدوجليكان جدرها الخلوية على حمض الميوراميك ، ولا على أحماض ثنائية الأمين ، ويفسر عدم احتواء جدرها الخلوية على الهيكل الببتيدوجلوكانى عدم تأثرها بالمضادات الحيوية المؤثرة على البكتيريا كالبنسيلين مثلاً .
- لا تحتوى دهون الغشاء السيتوبلازمى للأركيا على أحماض دهنية طويلة السلسلة ترتبط بالجليسرول بروابط استر ester ، فى حين تحتوى على كحولات متفرعة طويلة السلسلة phytnols ترتبط بالجليسرول بروابط إثير ether .
- وفى الوقت الذى يكون فيه المثيونين أول حامض أمينى لتخليق سلسلة جديدة عديدة

الببتيدات بخلية الأركيا ، نجد فى المقابل أن الفورمايل مثيونين N-formymethionine هو أول حامض أمينى فى تخليق البروتينات بخلية البكتيريا .

- يثبط توكسين الدفتريا عملية الترجمة إلى سلسلة عديدة الببتيدات (تخليق البروتين بخلية الأركيا) من خلال تأثيره على الإنزيمات التى تحفز تفاعلات استطالة السلسلة الببتدية ، كما لا يؤثر المضاد الحيوى الكلورامفنيكول على عملية الترجمة هذه ، أما فى البكتيريا فنجد أن توكسين الدفتريا لا يؤثر على عملية تخليق البروتين التى يثبطها الكلورامفنيكول نتيجة اتحاده مع ٥٠ S, RNA .
- يوجد المرافق الإنزيمى F 430 وهو مرافق يحتوى على النيكل فى الأركيا ، فى حين يغيب فى البكتيريا .
- فى البكتيريا المنتجة لغاز الميثان يتم تثبيت ثانى أكسيد الكربون أوتوتروفياً عن طريق مسار اسيتيل كو أ Acetyl CoA ، بينما فى البكتيريا عن طريق دورة الرايبولوز ثنائى الفوسفات Ribulose diphosphate .

وفى الوقت الحالى تضم الأركيا خمسة مجموعات هى :

أ- الأركيا المنتجة للميثان methanogens

ب- الأركيا المحبة للملوحة الشديدة halophiles

ج- الأركيا المحبة للحرارة الشديدة the extreme thermophiles

د- الأركيا التى تفتقر للجدار الخلوى Cell wall-less archaea

هـ - الأركيا المختزلة للكبريتات Archaeal sulfate reducers

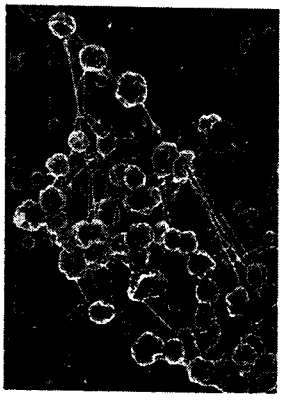
أقسام مجموعة الأركيا :

أ- الأركيا المنتجة للميثان Methanogens :

تعيش الأركيا المنتجة لغاز الميثان فقط فى الأوساط المختلفة الخالية من الأكسجين الغنية بالمواد العضوية كالبرك والمستنقعات وأحواض معالجة مياه المجارى وفى القناة الهضمية للإنسان وكرش الحيوانات المجترة ، ونظراً للطبيعة النشطة لبكتيريا الميثان بكرش المجترات يمكن لبقرة واحدة أن تطلق

من ٢٠٠ – ٤٠٠ لتر ميثان فى اليوم الواحد .

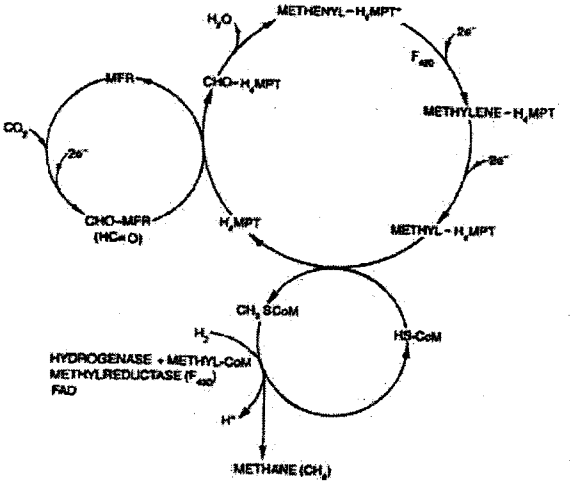
ويعتبر قسم الأركيا المنتج لغاز الميثان الأكبر بين مجموعة الأركيا حيث يضم عدد كبير من الأفراد (شكل ٤-٢) تمثلها أجناس ميثانوبكتيريم Methanobacterium وميثـــــانوكوكس Methanococcus وميثـــــانوميكروبيم Methanomicrobium وميثانوسارسينا Methanosarcina .



شكل ٤-٢ . بكتيريا منتجة للميثان .

وتحصل الأركيا المنتجة للميثان على الطاقة التى تلزمها من أكسدة مركبات معينة مثل الهيدروجين وحمض الفورميك وحمض الخليك ، وتولد غاز الميثان عن طريق استخدام الإلكترونات الناتجة فى اختزال ثانى أكسيد الكربون ، وقد تختزل الكبريت إلى كبريتيد الهيدروجين دون إنتاج طاقة .

وتحتوى خلاياها على المرافق الإنزيمى M الذى يدخل فى تفاعلات انتقال مجموعة الميثايل ، كما تحتوى على العامل ٤٢٠ والعامل ٤٣٠ الذان يدخلا فى النظام اللاهوائى الناقل للإلكترونات بخلية الأركيا المنتجة للميثان ، وكذلك تحتوى على الميثانوبترين methanopterin (شكل ٤-٣) .



شكل ٤-٣ . مسار تخليق الميثان من ثانى أكسيد الكربون

وللأركيا المنتجة للميثان أهمية بيئية إذ تولد هذا الغاز الحيوى بشكل تطبيقى فى وحدات تعد خصيصاً لإنتاجه حيث تخمر المخلفات العضوية تحت الظروف اللاهوائية، وينتج عن كل كيلو جرام من المادة العضوية ٦٠٠ لتر ميثان ، والميثان وقود احتراق نظيف ومصدر طاقة ممتاز ، ويستخدم الغاز الحيوى كبديل جيد للطاقة فى كثير من الأغراض مثل التدفئة والطهى والإنارة ، ومن المعتقد أن البحث فى المستقبل سيزيد كثيراً من كفاءة إنتاج الميثان وسيجعل من البكتيريا المنتجة للميثان مصدر هام للطاقة غير الملوثة للبيئة .

ومن ناحية أخرى تعتبر انبعاثات غاز الميثان بمثابة مشكلة بيئية لأن الميثان يمتص الأشعة دون الحمراء ومن ثم يعتبر أحد غازات الصوبة ، وهناك أدلة على زيادة تركيز غاز الميثان فى الغلاف الجوى فى القرنين الماضيين ، وقد يكون للميثان تأثير كبير فى ظاهرة الدفء العالمى .

وقد أكتشف فى السنوات الأخيرة أن الأركيا المنتجة لغاز الميثان يمكنها أن تؤكسد الحديد Fe^0 وتستخدمه فى إنتاج الميثان والطاقة ، وهذا يعنى أن نمو الأركيا المنتجة للميثان حول مواسير الحديد فى باطن الأرض قد يساهم بشكل كبير فى تآكل الحديد .

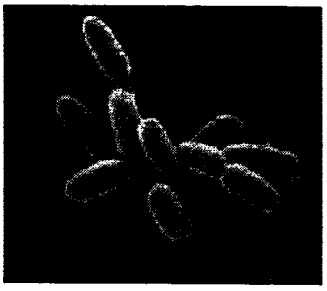
ب- الأركيا المحبة للملوحة الشديدة Halophiles :

تمثل الأركيا المحبة للملوحة الشديدة مجموعة رئيسية أخرى من مجاميع الأركيا، وتوجد فى أوساط طبيعية مثل البحيرات الملحية والبحر الميت والملاحات والمخللات والأسماك المملحة ، وكثيراً ما تسبب فساد وتلون مثل هذه الأغذية .

وتحتاج أفراد هذه المجموعة تركيزات عالية جداً من ملح كلوريد الصوديوم ≤ ٣,٥ مول لكى تظل حية ، وبعضها يعيش فى تركيزات ملح أقل من ٠,٥ مول .

ويعتبر النوع هالوبكتيريم ساليناريم Halobacterium salinarium (شكل ٤-٤) أكثر أفراد هذه المجموعة دراسة بسبب صفاته غير المعتادة حيث ينتج نوع من البروتين يسمى الرودوبسين البكتيرى bacteriorhodopsin يصطاد الطاقة الضوئية بدون وجود الكلوروفيل لاستخدامها كمصدر للطاقة فى أيضه الغذائى .

ومن الهالوبكتيريا أيضاً جنس هالوكوكس Halococcus ، وهو من الأركيا المحبة للملوحة المرتفعة إذ يحتاج تركيز من ملح كلوريد الصوديوم قد يزيد عن ٣٢% لكى ينمو بشكل مثالى .



شكل ٤-٤ . بكتيريا Halobacterium salinarium .

وتكون هذه الأركيا مستعمرات صفراء محمرة اللون على الأوساط الصلبة ، ويرجع هذا اللون لمحتوى الخلايا من الكاروتينات التى تحميها من التأثير الضار لضوء الشمس حيث تقطن هذه الميكروبات عادة أوساط ذات إضاءة شديدة .

وتقاوم الأركيا المحبة للملوحة إجباراً الجفاف فى التركيزات العالية من ملح كلوريد الصوديوم عن طريق حفاظها على توفير تركيز أسموزى عالى من كلوريد البوتاسيوم بالخلية ، ومن المعروف أن ثبات كل من الغشاء السيتوبلازمى

والريبوسومات يتم فقط فى وجود تركيزات مرتفعة من ملح كلوريد البوتاسيوم ، إلى جانب أن النظم الإنزيمية تحتفظ بنشاطها فقط فى مثل هذه التركيزات المرتفعة من الملح .

وتتحلل خلايا البكتيريا المحبة للملوحة إجباراً ، وترشح محتوياتها لوسط النمو حال انخفاض تركيز ملح كلوريد الصوديوم فى وسط النمو عن ١٠% بسبب تفكك الوحدات البروتينية التى يتركب منها الجدار الخلوى .

وهناك إمكانية كبيرة للأركيا المحبة للملوحة للاستخدام فى البيوتكنولوجى ، فهى تعمل على تراكم تركيزات كبيرة من المواد المذابة بخلاياها يمكن استعمالها كمواد واقية للأسموزية ومثبتات للإنزيمات والخلايا ، وتحلل هذه الأركيا البقايا والملوثات الصناعية والمواد الكيميائية السامة ، ويستفاد منها فى عمليات استخلاص الدهون المحسنة ، كذلك يستفاد من إنزيماتها المقاومة للملوحة والمفرزة خارج خلاياها فى بعض العمليات البيوتكنولوجية فى مجال الغذاء والمنظفات الصناعية فى ظروف التركيزات الملحية المرتفعة .

ج- الأركيا الممثلة للكبريت المحبة للحرارة الشديدة the extreme thermophiles :

توجد فى بعض الأوساط مثل الينابيع الحارة والمنافس الحرارية البحرية ذات درجة الحرارة بين ٧٠-١١٠°م وهى الدرجة المثلى لنموها ، وتستخدم الكبريت لأيض الطاقة ، والبعض يعيش فى الأوساط شديدة الحموضة (pH أقل من ٢) . تضم هذه المجموعة عدة أجناس كالديسلفوروكوكس Desulfurococcus والسلفولوبس Sulfolobus .

ولإنزيمات هذه الميكروبات أهمية كبيرة فى البيولوجيا الجزيئية وفى مجال المنظفات الصناعية .

د- الأركيا التى تفتقر للجدار الخلوى Cell wall-less archaea :

تفتقر أفراد هذه المجموعة إلى الجدر الخلوية وهى فى ذلك تشبه الميكوبلازما ، كما أنها ذات أشكال متغيرة ومتعددة مابين الكروى والخيطى بسبب فقد الجدار .

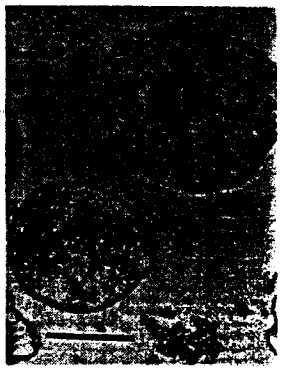
وتكون هذه البكتيريا مستعمرات دقيقة الحجم على البيئات الصلبة ، تشبه هذه المستعمرات فى شكلها البيض المقلى Fried-egg .

ومن أمثلة الأركيا التى تفتقر إلى الجدار الخلوى جنس ثرموبلازما Thermoplasma (شكل ٤-٥) ، ويتم عزل أفراده من من ينابيع المياه الساخنة وركام الفحم المحترق ، وتحتوى كومات الفحم على بيريت الحديد FeS الذى يتأكسد لحمض الكبريتيك بواسطة البكتيريا الكيموليثوتروفية ، ومن ثم تصبح كومات الفحم ساخنة جداً وحامضية ، أو بالأحرى موطن نموذجى للثرموبلازما لأنها تنمو على درجة حرارة مابين ٥٥-٥٩°م وتركيز أس هيدروجينى بين ١-٢ ، ولهذه البكتيريا أصغر حجم جينوم بين أنواع البكتيريا المتطفلة ، وتستخدم إنزيمات أفراد هذه المجموعة فى بعض التطبيقات الصناعية الهامة .

هـ - الأركيا المختزلة للكبريتات Archaeal sulfate reducers :

تنقل الأركيا المختزلة للكبريتات الهيدروجين H_2 إلى الكبريتات SO_4^{2-} التى تعمل كمستقبل نهائى للإلكترونات ومن ثم تختزلها إلى كبريتيد الهيدروجين H_2S ، أو بمعنى آخر تؤكسد هذه الأركيا الهيدروجين H_2 مختزلة الكبريتات SO_4^{2-} ومنتجة كبريتيد الهيدروجين H_2S ، وتحصل على طاقتها من عملية انتقال الإلكترونات بسيتوكروم الخلية (الفسفرة بانتقال الإلكترونات) وذلك تحت الظروف اللاهوائية .

ومن أمثلة الأركيا المختزلة للكبريتات جنس الأركيوجلوبس Archaeoglobus الذى يقطن أعماق البحيرات الملحية وحقول الزيت مسبباً حموضتها .



شكل ٤-٥ . ثرموبلازما .

ثانياً : مجموعة البكتيريا Domain Bacteria :

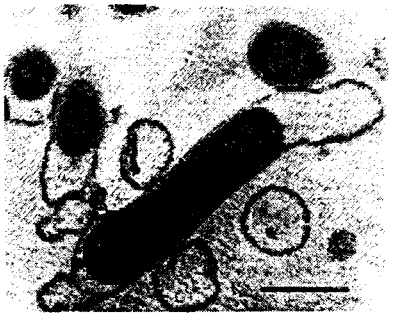
تضم مجموعة البكتيريا مجموعات البروكاريوتات الأخرى من غير الأركيا ، وتشمل هذه المجموعة معظم البروكاريوتات ، ومعظم أنواعها وثيقة الصلة بحياة الإنسان لأنها بالأساس تقطن البيئة التى يعيش فيها الإنسان .

١- الأكويفيكى Aquificae :

تضم هذه القبيلة مجموعة متنوعة من البكتيريا تقطن الأماكن البيئية القاسية ، وهى بكتيريا محبة لدرجات الحرارة المرتفعة ، ومن المعتقد أن قبيلة Aquificae تمثل أقدم فرع فى البكتيريا ، ومن أجناسها أكويفكس Aquifex وهيدروجينوباكتر Hydrogenobacter ، وأفراد هذه الأجناس محبة لدرجات الحرارة المرتفعة إذ تنمو بشكل مثالى على ٨٥°م ودرجة نموها القصوى ٩٥°م، ومعيشتها كيموليثوأوتوتروفية ، ولذلك من المعتقد أن الأسلاف الأولى من البكتيريا كانت محبة لدرجات الحرارة المرتفعة ومعيشتها كيموليثوأوتوتروفية .

٢- الثرموتوجى Thermotogae :

يعتبر جنس ثرموتوجا Thermotoga أشهر أجناس قبيلة ثرموتوجى Thermotogae ، ودرجة حرارة نمو أفراده المثلى ٨٠°م والقصوى ٩٠°م ، ويتميز بغلاف خارجى يشبه التوجا toga يمتد كالبالون من أطراف الخلية التى تنمو فى المناطق الأرضية الحارة كالينابيع الكبريتية (شكل ٤-٦) ، ولأفراد هذا الجنس أهمية من الناحية البيوتكنولوجية .



شكل ٤-٦ . الغلاف السائب يمتد من كل طرف لخلية

٣- الدينوكوكس – الثرمس Deinococcus-Thermus :

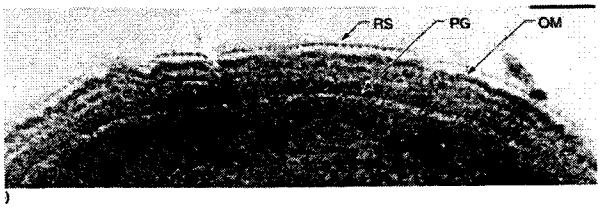
تعتبر شعبة Deinococcus-Thermus (Phylum B4) بمثابة مجموعة صغيرة من البكتيريا الكروية شديدة المقاومة للمخاطر البيئية ، وتقسم إلى رتبتين كل منهما يحتوى على عائلة مفردة ، ويمثل جنس دينوكوكس Deinococcus العائلة الأولى ، بينما يمثل جنس ثرمس Thermus الثانية .

أ- جنس الدينوكوكس Deinococcus :

أفراد الدينوكوكس غير عادية إذ أنها تقاوم بشكل غير عادى الجفاف والإشعاع التأينى ، حيث تظل حية عند تعرضها لأكثر من ٣-٥ مليون راد من الإشعاع (١٠ راد قد تكون مميتة للإنسان) .

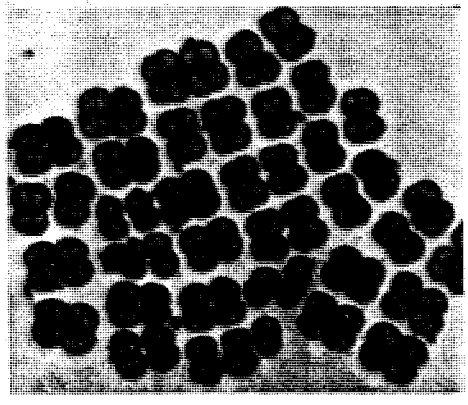
وتنتج مقاومتها الكبيرة للإشعاع من مقدرتها على إصلاح الجينوم – الذى يتكون من كروموسوم حلقى وميجابلازميد وبلازميد صغير – والذى حدث به الضرر مهما كانت درجة الضرر ، وعند تعرض الجينوم لمستويات مرتفعة من أشعة جاما فإنه يتكسر لكثير من الأجزاء يتم جمعها معاً مرة ثانية فى خلال ١٢-٢٤ ساعة بنفس حيويتها قبل التكسر ، ومن المعتقد أن مقدرة الميكروب على تراكم مستويات مرتفعة من المنجنيز Mn (II) تقى الميكروب من المستويات العالية من أنواع الأكسجين السامة المحثة بالإشعاع .

وعلى الرغم من عدم معرفة الموطن الطبيعى لأفراد جنس الدينوكوكس فإنها تعيش فى المياه العذبة والتربة واللحوم المفرومة والتراب الذى يحمله الهواء ، وهى موجبة لصبغ جرام ، وتعيش معيشة كيموهيتروتروفية ، تتلون خلاياه ذات الشكل الكروى أو العصوى بلون أحمر لامع أو قرمزى بسبب محتواها العالى من صبغات الكاروتينات ، وتحاط الخلايا بطبقة من غشاء خارجى outer membrane لا يوجد عادة فى البكتيريا الموجبة لجرام ، وهذا الغشاء الخارجى ذات تركيب كيميائى مميز حيث لا يحتوى على سكريات عديدة دهنية lipopolysaccharides والتى تميز الغشاء الخارجى فى البكتيريا السالبة لصبغ جرام (شكل ٤-٧) .



شكل ٤-٧ . الجدار الخلوى لبكتيريا دينوكوكس راديوديورانس . مظلة البروتين السطحية المنتظمة RS ، وطبقة الببتيدوجليكان PG ، والغشاء الخارجى OM .

ونظراً لمقاومة ميكروب دينوكوكس للإشعاع فإنه يفسد الأغذية المحفوظة بعملية التشعيع ، ويلعب النوع دينوكوكس راديوديورانس D. radiodurans (شكل ٤-٨) دوراً هاماً فى العلاج الميكروبى للأوساط البيئية الملوثة بالإشعاع حيث يتناول هذا الميكروب المخلفات النووية والمواد السامة الأخرى ، ويتميز هذا النوع بمقاومة البرودة والجفاف والتفريغ والحموضة ولذلك يطلق عليه مسمى polyextremophile ، وقد تم تسجيل هذا النوع فى موسوعة جينيز للأرقام العالمية The Guinness Book Of World Records .



شكل ٤-٨ . مستعمرة بكتيريا دينوكوكس راديوديورانس تظهر الكرويات مرتبة فى مربعات .

ب- جنس الثرمس Thermus :

تم وضعه حالياً مع الدينوكوكس فى مجموعة واحدة على أساس التناظر

homology فى تتابع الحامض النووى ر ن أ الريبوسومى ribosomal RNA sequences .

وتعيش أفراد الثرمس فى الينابيع الحارة وفى خزانات المياه الساخنة فى المنازل وغيرها من المبانى ، وهو من أهم أنواع البكتيريا الحقيقية المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة ، ودرجة حرارة النمو المثلى له ٧٠-٧٢°م ويمكنه النمو فى درجات الحرارة الأعلى من ذلك ، وخلايا الثرمس ذات أشكال مختلفة وغير متحركة .

وقد نال النوع ثرمس اكواتيكس Thermus aquaticus (شكل ٤-٩) شهرة كبيرة من كونه مصدر لعدة إنزيمات هى الألدوليز aldolase ، ر.ن.أ بوليمريز RNA polymerase ، وإنزيم Taq I restriction enzyme ، د ن أ بوليمرز DNA polymerase "Taq pol" إلى جانب خمسة إنزيمات أخرى على الأقل مهمة فى مجال البيوتكنولوجيا .

ويلعب إنزيم د.ن.أ دور هام فى تضاعف الجينات بواسطة تفاعل البوليميريز المتسلسل PCR ، وينتج هذا الإنزيم فى الوقت الراهن على مستوى تجارى كبير من بكتيريا القولون ايشريشيا كولاى E. coli بأساليب الهندسة الوراثية .

شكل ٤-٩ . ميكروب Thermus aquaticus .

٤- البكتيريا الممثلة للضوء :

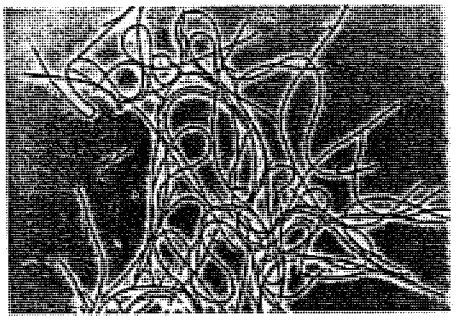
توجد ثلاثة مجموعات من البكتيريا الضوئية السالبة لجرام هى البكتيريا الأرجوانية والبكتيريا الخضراء والسيانوبكتيريا . وتختلف السيانوبكتيريا عن البكتيريا

الضوئية الأرجوانية والخضراء فى أنها تقوم بعملية التمثيل الضوئى تحت الظروف الهوائية وينطلق عن العملية الأكسجين كناتج نهائى oxygenic photosynthesis ، وتستخدم الماء كمعطى للإلكترون ، كما أنها تمتلك كلا النظامين الضوئيين رقم ١ ورقم ٢ .

وعلى النقيض تمتلك البكتيريا الأرجوانية والخضراء نظام ضوئى واحد فقط وتقوم بالتمثيل الضوئى فى غياب الأكسجين anoxygenic photosynthesis ، ونظراً لعدم قدرتها على استخدام الماء كمصدر للإلكترون ، فإنها تستخدم الجزيئات المختزلة مثل كبريتيد الهيدروجين والكبريت والهيدروجين والمادة العضوية كمصدر للإلكترون لاختزال جزيئات $NAD(P)^+$ إلى NAD(P)H ، ومن ثم فإن معظم البكتريا الأرجوانية والخضراء تكون حبيبات كبريت ، تكون بكتيريا الكبريت الأرجوانية حبيبات بداخل خلاياها ، بينما ترسب بكتيريا الكبريت الخضراء حبيبات الكبريت خارج خلاياها ، وتستخدم البكتيريا الأرجوانية غير الكبريتية الجزيئات العضوية كمصدر للإلكترون ، وهناك اختلافات أخرى فى صبغات التمثيل الضوئى وغيرها .

أ- البكتيريا غير الكبريتية الخضراء :

تعتبر الكلوروفلكساى Chloroflexi التى كانت تعرف سلفاً بالبكتيريا غير الكبريتية الخضراء أحد صفوف البكتيريا فى قبيلة Chloroflexi ، وهى تنتج الطاقة من الضوء ، وتأخذ اللون الأخضر ، وأهم أجناسها كلوروفلكسس Chloroflexus ، وهى بكتيريا خيطية ، تتحرك حركة إنزلاقية (شكل ٤-١٠) .



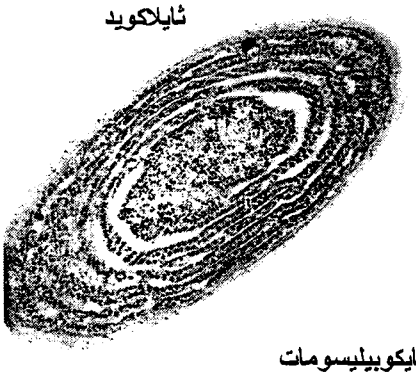
شكل ٤-١٠ . Chloroflexus

ب- السيانوبكتيريا Cyanobacteria :

تعتبر السيانوبكتيريا أو البكتيريا الخضراء المزرقة - التى كانت تعرف سلفاً بالطحالب الخضراء المزرقة - أكبر مجاميع البكتيريا الضوئية وأكثرها تنوعاً وانتشاراً ، ويتراوح محتوى الجوانين والسيتوزين فيها بين ٣٥-٧١% .

والسيانوبكتيريا هى بكتيريا سالبة لصبغ جرام ، إلا أن نظام تمثيلها الضوئى يشبه بشدة مثيله فى الأيوكاريوتات لاحتوائها على كلوروفيل أ والنظامين الضوئيين رقم ١ ورقم ٢ ؛ لذلك ينطلق عن عملية التمثيل الضوئى الأكسجين كناتج نهائى ، وتستخدم السيانوبكتيريا الفايكوبيليبروتينات phycobiliproteins كصبغات مساعدة .

وتوجد صبغات التمثيل الضوئى ومكونات سلسلة نقل الإلكترون فى أغشية الثايلاكويدات (الأكياس المسطحة) thylakoids التى تتصل بالفايكوبيليسومات phycobilisomes (شكل ٤-١١) ، وهذه تحتوى صبغات الفيكوبيلين phycobilin وبصفة خاصة الفايكوسيانين phycocyanin والفايكوإرثرين phycoerythrin التى تنقل الطاقة للنظام الضوئى رقم ٢ ، ويتم تمثل CO_2 خلال دورة كالفين Calvin cycle ، وتوجد الإنزيمات التى تحتاجها هذه العملية فى التركيبات الداخلية المعروفة بالكربوكسيسومات carboxysomes ، والمخزون من الكربوهيدرات يكون على هيئة جليكوجين ، وأحياناً تخزن النيتروجين الزائد على هيئة بوليمرات من حمض الأرجنين أو حمض الأسبارتيك فى حبيبات السيانوفايسين cyanophycin ، أما الفوسفور فيخزن على هيئة حبيبات عديدة الفوسفات ، ولأن السيانوبكتيريا تفتقر لإنزيم ألفا كيتو جلوترات ديهيدروجينيز فإنها لا تستخدم دورة حمض الستريك كلية ، وتلعب دورة الفوسفات بنتوز الدور المحورى فى أيض الكربوهيدرات .



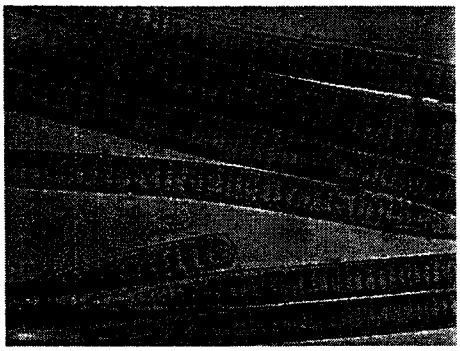
شكل ٤-١١ . نظام ثايلاكويد مكثف فى بكتيريا Synechococcus lividus والفايكوبيليسومات . فايكوبيليسومات

ومع أن الكثير من السيانوبكتيريا تعيش معيشة فيتوليثوتروفية ، فإن القليل منها ينمو فى الظلام ويعيش معيشة كيموهيتروتروفية بأكسدة الجلوكوز وسكريات أخرى .

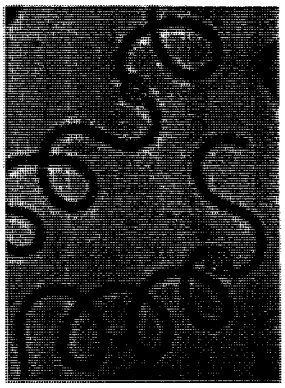
توجد السيانوبكتيريا فى صورة وحيدة الخلية تتجمع فى مستعمرات لها أشكال مختلفة ، أو تكون خيوط تسمى الترايكومات trichome يحتوى على صف من الخلايا (شكل ٤-١٢) ، ولون السيانوبكتيريا أخضر مزرق بسبب الفيكوسيانين ، إلا أن بعضها بالمحيطات المفتوحة يكون أحمر أو بنى فى اللون بسبب صبغة الفيكوارثرين ، وتستخدم السيانوبكتيريا الحركة المنزلقة gliding motility .

وتتكاثر السيانوبكتيريا بالانقسام الثنائى البسيط والمتعدد والتجزؤ والتبرعم ، وينتج عن التجزؤ خيوط متحركة صغيرة تعرف بالهرموجونيا hormogonia ، ويكون بعض الأنواع جراثيم ساكنة سميكة الجدار متخصصة تسمى جراثيم الأكينيت akinetes ، وهى جراثيم مقاومة للجفاف ، وتنبت فيما بعد عند تحسن ظروف الوسط لخيوط جديدة .

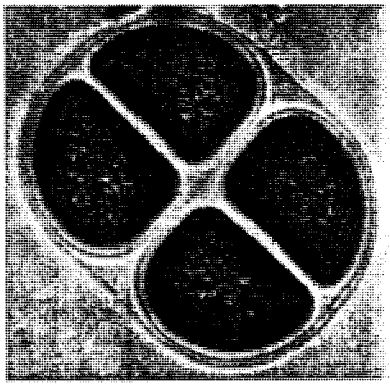
يثبت الكثير من السيانوبكتيريا نيتروجين الهواء الجوى فى خلايا متخصصة تعرف بالهتيروسيست (الحويصلة المغايرة) heterocysts ، يتطور ٥-١٠% من الخلايا إلى هتيروسيستات عندما تحرم السيانوبكتيريا من مصادر نيتروجينها المفضلة من النترات والأمونيا ، للهيتروسيست جدار سميك جداً (شكل ٤-١٣) .



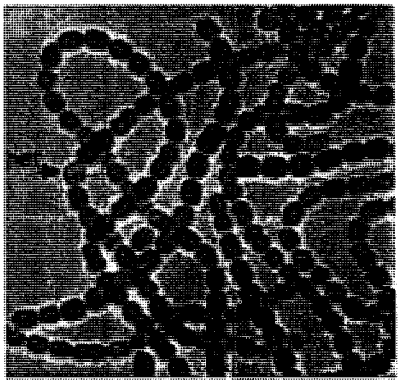
شكل ٤-١٢أ . ترايكومات الأوسيلاتوريا Oscillatoria .



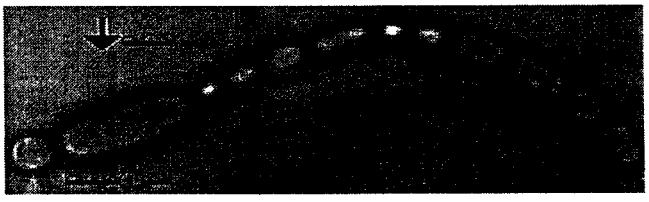
شكل ٤-١٢ب . بكتيريا Anabaena spiroides مغطاة بغلاف جيلاتينى سميك .



شكل ٤-١٢ج . مستعمرة من ٤ خلايا من Chroococcus turgidus .



شكل ٤-١٢د . النوستوك Nostoc ويتضح به الهتيروسيست .



شكل ٤-١٣ . بكتيريا Cylindrospermum ويتضح الهتيروسيست والأكينيت .

وتفتقر خلايا السيانوبكتيريا إلى الأسواط ، وأغلبها وحيدة الخلية غير متحركة، أما الأنواع المتحركة فتتحرك حركة زاحفة على الأسطح الصلبة ، وتشمل الحركة

أيضاً الهرموجونيا وبعض الخلايا القزمية (البايوسايت) Baeocytes .

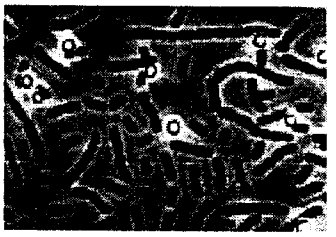
تعيش السيانوبكتيريا فى مياه البحار والمحيطات ، وفى والأنهار والبحيرات العذبة ، وفى ينابيع المياه الساخنة ، وفى التربة الغدقة ، والأوساط البيئية الجافة والملحية ، وفى الصخور .

وقد اهتمت البيوتكنولوجيا بالسيانوبكتيريا فى السنوات الأخيرة فى إنتاج اللقاحات السمادية التجارية مثل البلوجرين blue green لأراضى الأرز ولقاح الأزولا لمزارع الأرز أيضاً ، وكذلك إنتاج البروتين وحيد الخلية single cell protein لغذاء الإنسان وعلف الحيوان ، وإنتاج الصبغات الغذائية . ويتم توظيف السيانوبكتيريا فى التخلص من المعادن الثقيلة كالزئبق والرصاص فى البحيرات ومجارى الأنهار بالمناطق الصناعية . وللسيانوبكتيريا دور هام فى تثبيت النيتروجين الجوى وزيادة خصوبة الأوساط التى تقطنها ، كما أنها توفر المادة العضوية فى هذه الأوساط . وتفرز السيانوبكتيريا كثير من المواد الحيوية التى تعمل كمضادات حيوية تضاد نمو بعض الآفات كالحشائش وبعض مسببات الأمراض بالتربة كالبكتيريا والفطريات والطحالب . وتلعب السيانوبكتيريا الخطوات الأولى فى تحولات الصخور لتربة صالحة لتتابع النمو النباتى عليها . وتفرز السيانوبكتيريا الكثير من المواد المشجعة لنمو النبات مثل منظمات النمو والفيتامينات والهرمونات والأحماض الأمينية ، وتعمل هذه المواد على زيادة العائد من الأراضى الزراعية . وتعتبر السيانوبكتيريا غذاء للأسماك والأحياء المائية الصغيرة فى المياه العذبة والبحرية ، وتطلق السيانوبكتيريا الأكسجين للأسماك وتزيل غاز ثانى أكسيد الكربون CO_2 الضار أثناء عملية البناء الضوئى .

ج- بكتيريا الكبريت الخضراء :

تضم مجموعة صغيرة من الميكروبات اللاهوائية ، تعيش معيشة فوتوليثوتروفية، وتستخدم كبريتيد الهيدروجين والكبريت العنصرى والهيدروجين كمعطيات للإلكترون ، تنتج الكبريت العنصرى بعملية الأكسدة ويترسب خارج الخلية،

وتتنوع فى أشكالها إلى حد كبير ، ومن أهم أجناسها كلوروبيوم Chlorobium كالنوع كلوروبيوم ليميكولا Chlorobium limicola (شكل ٤-١٤) .



شكل ٤-١٤ . Chlorobium limicola
وتتضح حبيبات الكبريت خارج الخلايا .

البروتيوبكتيريا Proteobacteria (Phylum B12)

تضم هذه القبيلة البروتيوبكتيريا وهى سالبة لصبغ جرام ، وهى مجموعة كبيرة ومعقدة إلى درجة كبيرة ، وتحتوى على ٢٠٠٠ نوع كلها ذات قرابة ، وقد اشتق أسمها من آلهة الإغريق بروتيس Proteus التى تغير شكل الأشياء ، ويشير الاسم إلى التنوع الكبير فى أشكال البروتيوبكتيريا ، وتقسم البروتيوبكتيريا إلى خمسة مجموعات تعامل كصفوف classes على أساس بيانات الحامض النووى ر.ن.أ الريبوسومى rRNA ، ويشار لها بالحروف اليونانية ألفا حتى ابيسلون .

وتعتبر البروتيوبكتيريا بذات أهمية كبيرة حيث تضم الكثير من البكتيريا التى تسبب الأمراض المختلفة والتى تثبت النيتروجين الجوى ، وتساهم هذه البكتيريا بدور كبير فى النظم البيئية .

١- الألفا بروتيوبكتيريا α-proteobacteria :

تضم الألفا بروتيوبكتيريا معظم الأفراد التى تنمو فى مستويات غذائية منخفضة oligotrophic forms مثل البكتيريا الممثلة للضوء ، وتمتلك بعض الأفراد خصائص أو أساليب أيضية غير معتادة مثل الأيض الميثيلوتروفى methylotrophy للمركبات المحتوية على ذرة كربون واحدة ، والأيض الكيموليثوتروفى chemolithotrophy ، وتثبيت النيتروجين nitrogen fixation ، ويشمل أحد تحت مجاميعها ثلاثة أجناس هى أجروبكتيريم Agrobacterium ورايزوبيوم Rhizobium ورايكتسيا Rickettsia ،

وهذه الأجناس ذات علاقة وثيقة بعوائل من الأيوكاريوتات ، فأفراد الجنس الأول والثانى تتفاعل مع الخلايا النباتية بينما يتفاعل الرايكتسيا مع الخلايا الحيوانية .

البكتيريا الأرجوانية Purple bacteria :

تعتبر عملية التمثيل الضوئى معقدة إلى حد كبير ، وتنتشر البكتيريا الممثلة للضوء فى كثير من فروع البكتيريا ، وتضم البكتيريا الأرجوانية ليس فقط البكتيريا الممثلة للضوء الأرجوانية ولكن تضم أيضاً كثير من البكتيريا السالبة لجرام غير الممثلة للضوء .

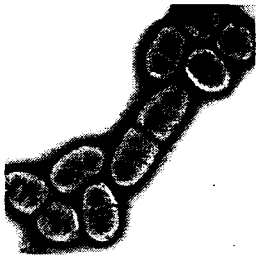
ويعتبر جنس رودوسبيريللمRhodospirillum وجنس آزوسبيريللمAzospirillum من بين أجناس بكتيرية عديدة تكون حوصلات cysts ، وهى طور ساكن يختلف تماماً عن الجراثيم الداخلية التى تكونها بعض أجناس البكتيريا الموجبة لجرام ، وتقاوم الحوصلات الجفاف desiccation إلا أنها أقل مقاومة للضغوط البيئية الأخرى مثل الحرارة والإشعاع فوق البنفسجى ، وتتكون الحوصلات كاستجابة لمحدودية الغذاء فى وسط النمو ، ولها غلاف خارجى سميك وتخزن البولى بيتا هيدروكسى بيوترات ، ويثبت الآزوسبيريللم نيتروجين الهواء الجوى فى منطقة جذور النجيليات كالذرة والقمح وقصب السكر والحشائش تحت ظروف كميات قليلة من الأكسجين ، ويتوفر بالأسواق التجارية لقاح سمادى من الآزوسبيريللم للنيجليات .

جنس جلوكونوباكتر Gluconobacter :

تتميز أفراد جلوكونوباكتر – الذى كان يعرف سلفاً بالأسيتوموناس Acetomonas – بشكلها البيضاوى إلى العصوى (شكل ٤-١٥) ، وحركة معظم السلالات بأسواط قطبية ، والأفراد هوائية إجباراً .

وتعيش الأفراد معيشة كيموهيتروتروفية ، وتحصل على الطاقة من أكسدة الإيثانول لحمض خليك ، إلا أن حمض الخليك لا يتأكسد فيما بعد ، على عكس مسار التحليل التأكسدى فى الكائنات الأخرى والتى عادة تتأكسد فيها المادة بشكل كامل إلى ثانى أكسيد الكربون ، ولذلك يستخدم ميكروب جلوكونوباكتر فى تصنيع الخل ،

ويمكنه أيضاً أن يؤكسد الجلوكوز لحمض جلوكونيك وهو ناتج ذات أهميـــة تجاريـــة كبيرة .



شكل ٤-١٥ . الجلوكونوباكتر

وينتج سكر السوربوز من بكتيريا جلوكونوباكتر Gluconobacter suboxydans (Acetobacter suboxydans) ، وهو منتج ذات أهمية فى صناعة حامض الأسكوربيك (فيتامين ج) .

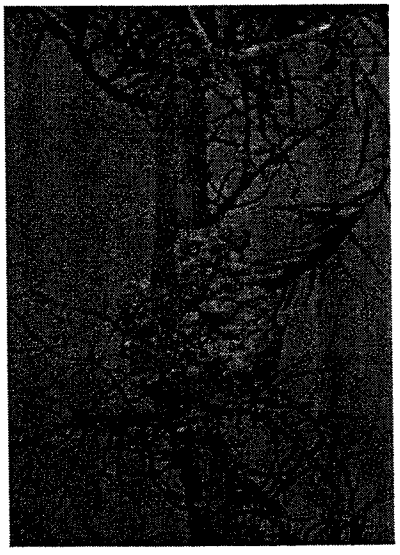
جنس الأجروبكتيريم Agrobacterium :

بكتيريا لها شكل عصوى متحركة وسالبة لصبغ جرام ، هوائية وتعيش معيشة كيموهيتيروتروفية فى التربة .

تحمل هذه البكتيريا كما هو الحال فـــى النـــوع اجروبكتيـــريم تيوميفاســـينس Agrobacterium tumefaciens بلازميد كبير ، يشار له باسم Ti plasmid ، ينظم هذا البلازميد الوظائف المختلفة لنقل بروتين صغير لبلازميد د ن أ يسمى T-DNA فـــى الخلايا النباتية ، حيث يتكامل فى د ن أ بكروموسومات النبات وينبه تخليق هرمـــون النمو النباتى ، ومن ثم يحث نمو التدرنات galls أو الأورام tumors فى النبات والتى تعرف بسرطان النبات plant cancer (مرض التدرن التاجى Crown gall disease) ، (شكل ٤-٢١) ، وتوقف التدرنات سريان العصارة النباتية بين أجزاء النبات ومن ثم موتها .

وتعتبر مقدرة هذه السلالات على نقل الجينات إلى الخلايا النباتية المثال الوحيد المعروف لنقل الجينات بشكل طبيعى بين الكائنات ذات النواة البدائية والكائنـــات ذات النواة الحقيقية ، وهى ظاهرة ذات أهمية هائلة فى التكنولوجيا الحيوية ، لأنهـــا تفـــتح

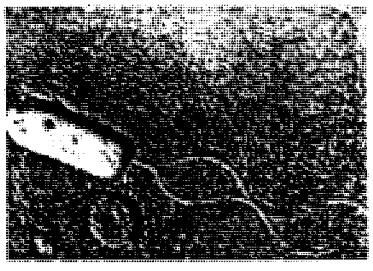
الباب للنقل الثابت للجينات الغريبة إلى نباتات المحاصيل ، ويمكن عن طريق بلازميد Ti ادخال جينات فى حبوب الغلال لتثبت النيتروجين أو إدخال جينات إلـــى النباتـــات لتقاوم الأمراض أو مبيدات الحشائش .



شكل ٤-٢١ . التدرن التاجى على أحد النباتات .

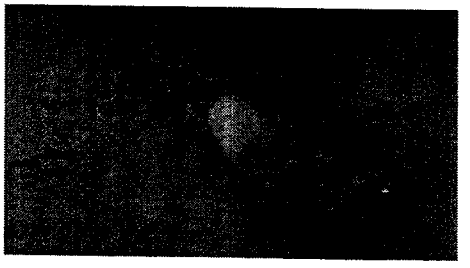
جنس رايزوبيوم Rhizobium :

ترجع المعرفة ببعض أفراد هذا الجنس إلى أكثر من ١٢٠ عام ، وهى بكتيريا لها شكل عصوى عادة ، أو تتعدد أشكالها pleomorphic تحـــت الظـــروف البيئيـــة المغايرة ، متحركة (شكل ٤-١٨) ، وسالبة لصبغ جرام ، تقطن التربـــة الزراعيـــة حيث تعيش معيشة كيموهيتروتروفية تحت الظروف الهوائية ، يثبت نيتروجين الهواء الجوى diazotrophy بعد أن يستقر بداخل عقد على جذور النباتات البقولية .



شكل ٤-١٨ . ريزوبيوم متحرك بسوطين قطبيين .

وغالباً تحتوى خلايا الرايزوبيوم على مركب بولى بيتا هيدروكسى بيوترات poly-β-hydroxybutyrate (شكل ٤-١٩) ، ويتم إنتاج هذا المركب من الميكروبات لاستخدامه فى إنتاج البلاستيك الحيوى (البيوبول Biopol) .



شكل ٤-١٩ . ريزوبيوم يحتوى على بولى بيتا هيدروكسى بيوترات .

وتغزو هذه البكتيريا الشعيرات الجذرية للنباتات البقولية ؛ حيث تكون عقد على جذورها ، يختزل أو يثبت نيتروجين الهواء الجوى بداخلها إلى أمونيوم بواسطة الميكروب فى طور يسمى البكتروبد bacteroids (شكل ٤-٢٠) ، وهو شكل من النيتروجين متاح بشكل مباشر للعائل النباتى ، وطور البكتروبد هو طور بكتيريا الرايزوبيا المحتوى على إنزيم النيتروجينيز ، ويأخذ فيه الميكروب أشكال مختلفة عن شكله الأصلى (أشكال X و Y و T) . وعملية تثبيت النيتروجين الجوى مفيدة تماماً لعائلة النباتات البقولية ، وهى من أنجح العائلات التى تواجدت على سطح كوكب الأرض ، إذ تصل أعدادها لأكثر من ١٨٠٠٠ نوع ، ويعكس نجاحها مقدرتها على إقامة علاقة تكافلية مع البكتيريا التى تكون عقد على جذورها ، وتتخصص أنواع الريزوبيوم تماماً تجاه عوائلها النباتية .

شكل ٤-٢٠ . تجمع الريزوبيا على جذور نبات بقولى ، وطور البكتيرويد بعقد الفول.

وترجع الأهمية العملية للرايزوبيوم من حقيقة إنتاج إجمالى حوالى ٣٠ مليون طن متري من الأسمدة النيتروجينية التخليقية فى العام ، فى مقابل تحويل الكائنات الحية الدقيقة المثبتة لنيتروجين الهواء الجوى لحوالى ٢٠٠ مليون طن متري نيتروجين إلى أمونيا ، والجزء الرئيسى لهذا التثبيت البيولوجى للنيتروجين يتم بواسطة مثبتات النيتروجين التكافلية مثل أفراد جنس الرايزوبيوم ، ويعمل مثل هذا النيتروجين المثبت على زيادة خصوبة التربة الزراعية ، وزيادة محتوى البذور والحبوب من البروتين ، والحد من استخدام الأسمدة المعدنية ، ومن ثم تلاشى تأثيرها الضار بالبيئة والصحة ، ويتوفر بالأسواق التجارية منذ سنوات طويلة لقاح سمادى من بكتيريا العقد الجذرية تحت مسمى العقدين Okadin للبقوليات .

الرايكتسيا Rickettsia :

هى مجموعة من البكتيريا أشتق اسمها من تويلر رايكت Taylor Rickett تخليداً له إذ أنه أول من وصفها عام ١٩٠٩ عند فحصه لدم حشرات القمل lice المتغذى على جسم إنسان مصاب بمرض التيفوس ، كما أنه مات نتيجة لإصابته بمرض التيفوس الذى أكتشف مسببه .

كل أفراد الرايكتسيا متطفلة أو متبادلة المنفعة mutualistic ، تنمو الأشكال الطفيلية فى كرات الدم الحمراء للفقاريات والخلايا البطانية الوعائية ، كما تعيش غالباً فى الحشرات الماصة للدم والتى تعمل كناقل أو عائل أولى . وتضم الرايكتسيا أفراد هامة تسبب أمراض للإنسان ، وتدخل الرايكتسيا خلية العائل بحث عملية الـ phagocytosis ، وتهرب أفراد جنس الرايكتسيا على الفور وتتكاثر بالانقسام الثنائى فى السيتوبلازم (شكل ٤-١٦) .

شكل ٤-١٦ . الرايكتسيا

ينتقل مرض التيفوس من جسم الإنسان المصاب إلى الآخر السليم عن طريق حشرات القمل ، ويلازم وباء التيفوس الكوراث الأخرى التى تلم بالبشرية كالحرائق والحروب والمجاعات .

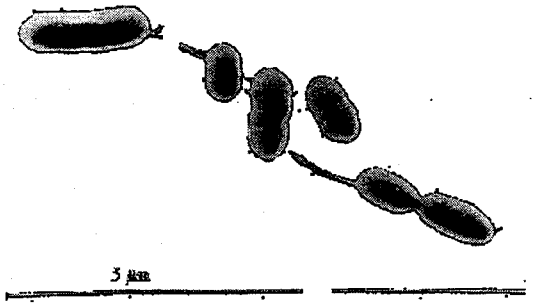
وتختلف أفراد الرايكتسيا عن البكتيريا الأخرى فى الفسيولوجى والميتابوليزم ، كما تفتقر إلى المسارات الـ glycolytic ولاتستخدم الجلوكوز كمصدر للطاقة ، لكن تؤكسد الجلوتامات والمركبات الوسطية لدورة الأحماض ثلاثية الكربوكسيل مثل السكسنات ، وللغشاء البلازمى فى الرايكتسيا حوامل تتوسط أنظمة النقل ، وتمتص المواد الغذائية لخلايا العائل والمرافقات الإنزيمية وتستخدم مباشرة .

تضم الرايكتسيا ميكروبات ممرضة هامة مثل النوع رايكتسيا بروازكيای Rickettsia prowazekii ، والنوع رايكتسيا تيفى R. typhi المسبب لحمى التيفوس ، والنوع رايكتسيا رايكتسياى R. rickettsii المسبب لحمى الجبال الصخرية المتقطعة ، كما تسبب الرايكتسيا أمراض للماشية والخيول .

جنس الزيموموناس Zymomonas :

بكتيريا ذات شكل عصوى ، متحركة بأسواط قطبية ، وسالبة لصبغ جرام (شكل ٤-١٧) ، توجد فى المستخلصات النباتية المتخمرة الغنية بالسكر مثل نبيذ التمر (الذى يصنع من عصير التمر) ومستخلص بنجر السكر وخل التفاح ، ينمو الميكروب إما بالتخمر أو بالتنفس ، ولاتتخمر السكريات بواسطة مسار امبدين ميرهوف Embden-Meyerhof الذى تستخدمه البكتيريا المعوية ، لكن يتحلل السكر إلى بيروفات بواسطة

مسار انتنر– دودوروف Entner-Doudoroff ، وتتخمر البيروفات إلى إيثانول كناتج نهائى وحيد بدلاً من مخلوط اللاكتات والإيثانول والفورمات والخلات والنواتج النهائية الأخرى .



شكل ٤–١٧ . أجزاء من تجمعات خلايا زيموموناس موبيليس .

وأهم أنواع الجنس النوع زيموموناس موبيليس Zymomonas mobilis ، يمتلك هذا النوع بعض المميزات عن الخمائر مثل سكارواميسيس سيرفيزيا Saccharomyces cerevisiae فى إنتاج الكحول على المستوى التجارى الضخم مثل امتصاصه قدر أكبر من السكر ، وإنتاج الإيثانول بكمية أكبر مع إنتاج بيوماس أقل ، ولا يتطلب إضافات أكسجين متحكم فيها أثناء عملية التخمير ، إلى جانب سهولة تعديله وراثياً ، وتحملها العالى للإيثانول ، ويرجع ذلك التحمل إلى احتواء غشائه السيتوبلازمى على hopanoids وهى مركبات حلقية خماسية تشبه الستيرولات sterols الموجودة فى الكائنات ذات النواة الحقيقية تسمح لها بتحمل الإيثانول عند تركيز حول ١٣% .

٢- البيتا بروتيوبكتيريا β-proteobacteria :

تتداخل البيتا بروتيوبكتيريا أيضياً مع الألفابروتيوبكتيريا إذ تميل لاستخدام المواد التى تنتشر من تحليل المادة العضوية فى المنطقة اللاهوائية بمواطنها ، وتستخدم بعض هذه البكتيريا مثل هذه المواد كهيدروجين أو أمونيا أو ميثان أو أحماض دهنية طيارة .

بركهولدريا Burkholderia :

تم استحداث هذا الجنس عندما تم تقسيم جنس سيدوموناس Pseudomonas إلى سبعة أجناس بناءً على بيانات الحمض النووى ر ن أ الريبوسومى ، تستخدم معظم

الأنواع مركب بولى بيتا هيدروكسى بيوترات poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) كمخزونها الكربونى ، ومن أهم أنوع الجنس بركهولدريا سيبسيا B. cepacia الذى يحلل أكثر من مائة من الجزيئات العضوية ، وهو نشط فى عملية تدوير المواد العضوية فى الطبيعة ، ويسبب هذا النوع أيضاً عفن البصل .

رالستونيا Ralstonia :

تم استحداث هذا الجنس أيضاً من جنس سيدوموناس ، وأفراده عديدة تعيش فى التربة الزراعية ، وتسبب بعض الأنواع أمراضاً للنبات مثل النوع رالستونيا سولانسيارم Ralstonia solanacearum – الذى كان يعرف سلفاً باسم سيدوموناس سولانسيارم Pseudomonas solanacearum – المسبب لأمراض الذبول البكتيرى لمدى واسع من النباتات .

ثيوباسيلس Thiobacillus :

يضم جنس ثيوباسيلس أفراد عصوية صغيرة (شكل ٤-٢٢) ، تعيش معيشة كيموأوتوتروفية عن طريق أكسدة مركبات الكبريت المختزلة مثل كبريتيد الهيدروجين والثيوسلفات ، ولا ينتج عن هذه الأكسدة تراكم رواسب الكبريت بداخل الخلايا .

شكل ٤-٢٢ . الثيوباسيلس

يتولد عن أيض الثيوباسيلس حمض الكبريتيك ، وتنمو كثير من الأنواع فى ظروف شديدة الحموضة (pH 1.5-2.5) ، وتظهر بعض أفراد الجنس تعدد أيضى ملحوظ ، فالنوع يحصل على طاقته من أكسدة الحديدوز إلى حديدك ، ففى غياب الأكسجين يؤكسد هذا الميكروب صور الكبريت المختزلة باستعمال الحديديك كمستقبل

بديل للإلكترون . وتعتبر أنواع جنس ثيوباسيلس بذات أهمية كبيرة فى استخلاص عناصر النحاس واليورانيوم من الخامات المحتوية عليها على المستوى الصناعى .

نيسيريا Neisseria :

معظم أفراد الجنس كرويات فى أزواج ، تقطن الأغشية المخاطية للثدييات ، وبعضها يسبب أمراض للإنسان مثل ميكروب نيسيريا جونوريا N. gonorrhoeae المسبب لمرض السيلان gonorrhea ، وهو من الميكروبات صعبة النمو بسبب احتياجاته الغذائية المعقدة ، له مظهر يشبه حبوب البن وينمو على آجار الشيكولاته .

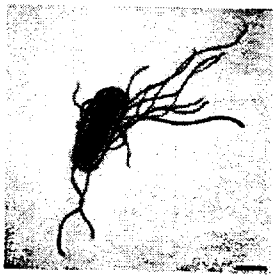
٣- الجاما بروتيوبكتيريا Gamma (γ) Division of the Proteobacteria :

يحتوى هذا القسم على عائلة كل من البكتيريا المعوية enteric bacteria (التى تضم بكتيريا ايشريشيا كولاى E. coli النمطية) وبعض أنواع سيدوموناس Pseudomonas المعروفة ، كما يحتوى هذا القسم أيضاً على عائلة Acidithiobacillaceae التى تضم بكتيريا كيموأوتوتروفية واسعة الإنتشار .

البكتيريا المعوية Enterobacteriaceae or enterics :

عائلة كبيرة من البكتيريا تضم ممرضات شائعة مثل الايشريشيا والسالمونيلا ، ومن أهم أفرادها النوع ايشريشيا كولاى E. coli ، وتقطن البكتيريا المعوية أمعاء الإنسان والحيوانات ذات الدم الحار ، وهى بكتيريا معظمها له شكل عصوى ، وسالبة لصبغ جرام ، ولها أسواط محيطية ، تولد البكتيريا المعوية جزيئات الأدينوزين ثلاثى الفوسفات بالتحليل التأكسدى للمركبات العضوية فى وجود الهواء أو بالتخمر للسكريات البسيطة تحت الظروف اللاهوائية ، وتمثل هذه البكتيريا عدد محدود من المركبات وهو أمر متوقع فى حالة البكتيريا المعوية التى يصلها فقط الغذاء الذى يتناوله الحيوان العائل .

ويعتبر ميكروب الإيشريشيا كولاى (شكل ٤-٢٣) أحد أهم أدوات البيوتكنولوجيا فى السنوات الأخيرة ، وهو يعتبر بمثابة مصنع حى لإنتاج الكثير من المنتجات المفيدة بأسلوب الهندسة الوراثية كما هو الحال فى الأنسولين .



شكل ٤-٢٣ . بكتيريا ايشريشيا كولاى .

ويتم إنتاج الحمض الأمينى اللايسين L-lysine تجارياً بواسطة بكتيريا ايشريشيا كولاى E. coli وبكتيريا انتروباكتر ايروجينيس Enterobacter aerogenes ، ويعتبر اللايسين من الأحماض الأمينية الأساسية فى التغذية .

وتنتج بكتيريا كلبسيلا Klebsiella بوليمر الدكستران dextrane ذو الاستخدامات المتعددة فى مجالات الصناعات الغذائية والبيوكيميائية ، كما يستخدم كبديل لبلازما الدم وفى فصل الجزيئات .

وتفيد بكتيريا بروتيس فلجاريز Proteus vulgaris فى عملية التقدير الحيوى لحامض النيكوتينيك (النياسين niacin أو فيتامين ب ٣) فى كثير من المنتجات .

وينتج من بكتيريا انتروباكتر ايروجينيس E. aerogenes 2 و ٣ بيوتان – ديول أثناء نموها على الكربوهيدرات تحت ظروف لاهوائية ، ويستعمل هذا المنتج الكيميائى فى أكثر من مجال مثل المذيبات .

جنس سيدوموناس Pseudomonas :

تختلف بكتيريا سيدوموناس Pseudomonas – وهى بكتيريا سالبة لجرام أيضاً – عن بكتيريا ايشريشيا كولاى E. coli فى نواحى كثيرة ، فعلى الرغم من أنها عصوية أيضاً إلا أن أسواطها قطبية (شكل ٤-٢٤) ، ولا يمكنها تصنيع جزيئات الأدينوزين ثلاثى الفوسفات ATP بالتخمر ، وهى هوائية إجباراً ، وعلى عكس الإيشريشيا كولاى تستخدم بعض الأنواع عدد كبير من المركبات العضوية قد يصل إلى ١٠٠ مركب كمصادر للطاقة ، وهو أمر ملائم للبكتيريا الموجودة فى التربة والمياه .

ومن أهم مجاميع جنس سيدوموناس مجموعة السيدوموناس الفلوروسنتية Fluroscent pseudomonads ، وتشمل هذه المجموعة كل من سيدوموناس ايروجينوزا P. aeruginosa وسيدوموناس بيوتيدا P. putida وسيدوموناس فلوريسنس P. fluorescens وسيدوموناس سيرنجى P. syringae ، وتتميز هذه المجموعة بإفراز مركبات فلوروسنتية خضراء مصفرة فى أوساط الزرع ، ويحلل الكثير من أفرادها مركبات مثل الكمفور والتلوين والأكتان والمركبات العطرية المهلجنة ، ويثبت بعض أفرادها نيتروجين الهواء الجوى ، وتساعد فى نمو فطريات عيش الغراب وإنتاجها على المستوى التجارى .

شكل ٤-٢٤ . بكتيريا سيدوموناس .

ومن بين المجموعة الفلورسنتية تسبب العديد من سلالات النوع سيدوموناس سيرنجى P. syringae الأمراض للكثير من النباتات الاقتصادية كالنجيليات ، ويحتوى الغشاء الخارجى لهذا النوع على معقد بروتينى يحث الخلية على تكوين بلورات ثلجية، ومن المعتقد منذ السبعينات أن هذا النوع يكون أنوية ثلجية بيولوجية فى الغلاف الجوى ، وهناك أدلة حديثة على أن هذا النوع يساهم فى حدوث المطر وتكوين الثلج ، ويسبب هذا النوع ضرر بسطح النبات من تكوين مثل هذه البلورات الثلجية .

وينتج النوع سيدوموناس ايروجينوزا P. aeruginosa بوليمر الألجينات alginate ، وهو سكر عديد ذو استخدامات متعددة فى الصناعات الغذائية وصناعة الورق والنسيج كما تغطى به النباتات والجروح كمادة محبة للماء .

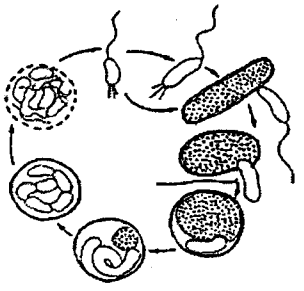
٤- الدلتا بروتيوبكتيريا Delta (δ) Division of the Proteobacteria :

مجموعة محدودة مقارنة بالمجاميع السابقة ، وتضم مجموعة متنوعة من الناحية المظهرية والفسيولوجية .

جنس ديسلفوفبريو Desulfovibrio :

أفراده شائعة التواجد فى الأوساط المائية الغنية فى المادة العضوية والأراضى الغدقة ، وهو من الأجناس الهامة تاريخياً بسبب اختزاله للكبريتات ، وتفيد بعض أنواع الجنس فى عمليات العلاج الحيوى bioremediation للأوساط البيئية الملوثة باليورانيوم (شكل ٤-٢٥) .

شكل ٤-٢٥أ . بكتيريا ديسلفوفبريو .



شكل ٤-٢٥ب . دورة حياة ديللوفبريو

جنس بديللوفبريو Bdellovibrio :

عصويات صغيرة منحنية كما يدل اسمها ، وتسمى أحياناً بالطفيل المنحنى curved leech ، أو المضاد الحيوى الحى living antibiotic لأنها لا تسبب أى أمراض معروفة ، وتقطن هذه العصويات التربة والمياه العذبة والمياه المالحة ومياه الصرف الصحى .

وتسبب البديللوفبريو ضرر لبعض البكتيريا الأخرى السالبة لجرام والبكتيريا الممرضة للإنسان والحيوان والنبات ، حيث تتطفل عليها بالدخول من ثقب بالجدار الخلوى فى فراغها البريبلازمى والتغذية على بوليمراتها الحيوية كالبروتينات والأحماض النووية ، حتى تصبح خلية العائل فارغة كالشبح ، ثم تترك البديللوفبريو خلية العائل لتغزو خلية أخرى (شكل ٤-٢٥) .

٥- الابسيلون بروتيوبكتيريا

Epsilon (ε) Division of the Proteobacteria:

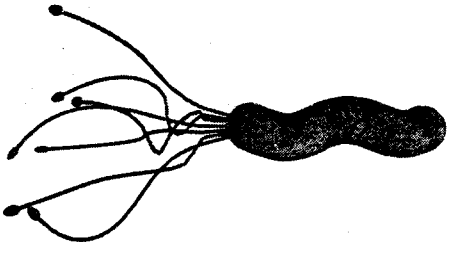
تعتبر أصغر مجموعة فى البروتيوبكتيريا ، وتضم بعض البكتيريات الممرضة .

جنس كامبيلوبكتر Campylobacter :

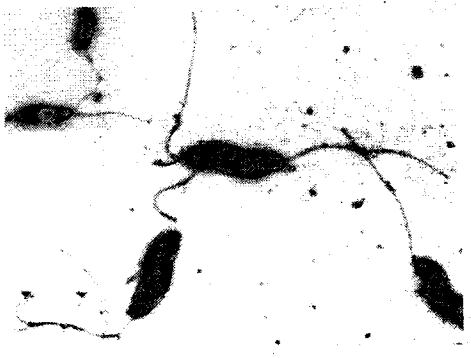
بكتيريا حلزونية يطلق عليها مسمى 'twisted bacteria' (شكل ٤-٢٥) ، وتقطن تجويف الفم والجهاز الهضمى والأعضاء التناسلية ، وتضم أفراد غير ممرضة ، وأخرى ممرضة للإنسان والحيوان ، مثل النوع كامبيلوباكتر فيتس C. fetus الذى يسبب الإجهاض فى الماشية والأغنام إلى جانب كثير من الاضطرابات المعوية للإنسان ، ويسبب النوع كامبيلوباكتر جيجناى C. jejuni بعض الأمراض التى تحمل بالغذاء كالإسهال فى الإنسان .

جنس هيليكوبكتر Helicobacter :

يتم عزله من معدة الإنسان والقناة الهضمية لكثير من الثدييات ، ويصيب ٧٠-٩٠% من الأفراد فى الدول النامية ، ٢٥-٥٠% فى الدول المتقدمة ، وتحدث معظم الإصابات فى مرحلة الطفولة . يسبب هذا الميكروب قرحة الإثنى عشر وسرطان المعدة (شكل ٤-٢٥) .



شكل ٤-٢٥ أ . بكتيريا Helicobacter



شكل ٤-٢٥ ب . بكتيريا Campylobacter jejuni (صبغ سالب) .

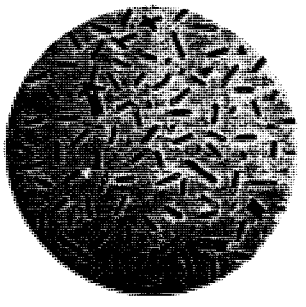
البكتيريا الموجبة لجرام المنخفضة فى الجوانين + السيتوزين

: Firmicutes (Phylum B13)

تضم قبيلة Firmicutes البكتيريا الموجبة لصبغ جرام المنخفضة فى نسبة الجوانين والسيتوزين G + C ، وتحتوى هذه القبيلة على كثير من الفروع بداخلها ، منها بكتيريا تكون جراثيم بداخل خلاياها لاهوائية إجباراً وعادة تصنف فى جنس كلوستريديم Clostridium ، الجراثيم الداخلية عبارة عن جراثيم سميكة الجدر تتكون بداخل الخلية البكتيرية ، وإنتاج الجراثيم عملية معقدة لأقصى درجة ويحدث فقط فى البكتيريا الموجبة لجرام . وتضم البكتيريا ثلاثة صفوف classes ، هى الكلوستريديا Clostridia والموليكيوتس Mollicutes إلى جانب الباسيلاى Bacilli .

أولاً : الكلوستريديا Clostridia :

من أهمها جنس كلوستريديم Clostridium الذى يضم أنواع لها شكل عصوى، تمتلك أسواط عادة ، موجبة لجرام ، لاهوائية إجباراً ، وتكون جراثيم داخلية تحت ظروف النمو السيئة (شكل ٤-٢٦) وتنتفخ العصويات عادة عند مكان الجرثومة .



شكل ٤-٢٦ . الكلوستريديم .

لقد كان اهتمام العالم شديداً بالكلوستريديم أبان الحرب العالمية الأولى ، ففى عام ١٩١٥ واجهت وزارة العتاد الحربى البريطانية أزمة نقص حادة في الأسيتون ، اللازم لصناعة البارود الخاص بالمدافع عيار١٢ بوصة التى تحملها سفن البحرية البريطانية، كان الأسيتون فى ذلك الوقت يتم تصنيعه من تقطير الخشب ، وقد نجح حاييم وايزمان فى ذلك الوقت فى إنتاج الأسيتون من كائن حى دقيق موجود فى الطبيعة كائن ذات مقدرة عالية وذات براعة من الناحية الكيميائية على تخليق الأسيتون، فالكائن الحى

الدقيق مصنع كيماوى معقد إلى أبعد الحدود محكم التنظيم يتناول غذائه ليصنع عـدداً كبيراً من جزيئات صغيرة أخرى يستفيد ببعضها ويطرد البعض منها خارج الخلية ، لقد سمى هذا الكائن فيما بعد كلوستريديم اسـيتوبيتيليكم Cl. acetobutylicum ، لقـد بلغت مقدرته الإنتاجية ١٢ طن أسيتون من كل ١٠٠ طن مولاس ، لقد أصبح التخمر الحادث بهذا الميكروب مصدر رئيسى للأسيتون منـذ عـام ١٩١٦ ، إلا أن إنتـاج المذيبات العضوية فيما بعد من خلال صناعة البترول قضى تدريجياً علـى السوق الخاص بالمنتج التخميرى ، وبحلول عام ١٩٨٢ تم إغلاق مصنع إنتـاج الأسـيتون التخميرى من الكلوستريديم فى جنوب أفريقيا ، إلا أن تقنية الهندسة الوراثية سـلطت الضوء من جديد على الأسيتون التخميرى المنتج من الكلوسـتريديم كمـصدر هـام للأسيتون .

وتثبت بعض أنوع الكلوستريديم نيتروجين الهواء الجوى مما يؤدى إلى زيادة خصوبة التربة الزراعية ، ويسبب بعض الأنواع أمراض للإنسان مثـل كلوسـتريديم تيتانى Cl. tetani المسبب للتيتنوس ، وتفرز بعض الأنواع كالنوع كلوستريديم بتيريكم Cl. butyricum سموم داخلية تسبب التسمم البوتشلينى فى الأغذية كالرنجة والسردين والفسيخ .

ثانياً : الموليكيوتس Mollicutes :

صف من البكتيريا يتصف بغياب الجدار الخلـوى ، وتتطفـل معظـم أفـراده على النباتات والحيوانات المختلفة حيث يعيش بداخل خلايـا العائـل ، ولـه جينـوم صغير جداً ، وأهم أجناسه المعروفة جنس الميكوبلازما Mycoplasma .

وتعرف مجموعة المليكيوتس بالميكوبلازمـات ، أو البكتيريـا الرخـوة ، أو البكتيريا الشبيهة بالبكتيريا المسببة للالتهاب الرئـوى للغـشاء البللـورى . وتفتقـر الميكوبلازمات إلى الجدار الخلوى ، ومن ثم تتميز بمرونة خلاياها ، وتعدد أشكالها ، ومرورها من المرشحات البكتيرية ، وقابليتها للتحلل عند تعرضها لصدمة مفاجئة من الضغط الأسموزى . ولا تتأثر الميكوبلازمات بالفاج ، ولا تثبط بالمضادات الحيوية

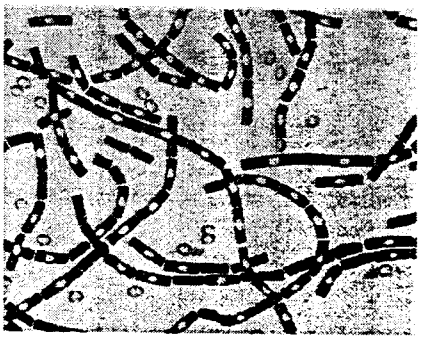
التى ينصب فعلها على الجدار الخلوى . والميكوبلازمات حساسة لكل من مذيبات الدهون ، ومخفضات الجذب السطحى بسبب احتواء غشائها السيتوبلازمى على قدر كبير من الدهون .

ثالثاً : الباسيلاى Bacilli :

جنس باسيلس Bacillus :

بكتيريا ذات شكل عصوى ، متحركة ، وتكون جراثيم داخلية عندما تكون الظروف غير ملائمة لنموها ، وتعيش غالبية أفراد جنس الباسيلس معيشة ترممية فى التربة تتغذى على المادة العضوية المتحللة ، وتتميز باحتياجات غذائية بسيطة ، ومن ناحية أخرى يضم هذا الجنس بكتيريا مرضية مثل النوع باسيلس انثراسيز B. anthracis المسبب المرضى للجمرة الخبيثة (الحمى الفحمية) anthrax (شكل ٤-٢٧) ، وهو مرض يودى بحياة الحيوانات كالماشية والأغنام ، كما يصيب الإنسان ، وتظل جراثيم هذا الميكروب حية فى التربة تقاوم الجفاف لفترات طويلة ، ويندرج هذا النوع ضمن قائمة طويلة من الأسلحة البيولوجية .

وتعيش أفراد جنس باسيلس معيشة كيموهيتروتروفية فى وجود الهواء ، ويمكن لكثير من سلالات الجنس أن تنتقل بين أساليب الأيض التخمرى والتنفسى ، وبعض الأنواع محبة لدرجات الحرارة المرتفعة تنمو جيداً على درجة حرارة من ٦٥-٧٥°م .



شكل ٤-٢٧ . بكتيريا الجمرة الخبيثة B. anthracis

ويفرز العديد من أنواع جنس باسيلس الكثير من الإنزيمات المحللة خارج خلاياها والتى تحلل البروتين والسكريات العديدة والأحماض النووية والليبيدات ، وتنتج

بعض الإنزيمات بكميات كبيرة على المستوى التجارى مثل الإنزيمات المحللة للبروتين والمستخدمة فى المنظفات الصناعية ، والإنزيمات المحللة للسكريات العديدة والمستخدمة فى صناعة النشا .

وتسبب بكتيريا باسيلس سيريس B. cereus بعض أنواع التسمم الغذائى ، ويمكن أن تسبب أمراضاً للإنسان .

وبعض أفراد جنس الباسيلس ممرضة للحشرات ، ولذلك يتم توظيفها كمبيدات حيوية biopesticides للقضاء على عوائلها من الآفات كبديل للكيماويات الملوثة للبيئة والضارة بالأعداء الطبيعية للآفات إلى جانب دفعها لتطور ظاهرة المقاومة resistance بالآفات ، ومن أمثلة المبيدات الحيوية النوع باسيلس ثورنيجينسيس B. thuringiensis والنوع باسيلس سفركس B. sphaericus ، ويعتبر الباسيلس ثورنجينسيس B. thuringiensis بصفة خاصة من أهم البكتيريا المستغلة فى المكافحة الميكروبية كمبيد بيولوجى ، حيث يكون أجسام بلورية بروتينية صلبة بخلاف الجراثيم تحتوى على سموم بروتينية تقتل أكثر من ١٠٠ نوع من الآفات الحشرية عن طريق إذابة المعى القلوى ليرقات الحشرات حرشفية الأجنحة ، ويحطم الخلايا الطلائية وتتحرر بروتينات السم الذائبة عن طريق إنزيم البروتييز للمعى الوسطى إلى بوليببتيدات سامة أصغر تهاجم الخلايا الطلائية للمعى ، وتهرب محتويات المعى القلوية فى الدم مما يؤدى إلى الشلل والموت ، وقد وجد أن أحد هذه السموم تحدث ثقوب فى الغشاء البلازمى لخلايا الحشرة المستهدفة ، وتسمح هذه القنوات للكاتيونات أحادية التكافؤ مثل البوتاسيوم بالمرور خلاله .

وتنتج بعض أنواع جنس باسيلس مضادات حيوية على المستوى التجارى ، مثل مضاد الباسيتراسين bacitracin والستلين subtilin من بكتيريا باسيلس ستلس B. subtilis ، والبوليمكسين polymyxin G (aerosporin) من بكتيريا باسيلس بوليميكسا B. polymyxa ، والجراميسيدين gramicidin من بكتيريا باسيلس بريفز B. brevis .

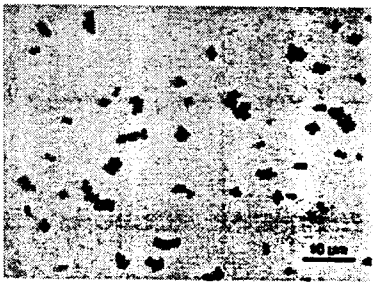
ويتوفر بالأسواق التجارية لقاح من البكتيريا المذيبة للفوسفات باسيلس ميجاتريم

B. megaterium var phosphaticum تحت مسمى الفوسفورين phosphrin ، ويفيد الفوسفورين الكثير من المحاصيل الزراعية وبصفة خاصة النامية فى الأراضى التى تعانى من نقص الفوسفور الميسر مثل الأراضى المصرية ذات الطبيعة القلوية .

جنس ستافيلوكوكس Staphylococcus :

أفراده غير متحركة ، ذات خلايا كروية ، تتقسم الخلايا فى مستويات متعددة ، وتتجمع الأفراد على شكل عنقود Staphyle العنب ، ومن هنا جاء اسم الجنس ستافيلوكوكس Staphylococcus ، لأفراد الجنس أيض تخمرى و تنفسى ، وتستخدم السكر كمصدر رئيسى للطاقة ، وموطنها الرئيسى جلد الإنسان ، ويرجع ذلك لتحملها الملحوظ لتركيزات الملح العالية (يحتمل أن عملية تجفيف العرق تركز الملح على الجلد) ، وبسبب مقاومتها النسبية للجفاف فإنها توجد فى المواقع الثانوية كاللحوم والدواجن والأغذية الحيوانية والتراب والهواء بداخل المنازل .

ومن أهم أنواع هذا الجنس ميكروب ستافيلوكوكس اورويس S. aureus (شكل ٤-٢٨) ، يسبب هذا النوع أمراض للجلد إلى جانب أمراض أخرى خطيرة كالتهاب الضرع فى الحيوانات ، وتسبب بعض سلالاته تسمم للإنسان نتيجة إفرازها لسموم معوية enterotoxins بالأغذية غير المحفوظة بالتبريد بصفة خاصة ، ومن ناحية أخرى يستفاد من هذا الميكروب فى التقديرات الحيوية لقوة المضادات الحيوية كالبنسلين .



شكل ٤-٢٨ . بكتيريا Staphylococcus aureus

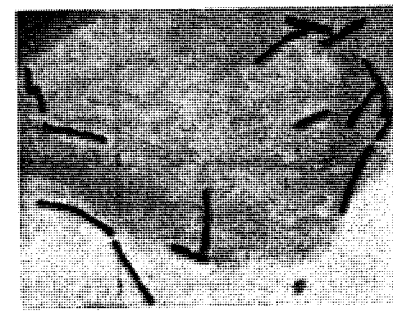
ويطلق على أحد عوامل المرضية التى ينتجها ميكروب ستافيلوكوكس اورويس S. aureus بروتين أ protein A ، وكما هو معروف فإن دفاع الحيوان ضد الأمراض

البكتيرية يعتمد على إنتاج الأجسام المضادة والبروتينات ولها مجال ارتباط انتجينى يدرك ويرتبط بالتركيبات المتخصصة الموجودة على سطح البكتيريا الغازية ، وتستدعى كثير من التتابعات الواقية المفيدة فى ارتباط الجسم المضاد بالأنتيجين من خلال النهاية غير المتخصصة الأخرى لجزئ الجسم المضاد والتى يطلق عليها مسمى منطقة Fc ، ويمنع بروتين أ أحد صفوف الجسم المضاد وهو صف الجلوبيولين المناعى ج من إحداث هذه التأثيرات بإرتباطه بشكل خفيف بمنطقته Fc ، ويستخدم بروتين أ بشكل مكثف فى تنقية البروتين والطرق التحليلية .

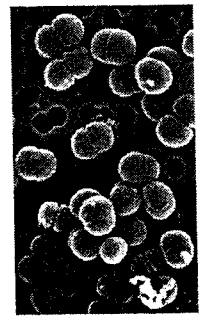
بكتيريا حمض اللاكتيك :

بكتيريا معظمها لاهوائى اختياراً ، تنمو سواء فى غياب أو وجود الأكسجين ، وتقاوم وجود الأكسجين لكن تؤدى نفس الأيض التخمرى للسكر بصرف النظر عن وجود أو غياب الهواء .

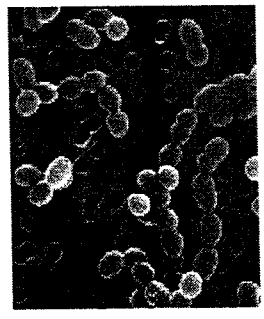
وتكون أجناس لاكتوباسيلس وبيدوكوكس ولوكونوستوك مجموعة بكتيرية يطلق عليها عادة بكتيريا حمض اللاكتيك ، وتحصل هذه الأجناس على الطاقة بالتخمر للسكريات البسيطة مثل الجلوكوز منتجة حمض اللاكتيك فى بعض أنواع اللاكتوباسيلس (شكل ٤-٢٩) وفى البيدوكوكس (شكل ٤-٣٠) ، وحمض لاكتيك وإيثانول وثانى أكسيد كربون فى الوكونوستوك (شكل ٤-٣١) .



شكل ٤-٢٩ . اللاكتوباسيلس .



شكل ٤-٣٠ . بيدوكوكس .



شكل ٤-٣١ . لوكونوستوك

وأنواع اللاكتوباسيلس متباينة التخمر ، وكل هذه الأجناس تفتقر إلى الأسواط ، ولخلايا اللاكتوباسيلس شكل عصوى بينما لخلايا بيدوكوكس ولوكونوستوك شكل مستدير .

وتنمو هذه الأجناس فى ضغط منخفض من الأكسجين ، فى أوساط غنية بالسكريات الذائبة والببتيدات والبيورينات والبيريميدينات والفيتامينات ، وتقاوم هذه البكتيريا الظروف الحامضية جيداً ، ولايحدث تثبيط لنموها على أثر انخفاض تركيز الأس الهيدروجينى pH نتيجة تحول الجلوكوز لحامض لاكتيك ، ويحدث بطء فى نمو الكثير من البكتيريا الاخرى عند انخفاض رقم الحموضة ومن ثم يقل تنافسها لأفراد اللاكتوباسيلس تحت الظروف الحامضية ، وتستخدم السلالات المختلفة لهذه الأجناس كبادئ مع سلالات ملائمة من جنس ستربتوكوكس Streptococcus لإنتاج الجبن والألبان المتخمرة كاليوجورت .

وتندرج بعض أنواع جنس لاكتوباسيلس وغيرها من بكتيريا حمض اللاكتيك ضمن المدعمات الحيوية probiotics لعلاج الأورام والسرطانات والوقاية من كثير من الميكروبات الممرضة .

وتستخدم بكتيريا لاكتوباسيلس كازى Lactobacillus casei فى التقديرات الحيوية bioassays للحامض الأمينى الثيامين والبيوتين ، كما تستخدم بكتيريا لاكتوباسيلس بلانتارم L. plantarum فى التقدير الحيوى للحامض الأمينى النياسين .

وينتج حامض اللاكتيك lactic acid فى الصناعة بالتخمير بواسطة بكتيريا لاكتوباسيلس ديلبروكياى تحت نوع ديلبروكياى L. delbrueckii subsp delbrueckii من المولاس والمواد السكرية وبواسطة بكتيريا لاكتوباسيلس ديلبروكياى تحت نوع بلجاريكس L. delbrueckii subsp bulgaricus من الشرش whey ، ويستعمل حمض اللاكتيك فى الأغذية وفى صناعات اللدائن والمنسوجات والورنيش ، وتستعمل مشتقاته مثل لاكتات الحديد فى علاج الأنيميا ، ولاكتات الكالسيوم فى علاج نقص الكالسيوم .

وتستخدم أنواع جنس لوكونوستوك Leuconostoc فى تخمير الكرنب cabbage

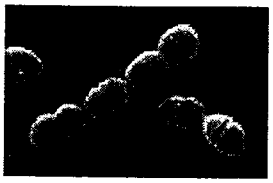
وإكسابه الطعم الحامضى sauerkraut وفى تحضير بادئات الزبد نظراً لأنهـا تخمـر السكريات أو حامض الستريك فى اللبن وتنتج مركبات رباعية الكربون متعادلة مثـل الباى أسيتيل وأسيتيل ميثيل كاربينول إلى جانب بعض الأحماض وثانى أكسيد الكربون ، ويعتبر مركب الباى أسيتيل أهم المركبات الكربونية المتعادلة حيث أنه المسئول عن تكوين النكهة المميزة فى الزبد .

وينتج بوليمر الدكستران Dextran من الجلوكوز بواسطة بكتيريا لوكونوستوك ميسنتيرويدس L. mesenteroides لاستخدمه فى كمثبت فى الأغذية وفى الـصناعات البيوكيميائية وفى إنتاج السيفادكس وكبديل لبلازما الدم .

جنس ستربتوكوكس Streptococcus :

يعتبر جنس ستربتوكوكس Streptococcus أحد أجناس بكتيريا حمض اللاكتيك، وخلاياه لها شكل كروى ، وتولد جزيئات الأدينوزين ثلاثى الفوسفات ATP بتحويـل الجلوكوز إلى جـزيئين حمـض لاكتيـك ، وعلـى خـلاف جـنس لوكونوسـتوك Leuconostoc وجنس بيدوكوكس Pediococcus يبدو هذا الجنس ذات صلة بجـنس لاكتوباسيلس ، وتعيش بعض أنواعه مع الحيوانات الراقية وع النباتات ، أما الـبعض الآخر فهو ممرضات .

ويستخدم النوع ستربتوكوكس كريموريس S. cremoris (شكل ٤-٣٢) والنوع لاكتوكوكس لاكتيز تحت النوع لاكتيـز Lactococcus lactis subsp. lactis - الـذى كان يعرف سابقاً باسم ستربتوكوكس لاكتيز S. lactis - بصفة رئيسية فـى تـصنيع الجبن الجاف كالجودة والشيدر cheddar ، وكذلك الجبن الطـرى مثـل الكـاممبرت camembert ، والمنتجات اللبنية المتخمرة الأخرى ، وتستخدم هذه الميكروبات فـى تحضير بادئات الجبن والزبد وبعض الألبان المتخمرة حيث تخمر سكر اللاكتوز وتنتج حمض اللاكتيك ، وتعتبر هذه الميكروبات من وسائل الحفظ الطبيعى للمنتجات اللبنية لمقدرتها على إنتاج حامض يثبط الكثير من الأنواع الميكروبية غير المرغوبة فى هذه المنتجات الغذائية .



شكل ٤-٣٢ . ستربتوكوكس كريمورس

وهناك معامل ميكروبيولوجية تجارية متخصصة فى إنتاج وتوفير بادئات الستربتوكوكس واللاكتوباسيلس والميكروبات المشابهة للاستخدام فى إنتاج المنتجات اللبنية المختلفة وكذلك فى صناعة اللحوم .

ويعتمد على النوع انتيروكوكس فاكاليز Enterococcus faecalis (الذى كان يعرف من قبل باسم ستربتوكوكس فاكاليز Streptococcus faecalis) فى التقديرات الحيوية لعدد من الأحماض الأمينية بالأغنية وغيرها .

وعلى أساس الاختلافات فى السكريات العديدة بالجدر الخلوية لأفراد جنس ستربتوكوكس Streptococcus يتم تقسيمها لعدة مجموعات تعرف بمجموعات لانسفيلد Lancefield groups .

وعلى حسب تأثير بعض أنواع الجنس على كرات الدم الحمراء يتم تقسيمها لما يلى :

أنواع محللة لكرات الدم الحمراء من نوع ألفا α-hemolytic streptoccoi :

تحلل كرات الدم الحمراء جزئياً ، وتكون هالة معتمة عديمة اللون أو خضراء اللون حول المستعمرات النامية على بيئة آجار الدم .

أنواع محللة لكرات الدم الحمراء من نوع بيتا β-hemolytic streptoccoi :

تحلل كرات الدم الحمراء تماماً ، وتكون هالة رائقة عديمة اللون تماماً حول المستعمرات النامية على بيئة آجار الدم .

أنواع غير محللة لكرات الدم الحمراء Non-hemolytic streptococci :

لا تحلل كرات الدم الحمراء تماماً ، وتكون مستعمرات على بيئة آجار الدم غير محاطة بأى هالة .

الأكتينوبكتيريا Actinobacteria (Phylum B14)

الأكتينوبكتيريا Actinobacteria هى شعبة كبيرة من البكتيريا الموجبة لصبغ جرام ، تضم الأكتينوميسيتات actinomycetes والبكتيريا الأخرى الموجبة لصبغ جرام المرتفعة فى نسبة الجوانين والسيتوزين ، ويتميز الحامض النووى د ن أ لهذه الأفراد بمحتوى من الجوانين والسيتوزين يصل إلى ٦٤-٧٧% ، ومعظمها هوائى يقطن التربة ، ولها أيض تنفسى ، ومعظمها يفتقر إلى الأسواط ، ولها شكل عصوى وغالباً إسطوانية وطويلة ، تميل للإنقسام بشكل غير منتظم وتكون خيوط متفرعة .

ويعتمد على بيانات جين S rRNA١٦ فى تصنيف الأكتينوبكتيريا ، ويلعب الشكل المظهرى ، وترتيب الجراثيم ، وكيمياء الجدار الخلوى ، ونوع السكريات الموجودة فى المستخلصات الخلوية دوراً هاماً فى تصنيف هذه البكتيريا إلى مجموعاتها المختلفة .

وللأكتينوميسيتات أهمية كبيرة من الوجهة العملية لأنها تلعب دور رئيسى فى معدنة المادة العضوية فى التربة الزراعية ، كما أنها مصدر لمعظم المضادات الحيوية المخلقة طبيعياً والمستخدمة فى مجال الطب حتى اليوم ، كما تنتج أيضاً مواد أيضية تستخدم فى علاج السرطان وفى القضاء على النيماتودا وفى إضعاف الجهاز المناعى للمرضى الذين تم نقل أعضاء إليهم ، وتضم الأكتينوميسيتات بعض الأفراد التى تسبب أمراض للإنسان .

وللأكتينوميسيتات دورة حياة معقدة ، وتتضمن فى حالة الكثير منها تكوين خلايا خيطية (تعرف بالهيفات) وجراثيم ، وعندما تنمو الأكتينوميستات فى وسط صلب كالآجار أو التربة فإنها تكون شبكة هيفية متفرعة ، تنمو الهيفات على سطح الوسط وبداخله لتكون شبكة كثيفة من الهيفات تعرف بالميسيليوم الأرضى substrate mycelium ، وتوجد حواجز عرضية عادة تقسم الهيفا لخلايا طويلة تحتوى على العديد من الأنوية ، وفى الكثير من الأكتينوميسيتات تتميز الهيفات الأرضية إلى هيفات تنمو لأعلى وتعرف بالميسيليوم الهوائى aerial mycelium ، وفى هذه المرحلة تتكون

المركبات المفيدة طبياً ، ولأن فسيولوجى الأكتينوميسيتات يتم التحكم فيه من خلايا خضرية نامية بنشاط فى هذا النوع من الخلايا الخاصة لذلك غالباً يطلق على هذه المركبات المواد الأيضية الثانوية secondary metabolites .

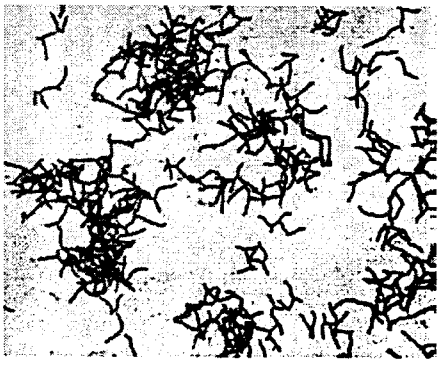
وتكون الهيفات الهوائية جراثيم ذات جدر رقيقة عقب التقسيم ، وتعتبر هذه الجراثيم بمثابة جراثيم خارجية exospores لأنها لاتتطور بداخل خلية أم كما هو الحال فى الجراثيم الداخلية endospores لأفراد جنس الباسيلس والكلوستريديم .

وتضم الأكتينوبكتيريا العديد من الميكروبات الهامة فى نواحى شتى ، ومن أجناس الأكتينوبكتيريا الهامة مايلى :

١- جنس أكتينوميسيس Actinomyces :

تفضل أفراده المعيشة فى تجويف الفم ، كما تقطن الأسطح المخاطية للإنسان والحيوانات ذات الدم الحار. خلايا الأكتينوميسيس المفردة عصوية، وخيطية متفرعة ، وقد تكون متعددة الأشكال . المستعمرات عبارة عن شبكة متفرعة من الهيفات تشبه الفطر .

ويسبب الكثير من أفراده الأمراض التى يطلق عليها actinomycoses ، ويسبب النوع أكتينوميسيس بوفيز A. bovis الفك المشوه lumpy jaw فى الماشية ، كما يعتبر النوع أكتينوميسيس اسرائيلياى A. israelii (شكل ٤-٣٣) أهم الميكروبات الممرضة للإنسان .



شكل ٤-٣٣ . أكتينوميسيس اسرائيلياى

وتلعب أفراد الجنس دور هام فى بيئة التربة ، إذ تنتج عدد كبير من الإنزيمات المحللة للمادة العضوية النباتية واللجنين ، ولها دور هام فى تكوين الكومبوست compost .

ويرجع لبعض أنواع الجنس مسئولية رائحة التربة السطحية التى تلاحظ بشكل واضح فى أغلب الأحيان بعد هطول المطر ، وتعتبر مادة الجيوسمين geosmin هى المادة الكيميائية الرئيسية المسئولة عن هذه الرائحة .

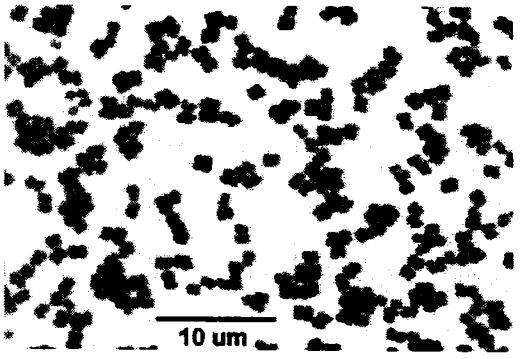
٢- جنس ميكروكوكس Micrococcus :

توجد أفراده بكثرة فى التربة والمياه ومنتجات الألبان والبيرة وعلى جلد الثدييات، ويحول النوع ميكروكوكس ليوتس M. luteus المركبات الموجودة بالعرق على جلد الإنسان إلى أخرى ذات رائحة غير سارة ، ويمكن لأفراده النمو فى الأوساط البيئية المحتوية على قليل من الماء أو ذات التركيزات الملحية المرتفعة ، ويتفرد الميكروكوكس ببقائه حياً لفترات زمنية طويلة ، إذ تظل أفراده حية فى التربة بالثلاجة لمدة ١٠ سنوات .

وتتميز أفراده بتكوين مستعمرات عادة ذات ألوان صفراء أو برتقالية أو حمراء، وخلاياه كروية توجد فى أزواج ، ومربعات ، أو عناقيد غير منتظمة (شكل ٤-٣٤) . وعلى خلاف الكثير من الأكتينوميسيتات الأخرى لايظهر هذا الجنس اختلافات فى شكله المظهرى .

وتستطيع بعض أنواع جنس ميكروكوكس إنتاج حامض الجلوتاميك L-glutamic بكميات كبيرة تحت الظروف الهوائية ؛ ولذلك تستخدم فى الإنتاج الصناعى، وحمض الجلوتاميك من الإضافات الغذائية ومن مكسبات الطعم والنكهة .

ويحلل الميكروكوكس عدد كبير من المواد ، ويتميز بقدرة عالية على استخدام مواد مثل مبيدات الحشائش والمواد البترولية ، وتساهم أفراده فى نزع سمية كثير من الملوثات البيئية ، وتنتج بعض الأفراد مركبات مفيدة مثل الهيدروكربونات الأليفاتية طويلة السلسلة (٢١-٣٤ ذرة كربون) .

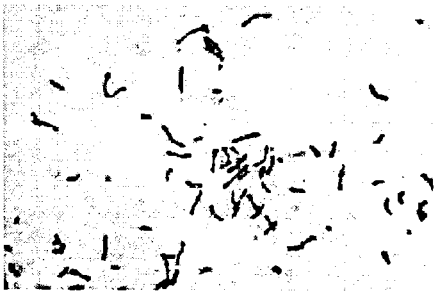


شكل ٤-٣٤ . ميكروكوكس ليوتس .

٣- جنس كورينبكتيريم Corynebacterium :

خلاياه عصوية وقد تكون متفرعة ، وعادة يكون بهذه الخلايا انتفاخات ، وتتجمع الخلايا فى ترتيب سياجى أو عمادى palisade arrangement حيث تتراص الخلايا بجوار بعضها مثل أوتاد السياج ، وتكون أفراد الجنس الفوليوتين (حبيبات ميتاكروماتينية metachromatic granules) وهذا يؤدى إلى عدم انتظام صبغ الخلايا.

أفراد الجنس مترممة تنتشر بكثرة فى الطبيعة حيث تقطن التربة والماء ، وبعضها يسبب أمراض للنبات كالتعفن الحلقى فى البطاطس والتقرح فى الطماطم ولفحة الأوراق والذبول فى الذرة الشامية ، والبعض الآخر يسبب أمراض للإنسان والحيوان مثل النوع كورينيبكتيريم دفثيريا C. diphtheriae (شكل ٤-٣٥) المسبب لمرض الدفتيريا فى الإنسان ، تفرز بكتيريا الدفتيريا سموم خارجية بالدم عند وجود مستوى ملائم من عنصر الحديد وفاج هذه البكتيريا الذى يحمل جين إفراز السم .



شكل ٤-٣٥ . كورينيبكتيريم دفثيريا

ولأنواع الكورينيبكتيريم Corynebacterium غير الممرضة تطبيقات صناعية

هامة جداً فى إنتاج الأحماض الأمينية والنيوكليوتيدات والعوامل الغذائيـــة الأخـــرى ، وتشمل الأحماض الأمينية المنتجة حامض الجلوتاميك والليسين والثريـــونين ، وتبلـــغ الكمية المنتجة من حامض الجلوتاميك فقط ١,٥ مليون طن فى العام ، كمـــا تنـــدرج الكورينى بكتيريم ضمن الميكروبات المحولـــة للاســـتيرويدات steroids بيولوجيـــاً ، وعمليات تحول الاستيرويدات بمثابة عمليات بيولوجية متخصصة جـــداً يمكـــن مـــن خلالها إنتاج مشتقات الاسترويد المطلوبة . وتحلل هذه الميكروبات الهيدروكربونات ، وتساهم فى تعتيق الجبن ، وتنتج الإنزيمات المختلفة ، كما تنتج بعض أنواعها مـــواد أيضية تشبه المضادات الحيوية عبـــارة عـــن مـــضادات لـــلأورام وبكتيريوســـينات bacteriocins من نوع كورينيسين – لينوسين corynecin-linocin .

ويستخدم النوع كورينيبكتيريم جلوتاميكم C. glutamicum فى إنتـــاج حـــامض الجلوتاميك على المستوى الصناعى تحت الظروف الهوائية ، حيث يستخدم فى صناعة الأغذية على هيئة جلوتامات أحادى الصوديوم فى إنتاج اليوجورت وصلصة الصويا .

٤- جنس ميكرومونوسبورا Micromonospora :

توجد أفراده مترممة فى التربة والمياه ، يكون أفراد هـــذا الجـــنس ميـــسيليوم متفرع، وجراثيم غير متحركة ، تحمل جرثومة كونيدية واحدة ، جالسة أو على حوامل جرثومية قصيرة فى مجاميع على سطح البيئة النامية عليها .

وتعتبر أفراد هذا الجنس أحد مصادر المـــضادات الحيويـــة aminoglycoside antibiotics والتى تنتهى أسمائها بالمقطع micin، كما أنه أحد مصادر فيتامين B12 .

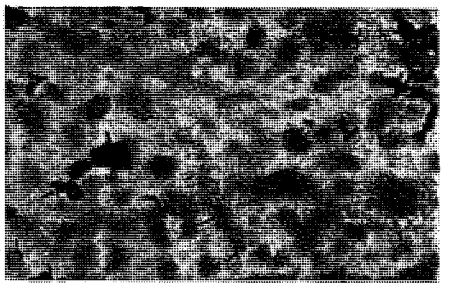
٥- جنس بروبيونيبكتيريم Propionibacterium :

تنمو أفراد هذا الجنس على كل أجزاء الجسم كالجلد ، وفـــى القنـــاة الهـــضمية للحيوانات ، وفى المنتجات اللبنية مثل الجبن ، وتخمر أفراده اللاكتـــات والـــسكريات منتجة كميات كبيرة من أحماض البروبيونيك والخليك وغالباً ثانى أكسيد الكربون .

ويلعب النوع بربيونيبكتيريم شيرمانياى P. shermanii دوراً هاماً فـــى تـــسوية وإنتاج الجبن السويسرى كالشيدر Cheddar ، الذى يتميز بوجود ثقوب كبيرة أو عيون

ونكهة حلوة كنكهة الجوز نتيجة نشاط البربيونيبكتيريم شيرمانای ، ويخمر هذا الميكروب حمض اللاكتيك (على هيئة لاكتات) إلى حمض بروبيونيك وثانى أكسيد الكربون ، ويعتبر حمض البروبيونيك مسئول عن النكهة أما ثانى أكسيد الكربون فيجمع فى جيوب بالخثرة مكوناً الثقوب أو العيون .

ويعتبر النوع بروبيونيبكتيريم أكنيز P. acnes ضمن العوامل المسئولة عن تطور رائحة الجسم وحب الشباب Acne vulgaris الشائع (شكل ٤-٣٦) .

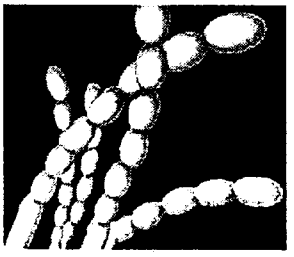


شكل ٤-٣٦ . النوع P. acnes .

٦- جنس ستربتوميسيس Streptomyces :

جنس كبير يضم مئات الأنواع التى تسود فى التربة والبقايا النباتية المتحللة ، يحلل الاستربتوميسيس معظم المواد العضوية المعقدة كالسليلوز بالتربة الزراعية ، وتتميز أفراده برائحة مميزة تشبه رائحة التربة وتنتج من المادة الأيضية الطيارة الجيوسمين geosmin التى يفرزها ميكروب ستربتوميسيس حريسيس S. griseus بصفة خاصة .

وتنقسم هيفات الاستربتوميسيس فى مستوى واحد ، وتكون أفراده سلاسل من الجراثيم الكونيدية غير المتحركة ، يتراوح عددها بين ٣ لأكثر (شكل ٤-٣٧) ، وهى غالباً ملونة وناعمة ، أو تحمل شعوراً شوكية .



شكل ٤-٣٧ . ترتيب الجراثيم فى الستربتوميسيس جريسيس

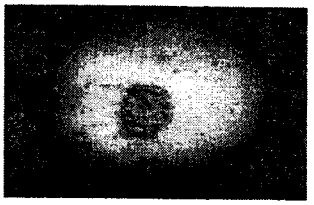
ويتم التعرف على أفراد الجنس من خلال الخصائص المورفولوجية والفسيولوجية مثل لون الميسيليوم الهوائى والأرضى ، وترتيب الجراثيم ، وخصائص السطح بالجراثيم المفردة ، واستخدام الكربوهيدرات ، وإنتاج المضادات الحيوية ، وتخليق الميلانين ، واختزال النترات ، والتحليل المائى لليوريا وحامض الهيبيوريك hippuric acid .

ولمستعمرات الاستربتومايسيس مظهر مخملى على أوساط نموه الصلبة ، وعادة تكون هذه المستعمرات جامدة ، وشديدة الالتصاق بالبيئة الصلبة بسبب امتداد هيفات تحتية بالبيئة من المستعمرات النامية .

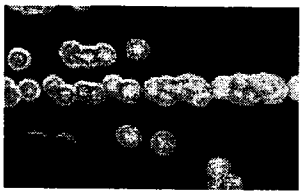
وتتميز أفراد جنس الاستربتوميسيس بأيض ثانوى معقد بشكل كبير ، يمكنها من إنتاج مايزيد على ثلثى المضادات الحيوية الطبيعية المفيدة من الوجهة الطبية مثل النيوميسين neomycin والكلورامفينيكول chloramphenicol ، وقد أخذ المضاد الحيوى الاستربتوميسين اسمه من النوع ستربتوميسيس جريسيس S. griseus (شكل ٤-٣٨) الذى يفرزه ، وهو مضاد ذو مجال متسع وفعال ضد البكتيريا سواء الموجبة أو السالبة لصبغ جرام إلا أنه لم يعد شائعاً فى الاستعمال الآن بسبب ظهور حالات من المقاومة ضده .

وينتج النوع ستربتوميسيس افيرميتيليز S. avermitilis عقار الافيرمكتين ivermectin الواسع الانتشار المضاد للطفيليات من النيماتودا ومفصليات الأرجل .

ومن ناحية أخرى تسبب بعض أفراد هذا الجنس أمراض للنبات والإنسان ، مثل النوع ستربتوميسيس سكابيس Streptomyces scabies المسبب لمرض الجرب العادى فى البنجر والبطاطس (شكل ٤-٣٨) ، والنوع S. ipomoeae المسبب لجدرى البطاطا ، كما تسبب بعض السلالات بعض الأورام فى الإنسان .



ب



أ

شكل ٤-٣٨ .

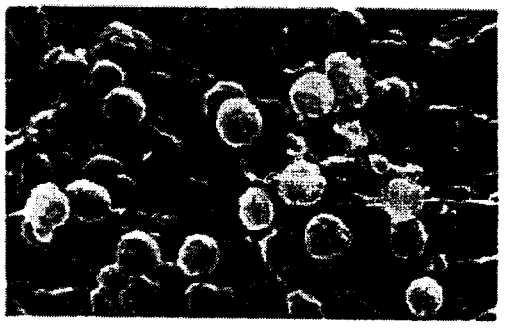
أ.مستعمرات إنتاج الستربتوميسين .

ب. ميكروب الجرب العادى نامى على البطاطس .

٧- جنس ستربتوسبورانجيم Streptosporangium :

تكون أفراد الجنس حوافظ أسبورانجية (شكل ٤-٣٩) ، بها جراثيم غير مقاومة للحرارة .

وتعتبر بعض أنواع الجنس بذات أهمية فى إنتاج المضادات الحيوية ، وبعض الإنزيمات الهامة .

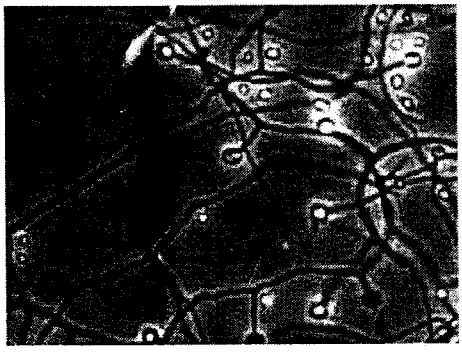


شكل ٤-٣٩ . الحوافظ الاسبورانجية بالنوع ستربتوسبورانجيم البم S. album .

٨- جنس فرانكيا Frankia :

تكون الفرانكيا ميسيليوم أرضى متفرع ، يحمل أكياس أسبورانجية ، بها جراثيم أسبورانجية ، وتتكون بأطراف الهيفات حويصلات كروية يتم بها تثبيت نيتروجين الهواء الجوى (شكل ٤-٤٠) .

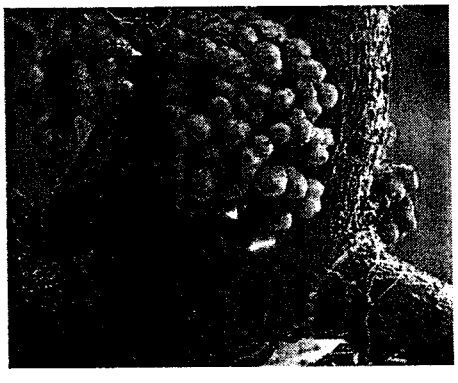
وتعيش أفراد جنس الفرانكيا معيشة تكافلية مع جذور ثمانية عائلات على الأقل من النباتات الراقية من غير البقوليات ، تعرف فى مجموعها باسم actinorhizal plants ، حيث تثبت نيتروجين الهواء الجوى تحت ظروف شحيحة .



شكل ٤-٤٠ . النوع فرانكيا الناى . هيفات مقسمة متفرعة والحويصلات الكروية بأطرافها وهى مكان تثبيت نيتروجين الجو .

وتكون أفراد هذا الجنس عقد جذرية على بعض الأشجار الخشبية غير البقولية كالألدار alder والألناس alnus والكازورينا casuarina تثبت فيها نيتروجين الهواء الجوى (شكل ٤-٤١) ، ومن ثم تنمو هذه النباتات فى غياب النيتروجين مثل النترات NO_3^- ، وتكون الفرانكيا بداخل خلايا العقدة هيفات متفرعة ذات حويصلات كروية فى نهايتها ، وهذه الحويصلات هى مواقع تثبيت النيتروجين ، وعملية تثبيت النيتروجين حساسة للأكسجين وتحتاج إلى الموليبيدنم والكوبلت .

ويتوفر بالأسواق التجارية منذ فترة لقاح سمادى من الفرانكيا يستخدم فى تلقيح غير البقوليات .

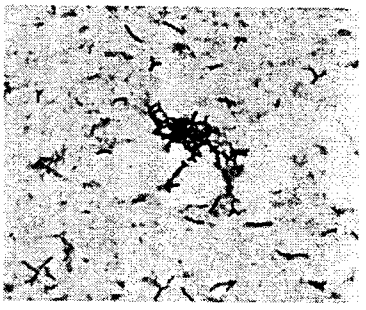


شكل ٤-٤١ . عقد الفرانكيا على نبات الألدار

٩- جنس بيفيدوبكتيريم Bifidobacterium :

قبل عام ١٩٦٠ كان يشار لأنواع جنس بيفيدوبكتيريم Bifidobacterium ككل باسم لاكتوباسيلس بيفيدس Lactobacillus bifidus ، وأفراد جنس بيفيدوبكتيريم لها شكل متفرع غالباً (شكل ٤-٤٢) ، وهى لا هوائية تقطن الفم والأمعاء والأعضاء

التناسلية بأعداد كبيرة فى الحيوانات ذات الدم الحار ، كما توجد فى المجارى والحشرات ، وتخمر الكربوهيدرات بنشاط ملحوظ منتجة أحماض الخليك واللاكتيك ، إلا أنها لا تكون غاز ثانى أكسيد الكربون .



شكل ٤-٤٢ . Bifidobacterium bifidum

يعتبر البيفيدوبكتيريم من الميكروبات الصديقة ، وتستخدم بعض أنواع الجنس كمدعمات حيوية probiotics ، حيث تساعد فى عملية الهضم ، وتمنع تكوين بعض أشكال الأورام ، ومن أنواع هذا الجنس النوع بيفيدوبكتيريم بيفيدم B. bifidum الذى يقطن الأمعاء فى فترة رضاعة الأطفال .

البلانكتوميسيتات والإسبيروكيتات والفبريوبكتيرات والبكتيرويدتات والفيوزوبكتيريا

The Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteria, Bacteriodetes and Fusobacteria

البلانكتوميسيتات Planctomycetes :

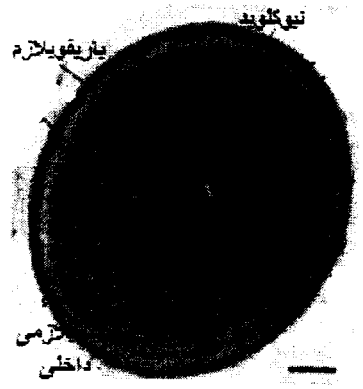
توجد أفراد هذه القبيلة فى المياه العذبة والبحرية والتربة ، وتتكاثر بالتبرعم ، ولها شكل بيضاوى ، وهى بكتيريا فريدة مورفولوجياً حيث تحتوى على خلايا مقسمة إلى أجزاء مستقلة compartmentalized cells (شكل ٤-٤٢) ، ومع أن كل نوع من البلانكوميسيتات يعتبر فريد فى حد ذاته ، إلا أنها كلها تحتوى على غشاء سيتوبلازمى محاط بالجدار الخلوى الذى يفتقر إلى الببتيدوجليكان ، وهناك غشاء سيتوبلازمى داخلى منفصل عن الغشاء السيتوبلازمى بواسطة منطقة خالية من الريبوسومات تسمى باريفوبلازم paryphoplasm .

وتتفرد خلايا جنس بلانكتوميسيس Planctomyces بأن لها ماسك holdfast يسمى الساق stem ، يساعدها على الإمساك ببعضها أثناء التكاثر ، ومن الأجناس الأخرى التى تمثل البلانكتوميسيتات جنس جيماتا Gemmata .

ولا يوجد الحامض النووى د ن أ بداخل الجسم النووى فى النوع Candidatus Brocadia anammoxidans ، ومن ثم فهو يحتوى على جزء تقسيمى آخر هو جسيم اناموكسوسوم anammoxosome ، وهو موضع أكسدة الأمونيا لاهوائياً ، ويعيش هذا النوع معيشة كيموليثوتروفية يعمل فيها أيون الأمونيوم (NH_4^+) كمعطى للإلكترون ، والنيتريت (NO_2^-) كمستقبل نهائى للإلكترون حيث يختزل لغاز النيتروجين (N_2) .

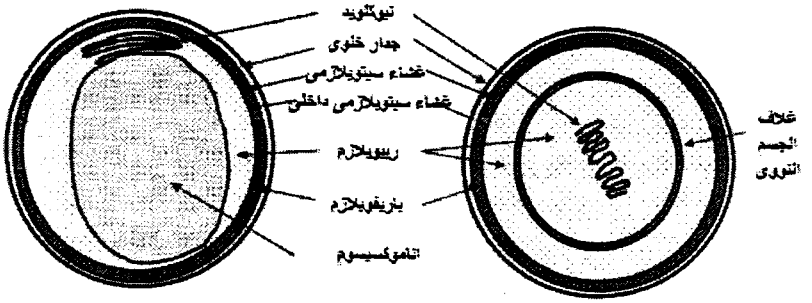
شكل ٤-٤٢

أ. بكتيريا Gemmata obscuriglobus .



شكل ٤-٤٢

ب. بكتيريا Candidatus Brocadia anammoxidans المؤكسدة للأمونيا لاهوائياً .



شكل ٤-٤٢ج . رسم تخطيطى يتطابق مع أ و ب .

الكلاميديات Chlamydiae :

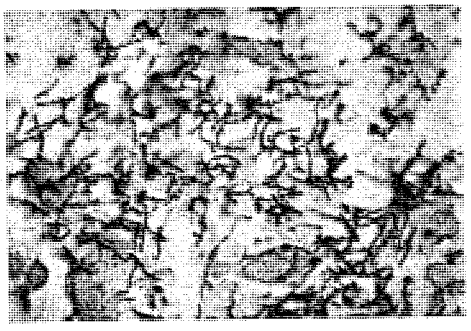
قبيلة الكلاميديات ممرضات تتطفل إجبارياً داخل الخلايا ، تنمو بإصابة عوائلها من خلايا الأيوكاريوتات ، وهى أصغر فى الحجم من كثير من الفيروسات ، وتتضاعف الكلاميديات داخل خلايا العائل ولذلك يطلق عليها داخلية الخلايا .

ولا تستطيع الكلاميديات تصنيع جزيئات ATP ، وتعتمد كلية على خلايا العائل فى الحصول على هذا المركب ، ولذلك كثيراً ما يطلق عليها طفيليات الطاقة energy parasites ، ومن أجناس الكلاميديات المعروفة جنس كلاميديا Chlamydia الذى يسبب مرض التراكوما Trachoma ، وجنس كلاميديوفيلا Chlamydiophila الذى

يضم النوع كلاميديوفيلا نيومونيا C. pneumoniae المسبب لمرض الالتهاب الرئـــوى فى الإنسان .

الإسبيروكيتات Spirochaetes :

قبيلة ذات خلايا مرنة الجدر بصورة زائدة ، ولها شكل حلزونى (شكل ٤-٤٣)، وتتحرك بفلاجيلات خاصة تسمى الفلاجلات البيربلازمية (الفلاجـــيلات الداخليـــة أو اللويفات المحورية) والتى تقع بين الغشاء الخارجى (غالباً يعرف فى الإسبيروكيتات بالغلاف الخارجى) والاسطوانة البروتوبلازمية (أى البروتوبلاست يحيط به طبقـــة الببتيدوجليكان) أى فى الفراغ البيربيلازمى للخلية ، تشبه الفلاجيلات البيربلازميـــة الفلاجلات العادية تركيباً ، وهى المسئولة عن حركة الاسبيروكيتات , وعلى الرغم من أن الميكانيكية التى تنفذ بها الحركة غير واضحة بدقـــة بـــسبب عـــدم امتـــداد هـــذه الفلاجيلات خارج الخلية ، تتحرك الإسبيروكيتات جيداً فى الأوساط عاليـــة اللزوجـــة على عكس البكتيريا الأخرى ذات الفلاجيلات العادية ، عموماً يمكن للإسبيروكيتات أن تتحرك على الأسطح الصلبة ، معظم الإسبيروكيتات ذات خلايا رقيقة ومن ثم يصعب رؤيتها بالمجهر الضوئى حتى ولو صبغت بجرام ، وفى العادة يجرى فحصها بالمجهر ذو الحقل المظلم .



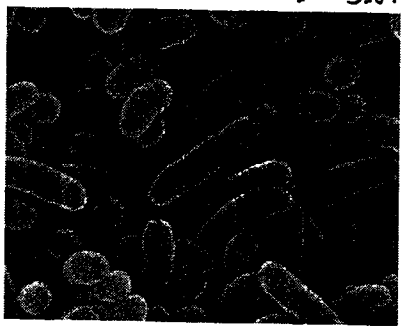
شكل ٤-٤٣ . بكتيريا Treponema pallidum

وتضم السبيروكيتات عدة أجناس منها جنس بورليا Borrelia الذى يسبب أحـــد أنواعه مرض الحمى الراجعة Relapsing fever ، وجـــنس تريبونيميـــا Treponema الذى يسبب أحد أنواعه مرض الزهرى syphilis ، وجـــنس ليبتوســـبريا Leptospira الذى تسبب بعض أفراده أمراض للإنسان .

الفيبروبكتيرات Fibrobacteres :

قبيلة صغيرة من البكتيريا ، تضم الكثير من بكتيريا الكرش التى تحلل السليلوز بالعلائق النباتية للمجترات ، وتحتوى على جنس واحد هو فيبروباكتر Fibrobacter تم فصله من جنس باكترويدز Bacteroides عام ١٩٨٨ .

ويعتبر النوع فيبروباكتر سكسينوجينيز Fibrobacter succinogenes (شكل ٤-٤٣) من الأنواع الهامة المحللة للسليلوز بكرش الماشية ، وينتج من تحليله لهذه المواد الفورمات والخلات والسكسينات ، ويكون هذا النوع تجاويف مميزة فى السليلوز المتبلور ، ولذلك يمكن فصله بسهولة أثناء تجهيز العينة .



شكل ٤-٤٣ . النوع فيبروباكتر سكسينوجينيز Fibrobacter succinogenes

الأسيدوبكتيريا Acidobacteria :

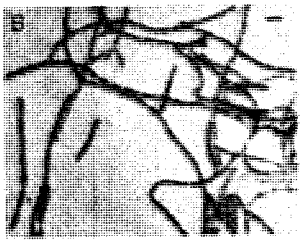
قبيلة جديدة من البكتيريا ، تم التعرف عليها عام ١٩٩٧ ، توجد بكثرة فى التربة ، وتنمو فى الأوساط الحامضية كما يدل اسمها ، وهى هامة من الناحية البيئية ، ويعكس ذلك تواجدها بأعداد كبيرة فى التربة الزراعية ، وتضم القبيلة عدد من الأجناس منها جنس اسيدوباكتيريم Acidobacterium .

شكل ٤-٤٤ . ميكروب من جنس اسيدوباكتيريم Acidobacterium

البكتيرويدتات Bacteriodetes :

قبيلة كبيرة من البكتيريا ، تضم أجناس معروفة مثل الفلافوبكتيريم Flavobacterium والسيتوفاجا Cytophaga والسبوروسيتوفاجا Sporocytophaga والفليكسيباكتر Flexibacter ، وهى تقطن التربة والرواسب ومياه البحر والأمعاء ، كما توجد على جلد الحيوانات .

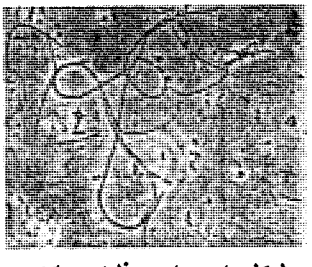
وتعيش أفراد جنس فلافوبكتيريم Flavobacterium فى التربة والمياه العذبة ، وتسبب كثير من أنواعه أمراض لأسماك المياه العذبة مثل مرض الماء البارد البكتيرى. وأفراد السيتوفاجا Cytophaga عصوية طويلة منحنية مدببة الطرفين أى مغزلية الشكل ، وذات جدار مرن ، وحركتها زاحفة ، وتعيش بالتربة ، محللة المواد السليلوزية بكفاءة عالية . أما أفراد جنس السبوروسيتوفاجا Sporocytophaga فتتشابه مع السيتوفاجا إلا أن خلاياها الخضرية المغزلية الشكل تتحول لخلايا كروية فى أحد أطوار دورة حياتها ، وتحاط بكابسول وتسكن . وتعيش أنواع جنس فليكسيباكتر Flexibacter فى الأراضى والمياه ، ويسبب النوع فليكسيباكتر كولمناريز F. columnaris الذى كان يعرف سلفاً باسم كوندروكوكس كولمناريز Chondrococcus columnaris أمراض لأسماك المياه العذبة والمالحة (شكل ٤-٤٥) .



شكل ٤-٤٥أ . فلافوبكتيريم

شكل ٤-٤٥ب . سيتوفاجا

شكل ٤-٤٥ج . سبوروسيتوفاجا



شكل ٤-٤٥د . فليكسيباكتر

وقد تم دراسة جنس بكترويدز Bacteroides دراسة مستفيضة على الرغم من صعوبة زرع هذه اللاهوائيات والذى يعوق من فهمنا لها ، وتعتبر بعض أنواع الجنس من أهم مكونات الميكروبات الموجودة بكرش الحيوان حيث تخمر النشا والبكتين والمواد الكربوهيدراتية الأخرى .

الفيوزوبكتيريا Fusobacteria :

تحتوى على جنس واحد هو فيوزوبكتيريم Fuosobacterium ، أفراده خيطية، سالبة لجرام ، تقطن الفم والأمعاء ، ويسبب النوع فيوزوبكتيريم نيوكليباتم Fusobacterium nucleatum أمراض عديدة للإنسان مثل قرح الجلد .

الفيركوميكروبيا Verrucomicrobia :

من أفراد هذه القبيلة النوع فيركوميكروبيم سبينوسم Verrucomicrobium spinosum الذى يقطن المياه العذبة والبحرية والتربة وبراز الإنسان ، ويسبب هذا النوع بعض المتاعب الصحية للأقدام والأيدى .

الديكتيوجلومى Dictyoglomi :

من أفراد القبيلة جنس دايكتيوجلومس Dictyoglomus ، أفراده محبة للحرارة الشديدة ، وسالبة لصبغة جرام ، وتحصل على طاقتها من تمثيل الجزيئات العضوية ، ومن أنواع الجنس الهامة دايكتيوجلومس ثرموفيلم D. thermophilum الذى ترجع أهميته إلى إفرازه لإنزيم الزيلانيز الذى يستخدم حديثاً فى تبييض الورق .

الجيماتيموناديتس Gemmatimonadetes :

قبيلة من البكتيريا السالبة لصبغ جرام ، أكتشف أول أفرادها عام ٢٠٠٣ فى الحمأة النشطة بوحدات معالجة المجارى ، وتساهم فى عمليات المعالجة بوحدات المجارى .

المراجـع :

Amyes, S.G. (2007). Enterococci and streptococci. Int. J. Antimicrob. Agents 29 Suppl 3: S43–52.

Antal, G.M., S.A. Lukehart, A.Z. Meheus (2002). The endemic treponematoses. Microbes Infect. 4 (1): 83–94.

Barns S.M., E.C. Cain, L. Sommerville, C.R. Kuske (2007). Acidobacteria phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. Appl. Environ. Microbiol. 73 (9), 3113–3116.

Beatty, J.T., J. Overmann, M.T. Lince, A.K. Manske, A.S. Lang, R.E. Blankenship, C.L. Van Dover, T.A. Martinson, F.G. Plumley (2005). An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. Proc. Natl Acad. Sci. USA 102 (26), 9306–9310.

Boone, D.R. and R.W. Castenholz (eds.), (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 1 The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria. Springer-Verlag, New York. pp. 465-466.

Bryant, D.A., N.U. Frigaard (2006). Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. Trends Microbiol. 14 (11), 488-496.

Cavalier-Smith, T (2006). Rooting the tree of life by transition analyses. Biology Direct 1 (19): 19.

Eichorst, S.A., J.A. Breznak, T.M. Schmidt (2007). Isolation and characterization of soil bacteria that define Terriglobus gen. nov., in the phylum Acidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 73 (8), 2708–2717.

Garrity, G.M. and D.R. Boone (ed.) (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria (2nd ed.). Springer.

Griffiths, E. and R.S. Gupta (2007). Identification of signature proteins that are distinctive of the Deinococcus-Thermus phylum. Int. Microbiol. 10 (3), 201–208.

Heller, H., Craig; Orians, H. Gordan; Purves, K. William; D. Sadava (2004). LIFE: The Science of Biology (7th ed.). Sinauer Associates, Inc.

Herrero, A and E. Flores (ed.). (2008). The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution (1st ed.). Caister Academic Press.

Holt, J.G. (ed.) (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.). Williams and Wilkins.

Hopwood, D.A. (2007). Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. Oxford Univ. Press.

Kämpfer, P. (2006). The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria (Dworkin, M et al., eds.). Berlin: Springer. pp. 538–604.

Lee, R. E., Jr., Gareth J. Warren, L.V. Gusta (Ed.) (1995). Chapter 3, "Ecology of Ice Nucleation-Active Bacteria by Susan S. Hirano and Christen D. Upper. Biological Ice Nucleation and Its Applications. St. Paul, Minnesota: APS PRESS (The American Phytopathological Society). pp. 41–61.

Madigan, M.T. and J.M. Martinko (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th Ed. Pearson Prentice Hall.

McBride, A., D. Athanazio, M. Reis, A. Ko (2005). Leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 18 (5), 376–86.

Montgomery, L.; B. Flesher; D. Stahl (1988). Transfer of Bacteroides succinogenes (Hungate) to Fibrobacter gen. nov. as Fibrobacter succinogenes comb. nov. and description of Fibrobacter intestinalis sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 430–435.

Nachmankin, I.; C.M. Szymanski and J. Blaser (ed.) (2008). Campylobacter (3rd ed.). ASM Press. pp. 3–25.

Rendulic, S., P. Jagtap, A. Rosinus, M. Eppinger, C. Baar, C. Lanz, H. Keller, C. Lambert, K.J. Evans, A. Goesmann, F. Meyer, R.E. Sockett, S.C. Schuster (2004). A Predator Unmasked: Life Cycle of Bdellovibrio bacteriovorus from a Genomic Perspective. Sci. 303: 689–692.

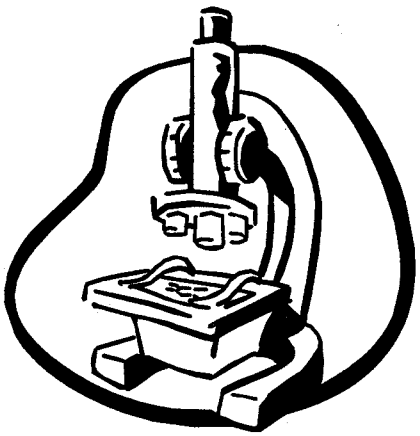
Ryan, K.J., C.G. Ray (ed.) (2004). Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 294-295.

Samuels, D.S.; J.D. Radolf (editors) (2010). Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis. Caister Academic Press.

Yassin, A.F., R.M. Kroppenstedt and W. Ludwig (2003). Corynebacterium glaucum sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53, 705-709.

Zhang, H., Y. Sekiguchi, S. Hanada, P. Hugenholtz, H. Kim, Y. Kamagata, K. Nakamura (2003). Gemmatimonas aurantiaca gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating microorganism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. Int J Syst Evol Microbiol 53 (Pt 4), 1155–1163.

Zhuang W., J. Tay, A. Maszenan, L. Krumholz, S. Tay (2003). Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. Lett. Appl. Microbiol. 36 (4), 251–257.



الفصل الخامس

الفطريات The Fungi

■ التنوع الميكروبى وتطبيقاته ■

يستخدم الميكروبيولوجيون مصطلح فطر fungus لوصف مجموعة من الكائنات الحية ذات النواة الحقيقية (أيوكاريوتية eucaryotes) ، الحاملة للجراثيم ، والخالية من الكلوروفيل achlorophyllous ؛ فهى كائنات غير ذاتية التغذية تستهلك الصور العضوية للكربون لتوفير الطاقة ، وتحصل على غذائها بالامتصاص ، وتتكاثر عادة جنسياً ولاجنسياً .

والتراكيب الجسدية somatic structures فى الفطريات وحيدة أو عديدة الخلايا خيطية متفرعة عادة ، ويعرف الخيط الواحد منها بالهيفا hypha ، وشبكة الهيفات بالميسيليوم mycelium ، وتتفرد الفطريات بأن بعض أنواعها كالخمائر yeasts تنمو فى صورة خلايا مفردة تتكاثر بالتبرعم budding والانقسام الثنائى binary fission ، وهناك مجموعة من الفطريات تتصف بظاهرة ثنائية التشكل dimorphic fungi حيث تنتقل بين طور الخميرة والطور الهيفى كاستجابة للظروف البيئية .

وللفطريات جدر خلوية صلبة تحتوى على لويفات دقيقة من كيتين chitin نصف بلورى مطمورة فى وسط من بيتا- جلوكان β-glucans (السليلوز) غير متبلور ، وتتفرد الفطريات أيضاً باحتوائها على هذه الجزيئات التركيبية معاً فى جدرها الخلوية، ومن ناحية أخرى هناك قلة من الفطريات تفتقر إلى الجدر الخلوية .

وتعتبر الفطريات من الكائنات الأرضية ، وذلك على الرغم من وجود قلة منها فى المياه العذبة والبحرية ، وتنتشر الفطريات فى كل أنحاء العالم ، ويسبب الكثير منها أمراض للنبات والحيوان ، إلا أن الفطريات تكون أيضاً علاقة نافعة مع الكائنات الأخرى ، كما هو الحال فى العلاقة التى تنشأ بين بعض الفطريات وغالبية جذور النباتات الوعائية (الميكوريزا mycorrhiza) .

تصنيف الفطريات :

تشير التقديرات إلى أن أعداد الأنواع الفطرية تتراوح بين ١٠٠٠٠٠ إلى ٢٥٠٠٠٠ نوع ، وفى الحقيقة فإن تصنيف الفطريات لم يحظى بنفس القدر من التطور الذى حظى به تصنيف البكتيريا ، كما أن بعض السلالات التى يشار لها بلفظة " جديد

new " تم وصفها من قبل تحت اسم مختلف .

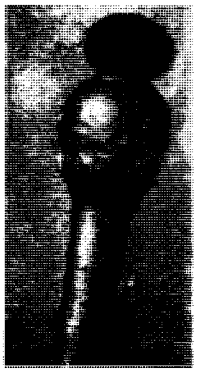
وتضم الفطريات إلى عدة قبائل اعتمد فى تصنيفها لفترات طويلة على أساس الاختلاف فى آليات التكاثر الجنسى ، وفى السنوات الأخيرة اعتمد التصنيف على الخصائص الجزيئية للفطريات وبصفة خاص تتابع الأحماض الأمينية فى الحامض النووى ر ن أ الريبوسومى rRNA .

الفطريات الزيجية :

تعرف الفطريات الزيجية أيضاً باسم الفطريات اللاقحية ، ولاتنتج هذه الفطريات أى خلايا ذات أسواط فى أى مرحلة بحياتها ، وجسمها عبارة عن هيفات متفرعة غير مقسمة بجدر باستثناء بعض الأفراد الزيجية الراقية التى قد تحتوى على جدر مستعرضة غير كاملة ، ومن ثم فجسمها الخضرى عبارة عن مدمج خلوى ، وتخلو الجدر الخلوية للفطريات الزيجية من السليلوز وتتألف من الكيتين وبعض السكريات العديدة .

وتبدو بعض الفطريات الزيجية فى شكلين dimorphic ، فأحياناً تكون وحيدة الخلية وأحياناً أخرى توجد على شكل هيفات عبارة عن مدمج نووى به الكثير من الأنوية الـ haploid ، وتظهر ظاهرة ثنائية التشكل بوضوح فى فطر ميوكر Mucor الممرض للإنسان إذ يكون وحيد الخلية تحت الظروف اللاهوائية ويكون ميسيليوم تحت الظروف الهوائية .

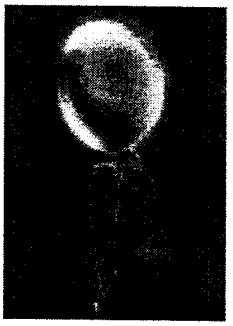
تعيش معظم الفطريات الزيجية على البقايا النباتية والحيوانية المتحللة فى التربة ، بينما تتطفل قلة منها على النباتات والحشرات والحيوانات الأخرى وحتى الإنسان ذاته ، وعادة تنتشر جراثيمها اللاجنسية بواسطة الرياح ، وتتكون مثل هذه الجراثيم فى حوافظ جرثومية فى قمة الهيفات الهوائية (شكل ٥-١) ، وينتج عن تكاثرها الجنسى زيجوتات zygotes سميكة الجدار وصلبة تسمى الجراثيم الزيجية zygospores تظل ساكنة عندما تكون البيئة غير ملائمة تماماً لنمو الفطر (شكل ٥-٢)



شكل ٥-١ . حافظة أسبوراتجية لفطر Pilobolus

أ

شكل ٥-٢أ . معلقات وجراثيم زيجية لفطر Rhizopus .



ب

شكل ٥-٢ب . معلقات وجراثيم زيجية لفطر Endogone .

ويعتبر فطر عفن الخبز ريزوبس نيجريكانز Rhizopus nigricans أشهر أفراد الفطريات الزيجية ، وينمو هذا الفطر على السطح الرطب للأغذية الغنية بالمواد الكربوهيدراتية مثل الخبز والفواكه والخضروات ، فعلى الخبز ، على سبيل المثال ، سرعان ما تغطى الهيفا السطح ، وتمتد الهيفات المعروفة بأشباه الجذور rhizoids فى الخبز وتمتص العناصر الغذائية ، وتصبح الهيفات الأخرى (المدادة stolons) قائمة ثم تنحنى فى المادة مكونة أشباه جذور جديدة ، وتظل الأخرى تنتج على أطرافها حوافظ لاجنسية مملؤة بجراثيم سوداء تعطى الفطر لونه المميز ، وتنبت كل جرثومة متحررة لتبدأ ميسيليوم جديد (شكل ٥-٣) .

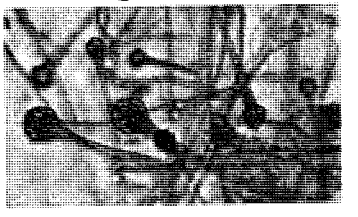
ويستخدم فطر ريزوبس نيجريكانز R. nigricans فى الصناعة فى التحويل الحيوى لهرمون البروجسترون إلى ١١ – ألفا – هيدروكسى بروجسترون وهى خطوة فى إنتاج مادة الكورتيزون . وينتج من هذا الفطر أيضاً حمض الفيوماريك الذى يتكون بالفطر تحت الظروف الهوائية ، وهو حمض ذو استخدامات متعددة فى مجالات الطب والأغذية والكيمياء .

وتساهم الفطريات الزيجية فى رفاهية الإنسان ففى أندونسيا يستخدم أحد أنواع الريزوبس وهو فطر ريزوبس أوليجوسبورس Rhizopus oligosporus (الذى يعرف أيضاً باسم R. microsporus var. oligosporus) فى إنتاج نوع من الطعام يعرف

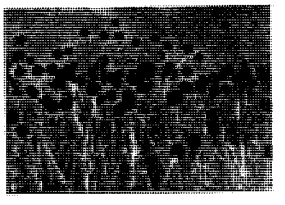
بالتمبة Temeph or tempe من فول الصويا المنزوع القشرة والمغلى (شكل ٥-٤) .

ويستخدم فطر ريزوبس نيجريكانز R. nigricans فى إنتاج حمض الستريك ، وفطر انتوموفثورا Entomophthora كطفيل هام للحشرات كالذباب المنزلى والمن (شكل ٥-٥) .

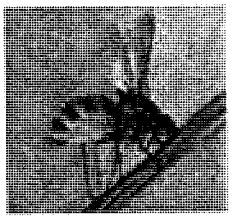
كذلك تستخدم أنواع من جنس ميوكر Mucor مع فول الصويا فى أسيا لصنع نوع من الرائب يسمى سوفو sufu ، ويستفاد من هذه الفطريات فى التجهيز التجارى لبعض المخدرات ، وفى عوامل التحكم فى التنفس ، والمشروبات الكحولية ، وعوامل تطرية اللحوم ، وإنتاج لون اصفر كبدائل للمارجارين والزبدة .



شكل ٥-٣ . الحوافظ الاسبورانجية لفطر عفن الخبز R. nigricans .



شكل ٥-٤ . الحوامل والحوافظ الاسبورانجية لفطر R. oligosporus .



شكل ٥-٥ . حافظة اسبورانجية لفطر Entomophthora تظهر من بطن الذبابة حيث يهاجمها .

الفطريات الأسكية :

تعرف أيضاً بالفطريات الزقية أو الكيسية sac fungi ، وتسمى كذلك بسبب تكوينها لكيس أسكى (زق) ascus (جمعها asci) أثناء تكاثرها الجنسى ، ويحتوى الكيس الأسكى على أعداد محددة من الجراثيم الأسكية ، فى العادة أربعة أو مضاعفاتها لأنها تنتج عن انقسام ميوزى ، وفى الغالب يحتوى الكيس على ٨ جراثيم فى صف طولى .

وتتكاثر الفطريات الأسكية لاجنسياً بتجزؤ الميسيليوم أو التبرعم أو إنتاج الجراثيم الكلاميدية chlamdospores أو الجراثيم الكونيدية conidia ، والأخيرة تحمل على حوامل كونيدية conidiophores لها تركيب متميز ، تنتج الجراثيم الكونيدية فى

تراكيب ميسليومية متخصصة تسمى الثمار الجرثومية sporocarp مثل الوعاء البكنيدى pycnidium والكويمة الكونيدية acervulus .

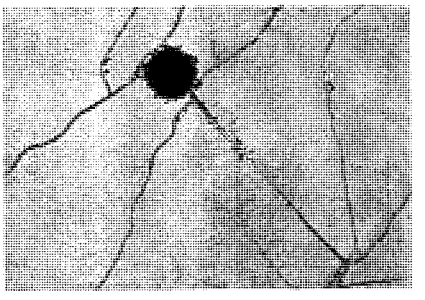
وتضم الفطريات الأسكية حوالى ١٥٠٠٠ نوع ، وهى هامة من الوجهة البيئية حيث توجد فى المياه العذبة والبحرية والبيئات الأرضية لأنها تحلل الكثير من المركبات العضوية الثابتة كيميائياً بما فيها اللجنين والسليلوز والكولاجين ، والكثير منها مألوف للإنسان فمعظم الأعفان الحمراء والبنية والخضراء المزرقة التى تسبب فساد الغذاء هى فطريات أسكية ، كذلك فإن فطريات البياض الدقيقى التى تهاجم أوراق النباتات والفطريات التى تسبب اللفحة chestnut والكثير من الخمائر والموريلات التى تؤكل والكمأة هى فطريات أسكية ، كذلك فإن فطر الخبز القرمزى Neurospora crassa الذى يعتبر أداة بحثية هامة فى الوراثة والكيمياء الحيوية هو فطر أسكى .

تتطفل كثير من الفطريات الأسكية على النباتات الراقية مثل فطر Claviceps purpurea الذى يتطفل على الراى والحشائش الأخرى مسبباً مرض الأرجوت .

ومن الشائع لدى العاملين فى مجال الوراثة استخدام فطر الخبز المعروف بالنيروسبورا Neurospora وخميرة الخباز Sacharromyces وهما من بين الفطريات الأسكية ، وهناك فطريات أخرى تستخدم بكثرة مثل Schizosaccharomyces و Ceratocystis ulmi المسبب لمرض الإلم الألمانى وفطر Erisyphe graminis المسبب للبياض الدقيقى حيث يتطفل على نباتات الغلال .

ويعتبر فطر أسبرجلس نيجر Aspergillus niger أكثر أنواع جنس أسبرجلس شيوعاً (شكل ٥-٦) ، ويسبب هذا النوع مرض العفن الأسود black mold فى بعض الفواكه والخضروات كالعنب والبصل والفول السودانى ، ويستخدم هذا النوع فى إنتاج حمض الستريك وحمض الجلوكونيك ، وكثير من الإنزيمات المفيدة مثل إنزيم الجلوكوأميليز المستخدم فى إنتاج الشراب الغنى فى سكر الفركتوز من الذرة ، وإنزيمات البكتينيز المستخدمة فى ترويق العصير والنبيذ ، وإنزيم الألفاجلاكتوسيديز المستخدم فى تكسير بعض السكريات المعقدة كالرافينوز والملييبوز والستاكيوز حيث يحلل الروابط ألفا ١-٦ ، وإنزيم الألفاجلاكتوسيديز مكون للدعم الغذائى البينو Beano وبعض المنتجات

الأخرى التى تنقص وتمنع امتلاء البطن بالغازات ، وإنزيم الجلوكوز أكسيديز الذى يستخدم فى تصميم المحسات الحيوية للجلوكوز glucose biosensors بسبب ارتباطه affinity الشديد بسكر الجلوكوز β–D-glucose . ويعتبر هذا الفطر عامل رئيسى فى تخمير الشاى فى دول جنوب شرق أسيا مثل الصين ، كما يستخدم هذا الفطر أيضاً فى البيوتكنولوجيا فى إنتاج سلالات variants محتوية على نظير مغناطيسى من الجزيئات الكبيرة البيولوجية لتحليل الرنين المغناطيسى النووى NMR .



شكل ٥–٦ . الرؤوس الكونيدية لفطر أسبرجلس نيجر .

ويستخدم فطر أسبرجلس إيتاكونيكس A. itaconicus وأسبرجلس تيريس A. terrus فى إنتاج حمض الإيتاكونيك و/أو ملح زيروف thereof من خلال تخمر الكربوهيدرات تحت الظروف الهوائية ، وحمض الإيتاكونيك الذى يعرف أيضاً باسم حمض ميثيلين سكسنيك عبارة عن مركب عضوى على صورة مسحوق بللورى أبيض يذوب فى الماء والإيثانول والأسيتون ، ويستخدم حمض الإيتاكونيك فى مجالات عديدة منها تجهيز ألياف الأكريليك والمطاط والألياف الزجاجية .

ومنذ مئات السنين يستعمل فطر أسبرجلس أوريزا A. oryzae فى اليابان فى إنتاج المشروب الكحولى Sake بتخمير مسحوق الأرز ، إلى جانب غيره من الأطعمة المخمرة ، وذلك بفضل النظم الإنزيمية التى ينتجها هذا الفطر .

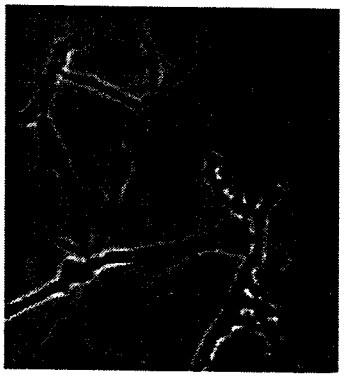
وفى جاوه يستخدم فطر أسبرجلس وينتياى A. wentii فى عمليات تصنيع فول الصويا لقدرته على تفكيك الأنسجة الصلبة بفول الصويا .

ويستخدم ميسيليوم فطر فيوزاريم انكارناتم Fusarium incarnatum الذى كان يعرف سلفاً باسم فيوزاريم سميتكتم F. semitectum كعلف جيد وغير ضار من الوجهة الصحية للحيوانات والمواشى ، ويمكن استخدام هذا الفطر ضمن الوجبات

الغذائية للإنسان وبدون أية أخطار أو مخاوف . كما يستخدم فطر Gibberella zeae فى إنتاج بروتين ذات جودة عالية لتغذية الإنسان .

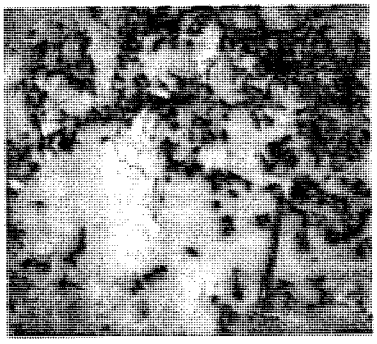
ويستخدم فطر جيبيريلا فيوجيكيوروى Gibberella fujikuroi الذى كان يعرف سابقاً فيوزاريم مونيليفورمى باسم Fusarium moniliforme فى إنتاج الجبريلينات التى تعتبر بمثابة ناتج أيضى خاص بهذا الفطر .

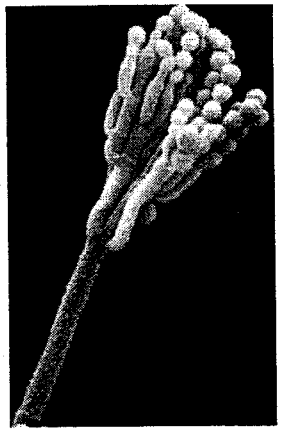
ويسبب فطر ميكروسبورم ايودويونياى Microsporum audouinii (شكل ٥-٧) مرض التنيا tinea الذى يصيب فروة الرأس ويسبب سقوط الشعر فى بقع مستديرة ، كما يصيب هذا المرض الماشية ، ويتغذى هذا الفطر على الكيراتين keratin تلك المادة الموجودة فى الطبقة الخارجية للجلد والشعر ، ويزدهر هذا الفطر أفضل على الجلد الدافئ الرطب . ومصطلح تنيا هو مصطلح عام يستخدم لوصف أمراض الجلد الفطرية mycoses ، أما مصطلح ringworm فهو أقل دقة لكن يعتبر بمثابة مرادف عادة .



شكل ٥-٧ . فطر Microsporum audouinii

ويستخدم فطر بنيسيليم روكفورتاى Penicillium roqueforti فى إنتاج الجبن الأزرق مثل الركفورت والستيلتون ، كما تنتج بعض السلالات مواد أيضية يمكن استخدامها كمضادات حيوية وكمركبات نكهة (شكل ٥-٨). ويستخدم فطر P. camemberti فى إنتاج جبن الكممبرت Camembert والبيرى Brie حيث تنمو مستعمرات الفطر لتكون قشرة بيضاء صلبة تعطى هذه الجبن طعمها المميز .





شكل ٥-٨ . جبن الستيلتون الأزرق به العروق الزرقاء للفطر (يمين) ، والفطر (شمال) .

وتستخدم بعض الفطريات الأسكية فى إنتاج العقاقير مثل المضادات الحيوية لاسيما البنسيلين وأشباهه من المضادات الحيوية والتى تنتج من فطر بنيسيليم كريسوجينم Penicillium chrysogenum الذى كان يعرف سلفاً باسم بنيسيليم نوتاتم P. notatum . كما تستخدم أنواع بنيسيليم P. griseofulvin وبنيسيليم P. nigricans فى إنتاج مادة griseofulvin (المعروفة أيضاً باسم Grisovin) وهى عقار مضاد لبعض الفطريات التى تصيب الجلد فى الإنسان والحيوان .

وتستخدم الأجسام الحجرية sclerotia لفطر كلافيسبز بربريا Claviceps purpurea والتى تتكون فى مبايض أزهار نبات الجاودار rye فى الأغراض الطبية ، حيث يستخرج منها عقار فعال لإحداث الإجهاض ، كما يستعمل فى وقف النزيف أثناء الولادة ، ولذلك فإن شركات الأدوية تولى تنمية هذا الفطر على المستوى الصناعى نفس القدر تقريباً مثل ما لأنواع البنسيليم المستعملة فى إنتاج البنسلين. ويرجع مرض الإرجوت ergot فى الجاودار إلى الغزل الفطرى لفطر كلافيسبز بربريا C. Purpurea المتطفل على النبات ، وتسبب الأجسام الحجرية نوع من التسمم يسمى ergotism يصيب الحيوانات والإنسان ، ويرجع ذلك إلى ماتحتويه من أشباه القلويات السامة poisonous alkaloids ، وتتسمم الماشية أثناء رعيها للنجيليات التى تحمل الأجسام الحجرية ، وكثيراً ماتحدث وفيات بسبب التسمم الإرجوتى فى البلدان التى يعتمد أهلها على الجاودار فى صناعة الخبز .

وتعتبر فطريات المورشيلا Morels والكمأة Truffles من فطريات عيش الغراب المأكولة والغالية الثمن جداً ، وتتعايش هذه الفطريات الأسكية مع جذور بعض الأشجار فى تبادل للمنفعة ، وتظهر ثمار المورشيلا فوق سطح الأرض epigeal فى حين تتكون الكمأة تحت الأرض hypogenal .

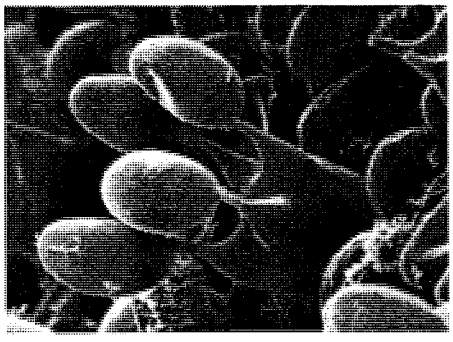
ويستخدم الفطر الأسكى أشبيا جوسوبياى Ashbya gossypii المعروف أيضاً باسم ايرموثيسيم جوسوبياى Eremothecium gossypii والشبيه بالخمائر إلا أنه ينمو بشكل خيطى فى إنتاج فيتامين الريبوفلافين riboflavin المعروف أيضاً بفيتامين ب٢ B_2 والذى يحمى جراثيم الفطر من الضوء فوق البنفسجى ، ومازالت كثير من السلالات المعدلة وراثياً من هذا الفطر تستخدم من قبل المصنعين فى إنتاج هذا الفيتامين الهام .

وهناك حوالى أربعين نوع تم التعرف عليها من أفراد جنس سكاروميسيز Saccharomyces ، لعل أهمها فائدة سلالات النوع سكاروميسيز سيرفيزيا S. cerevisiae ، الذى يستخدم منذ القدم فى صناعة الخبز وإنتاج الكحول ، وتنمو هذه السلالات على سطح العنب والنباتات الأخرى الغنية بالسكر كالنخيل .

الفطريات الباذيدية :

تعرف أيضاً بالفطريات الهراوية والصولجانية ، وتسمى بالبازيدية لتكوينها لحامل أو لقاعدة صغيرة (بازيديم basidium) ، يحمل عدد محدود من جراثيم جنسية (جراثيم بازيدية basidiospores) (شكل ٥-٩) ، فى العادة يكون عددها أربعة جراثيم تتكون نتيجة اتحاد نووى ثم انقسام ميوزى بالفروع الطرفية للهيفات ثنائية النوايات ، تكون هيفات الفطريات البازيدية الثنائية النوايات وصلات كلابية لها علاقة بانقسام النواة ، وتحتوى الجدر المستعرضة بين خلايا الهيفات على ثقب مميز بحافة غليظة تشبه الشفة تنمو فوقه الشبكة الإندوبلازمية على شكل غطاء فيظهر الثقب أثناء الفحص المجهرى على هيئة فوهة برطمان ، ومن أمثلتها فطريات الكرات النافخة وعيش الغراب وعش الطائر .

وتضم الفطريات البازيدية فطريات عيش الغراب التى تعتبر بمثابة غذاء ودواء (شكل ٥-١٠) ، ويعتبر جنس البليروتس Pleurotus من فطريات عيش الغراب الخيشومية التى تضم أحد أهم فطريات عيش الغراب المأكولة حول العالم وهو عيش غراب الأويستر Oyster mushroom ، وهو من فطريات عيش الغراب التى تجود زراعتها فى مصر .



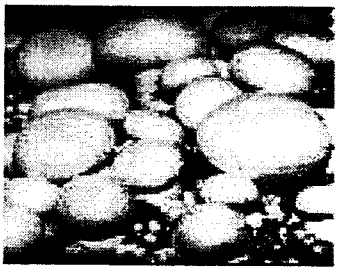
شكل ٥-٩ . نهاية البازيديم بجراثيمه البازيدية الأربعة كل واحدة متصلة بنهاية الستريجما .

كذلك يحتوى جنس الأجاريكس Agaricus على حوالى ٣٠٠ نوع من أفراد عيش الغراب المأكولة والسامة ، منها أكثر أنواع عيش الغراب المعروفة اليوم حول العالم وهى عيش الغراب العادى A. bisporus وعيش غراب الحقل A. campestris .

شكل ٥-١٠أ . فطر عيش غراب الأويستر .

شكل ٥-١٠ب . فطر عيش الغراب العادى .

شكل ٥-١٠ج . فطر عيش غراب القش .



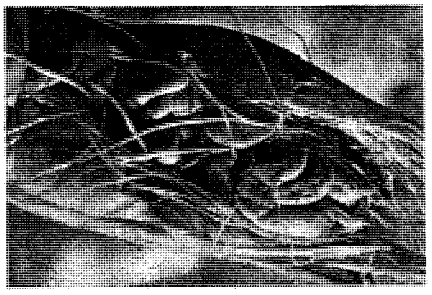
شكل ٥-١٠د . فطر عيش غراب الشامبنيون

الأصداء والتفحمات Urediniomycetes and Ustilaginomycetes :

تشمل فطريات هامة تسبب الأصداء والتفحمات للغلال بصفة خاصة ، كما يسبب بعضها أمراض للإنسان ، وعلى خلاف الفطريات الباذيدية لا تكون فطريات الأصداء والتفحمات ثمار باذيدية كبيرة ، وبدلاً من ذلك توجد أجسام باذيدية صغيرة تنشأ من هيفات على سطح النبات العائل ، وتنمو الهيفات بداخل أو خارج خلايا النسيج النباتى .

ويسبب فطر يستيلاجو مايدس Ustilago maydis مرض التفحم العادى فى نباتات الذرة الشامية Corn smut (شكل ٥-١١) .

ويندرج فطر يستيلاجو مايدس U. maydis ضمن الفطريات المأكولة أيضاً ، إذ يتناول هنود الأزتيكس Aztecs بوسط أمريكا وأهل المكسيك كيزان الذرة المتفحمة ، وتباع كيزان الذرة ذات الثآليل التفحمية على صورة طازجة أو معلبة تحت المسمى التجارى الكمأة المكسيكية Mexican truffles أو عيش غراب الذرة الشامية Maize Mushroom ، وذلك على الرغم من أن فطر التفحم ليست له أى علاقة بفطريات عيش الغراب ، ولكيزان الذرة المتفحمة قيمة غذائية عالية وطعم جذاب ، وترجع قيمتها الغذائية لمحتواها من الأحماض الأمينية الحرة التى يبلغ عددها بها ١٦ حامض أمينى ، وتجنب التغذية على الكيزان المتفحمة الإمساك والتهاب الجهاز الهضمى وسوء التغذية الناتج عن سوء عملية الهضم .

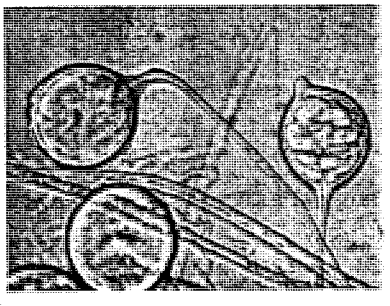


شكل ٥-١١ . فطر Ustilago maydis المسبب للتفحم العادى فى الذرة الشامية .

الجلوميروميكوتا Glomeromycota :

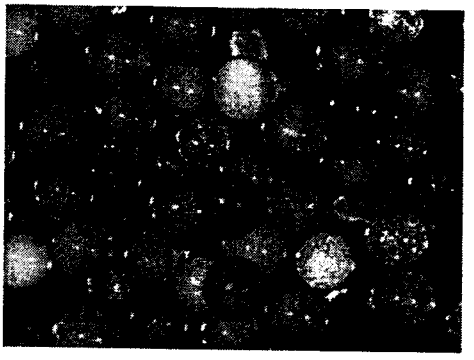
تتألف كلمة جلوميروميكوتا من كلمتين جلوميرو وتعنى جذر وميكوتا وتعنى فطر ، والكلمة فى مجملها تعنى الفطريات الجذرية أى الميكوريزا mycorrhiza ، وقد سميت هذه المجموعة على اسم جنسها الشهير جلومس Glomus ، وهو أحد فطريات الميكوريزا ، وتباع الكثير من أنواع الجنس كلقاحات سمادية تجارية تضاف للتربة الزراعية (شكل ٥-١٢) .

وتضم هذه المجموعة الفطرية حوالى ٢٠٠ نوع تم توصيفها بالفعل على أساس الشكل المظهرى للجراثيم (شكل ٥-١٣) وتتابع الحامض النووى د ن أ ، وقد اعتبرها البعض فطريات زيجية ، ولها أهمية بيئية واقتصادية كبيرة لأن معظمها فطريات ميكوريزا داخلية تعيش متكافلة مع النباتات الوعائية ، تكون فطريات الميكوريزا علاقة هامة مع الكثير من جذور النباتات ، وتعتبر هذه العلاقة التكافلية بمثابة علاقة تعاونية mutualistic حيث يستفيد كل من النبات العائل والفطر من الآخر ، إذ يساعد الفطر فى وقاية عائله من الإجهاد كما يوصل المواد الغذائية من التربة إلى النبات ، والذى يمد الفطر فى المقابل بالكربوهيدرات .



شكل ٥-١٢ . أسبورانجيا جنس جلومس .

ومن المعروف عن فطريات جلوميروميكوتا Glomeromycota أنها تتكاثر لاجنسياً فقط ، تنتج الجراثيم وتنبت عندما تلامس جذور النبات العائل المناسب ، تتكون أعضاء التصاق appressoria وتكون الهيفا النامية علاقة تكافل جديدة ، يحدث التكاثر أيضاً بالتجزؤ واستيطان الهيفات من التربة أو النبات الرقيق .



شكل ٥-١٣ . جراثيم فطر الميكوريزا Scutellospora castanea قطرها حوالى ٢٢٠ ميكرون .

وتنجح النباتات المحتوية على فطريات الميكوريزا بصفة خاصة فى الأراضى غير الخصبة ، وقد تمتد الشبكة المسيليومية لطول حوالى ٢٠,٠٠٠ كيلو متر (حوالى ١٢,٤٠٠ ميل) فى المتر المكعب الواحد من التربة ، ويمتص هذا الميسيليوم المكثف المواد الغذائية غير العضوية من التربة ، وبصفة خاصة عنصر الفوسفور ، من مساحة كبيرة من التربة حيث يمد النبات بهذه العناصر الغذائية ، وذلك فى مقابل الكربوهيدرات التى يحصل عليها الفطر من النبات .

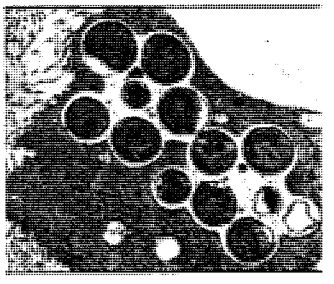
ومن الضرورى فى بعض الأحيان وجود علاقة بين فطريات الميكوريزا والنباتات من أجل تطور طرفى العلاقة بشكل معتاد ، وتساعد فطريات الميكوريزا فى مكافحة الآفات مثل النيماتودا والفطريات التى تسبب أمراض للنبات ، كما تحسن الميكوريزا من التنوع الحيوى النباتى .

الميكروسبوريديميكوتا Microsporidimycota :

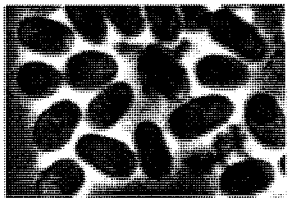
تتألف كلمة ميكروسبوريديميكوتا من ثلاثة كلمات من أصول إغريقية هى ميكرو ومعناها صغير وسبوريدى ومعناها جرثومة وميكوتا ومعناها فطر ، وتعنى إنتاج الكثير من الجراثيم متناهية الصغر بداخل الخلايا المصابة (شكل ٥-١٤) ،

وجدير بالذكر أن جنس ميكروسبورا Microspora يتبع الطحالب الخضراء ، فى حين اشتقت كلمة ميكروسبوريديا من تسمية حيوانية حينما كانت هذه الكائنات تتبع البروتوزا .

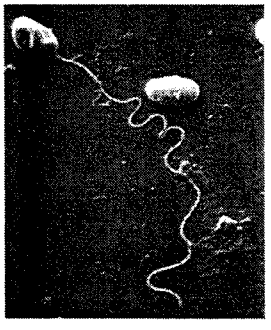
ويشير التاريخ التصنيفى للميكروسبوريديا من بين كل الفطريات عدم استقرار الكثيرين على وضعها التصنيفى ، فقد اتبعت الميكروسبوريديا للبروتوزوا ، ثم للبروتستا protists فى وقت ما ، ومازال البعض يضعها مع البروتستا ، إلا أن التحليل الجزيئى للحامض النووى ر ن أ الريبوسومى rRNA وللبروتينات المتخصصة مثل ألفا وبيتا تيوبيولين α- β-tubulin and أظهر أنها ذات قرابة وثيقة بالفطريات ولذلك وضعت فى عام ٢٠٠٢ مع الفطريات الزيجية ، إلا أنها وعلى خلاف الفطريات تفتقر إلى الميتوكوندريا والبيروكسيسومات والسنتيرولات ، ونظراً لتعديل التركيب التقسيمى للفطريات الزيجية بسبب طبيعتها paraphyletic فقد وضعت هذه المجموعة فى شعبة مستقلة .



شكل ٥-١٤ أ . جراثيم فطر Chytridiopsis تتطور داخل نواة العائل .



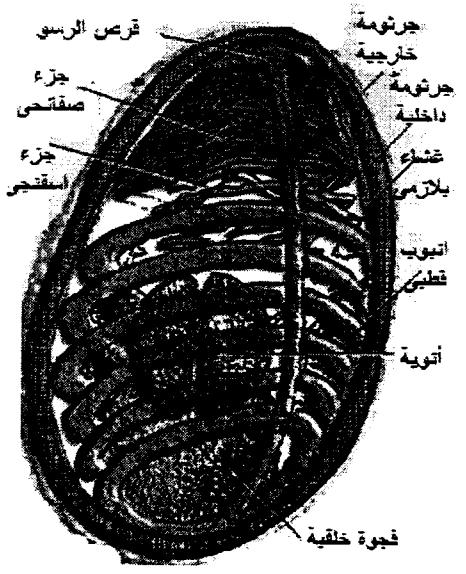
شكل ٥-١٤ ب . جراثيم حية لفطر Glugea الذى يهاجم الأسماك .



شكل ٥-١٤ ج . جرثومة فطر نوزيما Nosema الذى يصيب نحل العسل .

والميكروسبوريديا طفيليات إجبارية بداخل خلايا الحيوان والبروتسيتا ، تصيب الحشرات والأسماك والإنسان ، وبصفة خاصة مرضى الإيدز ، ومن أنواعها الممرضة للإنسان النوع Enterocystozoon bieneusi الذى يسبب الإسهال والالتهاب الرئوى والنوع Encephaolitozoon cuniculi الذى يسبب مرض للكلى .

وللميكروسبوريديا شكل ظاهرى فريد بين الأيوكاريوتات ، وتوجد جراثيم صغيرة (١-٤٠ ميكرون) محتفظة بحيويتها خارج العائل ، وتختلف أشكال هذه الجراثيم على حسب النوع ، وتحث خلايا العائل إنبات الجراثيم حيث ينتج عن ذلك أنبوبة قطبية polar tube أو خيط (شكل ٥-١٥) ، تحقن الأنبوبة القطبية بقوة كافية لتثقب غشاء خلية العائل ، والذى يسمح للطفيل بالدخول ، وبمجرد دخول الميكروسبوريديا بداخل خلية العائل فإنها تمر بدورة تطورية تختلف من نوع لآخر ، وفى النهاية تسيطر على خلية العائل ، وفى السنوات الأخيرة يحاول البعض استخدام الميكروسبوريديا كعوامل مكافحة حيوية للقضاء على الحشرات الحاملة للميكروبات الممرضة .



شكل ٥-١٥ . التركيب الفريد للميكروسبوريديا .

الخمائر Yeasts :

هى مجموعة كبيرة من الفطريات وحيدة الخلية مجهرية ، تصل أنواعها التى تم تعريفها إلى حوالى ١٥٠٠ نوع ، وتوجد الخمائر عادة كخلايا مفردة ، ولا يتكون التركيب الجسدى الدائم عديد الخلايا المتفرع (الغزل الفطرى mycelium) .

وخلية الخميرة قد تكون كروية أو بيضاوية أو أسطوانية أو غير ذلك من الأشكال ، وتتكاثر الخمائر جنسياً ولا جنسياً ، ويتم التناسل اللاجنسى بالتبرعم والانقسام الثنائى البسيط والتجرثم .

وتنمو الخمائر فى مستعمرات colonies على البيئات الصلبة تشبه إلى حد كبير مستعمرات البكتيريا ، أما فى أوساط النمو السائلة فتتميز الخمائر إلى مايلى :

١- خمائر غشائية Film-forming yeasts :

وهى تنمو على السطح مكونة غشاء ، وتقوم هذه الخمائر بعملية أكسدة الأحماض العضوية والسكريات والكحولات .

٢- خمائر القمة Top yeasts :

وهى تتجمع فى كتل clumps تطفو فوق سطح السائل .

٣- خمائر قاعية Bottom yeasts :

وهى التى ترسب وتستقر فى قاع السائل المتخمر .

وتخمر كل من خمائر القمة والخمائر القاعية المواد السكرية منتجة غاز ثانى أكسيد الكربون والكحول .

وتنتشر الخمائر فى الطبيعة انتشاراً واسعاً ، وتفضل النمو فى الأوساط الحامضية كالأغذية الحامضية السكرية ، وفى منتجات الألبان خصوصاً القشدة والألبان المتخمرة ، وعلى أسطح الفواكه وفى عصيرها .

وتعتبر الخميرة أكثر أشكال الفطريات استخداماً من قبل الإنسان ، ولذلك ينتج منها سنوياً آلاف الأطنان ، حيث يستفاد من النواتج الأيضية لأيض الخمائر من قبل الإنسان فى صناعات الخبز وإنتاج البيرة بأنواعها المختلفة والنبيذ وكثير من المشروبات الكحولية الأخرى والإنزيمات .

كما تنتج خميرة الخباز سكارواميسيز سيرفيزيا Saccharomyces cerevisiae (شكل ٥-١٦) بكميات كبيرة للاستخدام فى صناعة الخبز ، حيث يتولد عن أيض الخميرة على نشا الدقيق نتيجة التنفس غاز ثانى أكسيد الكربون الذى يؤدى وجوده فى

العجين الغنى بالجلوتين gluten إلى رفع الخبز .

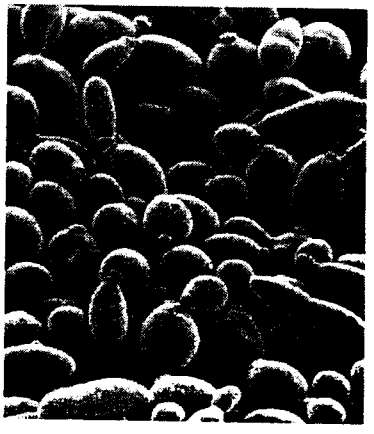
وتعتبر الخميرة مصدر غنى بالكثير من الفيتامينات مثل مجموعة ب B complex .

وتدخل خميرة سكارواميسيس بولارديای Saccharomyces boulardii ضمن ال Probiotics للحفاظ على الفلورا الطبيعية للأمعاء ، وتقلل هذه الخميرة من أعراض الإسهال عند الأطفال .

وتنمى الخمائر التى تنمو على الهيدروكربونات والميثانول كغذاء شهى لإنتاج البروتين ، وتنتج خمائر العلف تورولوبسيز Tourulopsis وكانديدا Candida بإنمائها على المولاس أو سائل الكبريتيت والأخير ناتج جانبى لصناعة الورق . وتباع الخميرة التى يتم الحصول عليها كناتج جانبى فى عملية التخمر الكحولى alcohol fermentation كعلف للحيوان .

وقد وجدت الخمائر فى السنوات الأخيرة طريقها إلى العلاج الحيوى حيث استخدمت خميرة Yarrowia lipolytica فى التخلص من زيت النخيل ، والمواد المتفجرة ، والهيدروكربونات والألكانات مثل الدهون والزيوت والأحماض الدهنية .

وتستخدم بعض أنواع الخمائر فى تخمير حبوب الكاكاو حيث تكون الحبوب مغطاة بطبقة هلامية يمكن التخلص منها بواسطة عملية التخمير .



شكل ٥-١٦ . خميرة الخباز

ولا تقل الدراسات التصنيفية فى حالة الخمائر أهمية عنها فى حالة البكتيريا ، وتصنف الخمائر على أساس :

١- المظهر المجهرى للخلايا .

٢- أسلوب التكاثر اللاجنسى .

٣- الخصائص الفسيولوجية مثل قدراتها الأيضية واحتياجاتها الغذائية .

٤- الخصائص البيوكيماوية مثل كيمياء الجدار الخلوى ونوع اليوبيكينون فى سلسلة نقل الإلكترون .

تساعد الخصائص الفسيولوجية للخمائر فى اختيار الخمائر الملائمة للتطبيقات العملية ، وتشمل الخصائص الفسيولوجية التى يمكن استخدامها فى التمييز بين الخمائر المختلفة مايلى :

١- أنواع الكربوهيدرات التى يستخدمها الميكروب كمصدر للكربون والطاقة تحت الظروف الهوائية والشبه هوائية .

٢- القدرة النسبية على النمو فى وجود ٥٠-٦٠% جلوكوز أو ١٠% أو ١٠% كلوريد صوديوم + ٥% جلوكوز ، وتعتبر هذه القدرة مقياس لتحمل الأسموزية osmotolerance .

٣- القدرة النسبية لتحليل واستعمال الليبيدات .

وتختلف الخمائر عن البكتيريا فى نموها عند تركيز الأس الهيدروجينى الأكثر انخفاضاً عن القيم المثالية لمعظم البكتيريا ، وعدم حساسيتها للمضادات الحيوية التى تثبط نمو البكتيريا ، وعليه يمكن حفظ مزارع الخمائر دون تلوث من قبل البكتيريا السريعة النمو ، وبسبب كبر حجم خلايا الخميرة يمكن حصادها بسهولة وبتكلفة أقل عن البكتيريا ، ولاتسبب الخمائر الصناعية المستخدمة فى الوقت الراهن أى مشاكل صحية ، ومع كل هذه المميزات ومع التقدم الحادث فى الهندسة الوراثية فهناك توسع فى استخدام الخمائر حالياً فى كثير من التطبيقات .

المراجع :

Bidartondo, M.I., D. Redecker, I. Hijri, A. Wiemken, T.D. Bruns, L. Dominguez, A. Sersic, J.R. Leake, D.J. Read (2002). Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. Nature 419, 389–392.

Canning, E.U and J. Vavra (2000). Phylum Microsporida. In: Lee, J.L., G.F. Leedale and P. Bradbury, eds. An Illustrated Guide to the Protozoa, Organisms traditionally referred to as Protozoa, or newly discovered groups, second edition. Society of Protozoologists. Lawerence, Kansas. pp. 39-126.

Corradi, N., G. Kuhn, I.R. Sanders (2004). Monophyly of beta-tubulin and H+-ATPase gene variants in Glomus intraradices: consequences for molecular evolutionary studies of AM fungal genes. Fungal Genetics and Biol. 41, 262-273.

de Hoog, G.S., J. Guarro, J. Gene, and M.J. Figueras (2000). Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Deacon, J.W. (2005). Fungal Biology (4th ed). Malden, MA: Blackwell Publishers.

Hall, I.R., P.K. Buchanan (2003). Edible and poisonous mushrooms of the world. Timber Press.

Harper, P., H. Matsuzaki, M. Kuwata, and C. Pearce (2006). The Book of Sake: A Connoisseurs Guide. Tokyo: Kodansha International.

Helgason, T., I.J. Watson and J.P.W. Young (2003). Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. FEMS Microbiol. Lett. 229, 127-132.

Kurtzman, C.P., J.W. Fell (2006). Yeast Systematics and Phylogeny—Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology, Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook, Springer.

Ligon, B (2004). Penicillin: its discovery and early development. Semin Pediatr Infect Dis 15 (1): 52–7.

Lutzoni, F. F. Kauff, C.J. Cox, D. McLaughlin, G. Celio, B. Dentinger,

M. Padamsee, D. Hibbett, T.Y. James, E. Baloch, M. Grube, V. Reeb, V. Hofstetter, C. Schoch, A.E. Arnold, J. Miadlikowska, J. Spatafora, D. Johnson, S. Hambleton, M. Crockett, R. Shoemaker, G, Sung, R. Lucking, T. Lumbsch, K. O'Donnell, M. Binder, P. Diederich, D. Ertz, C. Gueidan, K. Hansen, R.C. Harris, K. Hosaka, Y.W. Lim, B. Matheny, H Nishida, D. Pfister, J. Rogers, A. Rossman, I. Schmitt, H. Sipman, J. Stone, J. Sugiyama, R, Yahr, R, Vilgalys (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. American J. of Botany. 91(10), 1446-1480.

Ragan, M.A., C.A. Murphy, and T.G. Rand (2003). Are Ichthyosporea animals or fungi? Baysean phylogenetic analysis of elongation factor 1α of Ichthyophonus irregularis. Molecular Phylogenetics and Evolution. 29, 550-562.

Redeker, D. (2002). Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil 244, 67–73.

Samson, R.A., J. Houbraken, R.C. Summerbell, B. Flannigan, J.D. Miller (2001). Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: Microorganisms in Home and Indoor Work Environments. New York: Taylor & Francis. pp. 287–292. ISBN.

Schüßler, A. (2002). Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of Geosiphon pyriformis and arbuscular mycorrhizal fungi. Plant and Soil 224: 75–83.

Schüßler, A., D. Schwarzott and C. Walker. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. Mycological Res. 105(12), 1413-1421.

Schuster, E., N. Dunn-Coleman, J.C. Frisvad, P.W. Van Dijck (2002). On the safety of Aspergillus niger--a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59 (4-5), 426–435.

Staiano, Maria, P. Bazzicalupo, M. Rossi, and S. D'Auria (2005). Glucose biosensors as models for the development of advanced protein-based biosensors. Molecular BioSystems 1, 354-362.

Steinbach, W.J., D.A. Stevens (2003). Review of newer antifungal and immunomodulatory strategies for invasive aspergillosis. Clin Infect Dis. 37:S157-S187.

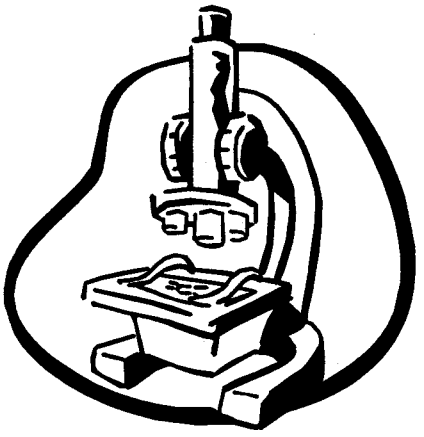
Sutton, D.A., A.W. Fothergill, and M.G. Rinaldi (ed.) (1998). Guide to Clinically Significant Fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Tanabe, Y., M. Saikawa, M.M. Watanabe, J. Sugiyama (2004). Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 and RPB-1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. Molecular Phylogenetics and Evolution. 30:438-449.

Tudge, C. (2000). The Variety of Life, A Survey and a Celebration of all the Creatures That Have Ever Lived. Oxford University Press. New York.

White, M.M., T.Y. James, K. O'Donnell, M.J. Cafaro, Y. Tanabe, and J. Sugiyama (2006). Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. Mycologia. 98(6), 872-881.

Wright, S.F. (2005). Management of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In Roots and Soil Management: Interactions between roots and the soil. Ed. Zobel, R.W., Wright, S.F. USA: American Soc. Agronomy. Pp 183-197.



الفصل السادس

التنوع الميكروبى
كمستودع غنى بالإنزيمات

■ التنوع الميكروبى وتطبيقاته ■

توجد الكائنات الحية الدقيقة فى كل الأوساط البيئية تقريباً حتى فى الأوساط الشديدة الحرارة والحموضة والملوحة ، حيث تمنحها نظمها الإنزيمية المتعددة ومساراتها الأيضية المرنة المقدرة على تناول المواد الغذائية المتوفرة والتغلب على درجة الحرارة وتركيز الملح وتركيز الأس الأيدروجينى فى مثل هذه الأوساط البيئية المتميزة .

وتمتلك الخلية الميكروبية المئات من الإنزيمات ، وهى جزيئات بروتينية كبيرة تعمل بمثابة عوامل مساعدة حيوية biological catalysts فى مثل هذه النظم البيولوجية، ويمكن لهذه العوامل عند استعمالها خارج الخلية فى التفاعلات بكميات صغيرة أن تزيد من سرعة التفاعلات الكيميائية بنحو 10^{8} إلى 10^{10} مرة (تصل إلى ١٠ بليون مرة) مرة دون أن تستهلك أو تتغير هى ذاتها تغيراً دائماً بعد التفاعل ، وتساعد مثل هذه المواد المساعدة فى زيادة سرعة التفاعلات الكيميائية دون أن تبدأ هى التفاعل .

ويستخلص الكثير من الإنزيمات بمعزل عن خلايا الميكروبات ليؤدى نفس الدور المنوط به فى الخلايا الحية ولكن بعيداً عنها in vitro ، وقد دفع ذلك بالإنزيمات المختلفة إلى استخدامات صناعية عديدة (جدول ٦-١) ، ومن ثم تجارة رائجة على المستوى العالمى (جدول ٦-٢) ، إذ ينتج سنوياً عشرات الأطنان من الإنزيمات الميكروبية مثل البروتييز البكتيرى والجلوكو أميليز والألفا أميليز والجلوكوز أيزوميريز والرنين الميكروبى والأميليز الفطرى والبكتينيز والبروتييز الفطرى للاستخدام فى مجالات التنظيف وإنتاج الشراب المُحلى وصناعات الجبن وغيرها من الصناعات الغذائية الهامة ، وهى إنزيمات مفيدة إذ تنتج بشكل اقتصادى فى تخمرات قصيرة وأوساط إنتاج غير مكلفة .

جدول ٦-١. الإنتاج العالمى لبعض الإنزيمات الميكروبية الهامة المستخدمة تجارياً .

الإنزيـــم	كمية الإنتاج (طن / سنة)	الإستخـــدام الرئيسى
البروتييز البكتيرى*	٥٥٠	فى التنظيف
الجلوكو أميليز	٣٥٠	إنتاج شراب الفركتوز
الألفا أميليز*	٢٣٠	تسكر النشا (أى تحويل النشا إلى جلوكوز) إنتاج شراب الفركتوز
الجلوكوز أيزوميريز	٧٠	تحويل الجلوكوز إلى فركتوز إنتاج شراب الفركتوز
الرنين الميكروبى	٢٦	صناعة الجبن
الأميليز الفطرى	٢٠	الصناعات الغذائية
البكتينيز	٢٠	الصناعات الغذائية
البروتييز الفطرى	١٥	الصناعات الغذائية

جدول ٦-٢ . المبيعات العالمية لبعض الإنزيمات الميكروبية التجارية .

الإنزيـــم	المبيعات (مليون دولار أمريكى)
البروتييـز القاعـدى	١٥٠
الأميليـز	١٠٠
البروتييـز المتعادل	٧٠
الرنيـن	٦٠
الأيزوميريـز	٤٥
البكتنيـز	٤٠
الليبيـز	٢٠

* تقدير عام ١٩٨٩ .

* بلغت المبيعات التجارية من الإنزيمات الميكروبية ٣٠٠ مليون دولار على حسب تقدير عام ١٩٨٠ .

والمصادر الميكروبية للإنزيمات أكثر ملائمة للأغراض الصناعية عن المصادر الحيوانية والنباتية بسبب انخفاض تكلفة عملية الإنتاج ، وقصر المدة اللازمـة لهـذه

العملية ، وإمكانية الإنتاج بشكل ضخم ، وسهولة تعديل وإعادة تصميم المصادر الميكروبية ، إلى جانب تفرد الكثير من الإنزيمات الميكروبية ببعض الخصائص الهامة المطلوبة لتوفير الكثير من منتجات التقنية الحيوية . ومن أهم النواحى التطبيقية التى تستخدم فيها الإنزيمات الميكروبية ما يلى :

إنتاج الإيثانول التخميرى :

تعامل نشا الذرة والبطاطس والشعير والكاسافا بإنزيمات التحليل المائى مثل البيتا أميليز والأميلوجلوكوسيديز من الميكروبات بغرض الإسالة والتسكر قبل تخميرها إلى كحول بواسطة الخميرة وغيرها من الميكروبات .

وفى عملية إنتاج المشروبات الكحولية كالبيرة يتم توظيف بعض الإنزيمات الميكروبية مثل البروتييز والألفا أميليز والبيتا جاوكانيز فى هذه العملية .

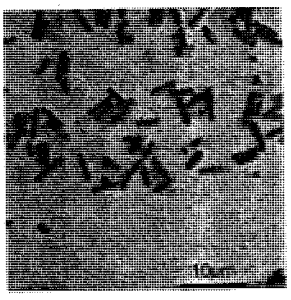
استخدام الإنزيمات فى الصناعات الغذائية :

تعتبر صناعة النشا أكبر صناعة تستخدم الإنزيمات الميكروبية ، ويرجع ذلك لنجاح عملية إنتاج شراب الجلوكوز glucose syrup القائمة على استخدام إنزيم ألفا أميليز α-amylase من بكتيريا باسيلس Bacillus والذى يحلل النشا إلى سكريات الأوليجو oligosaccharides التى تتحول بدورها لجلوكوز بواسطة إنزيم أميلو جلوكوسيديز amyloglucosidase من فطر أسبرجلس Aspergillus ، وكذلك يمكن تحويل الجلوكوز لفركتوز بتمريره خلال عمود يحتوى على إنزيم الجلوكوز أيزوميريز المسكن D-xylose isomerase ، ويتم الحصول على الإنزيم الأخير من أنواع بكتيريا ستربتوميسيس Streptomyces وبكتيريا باسيلس Bacillus .

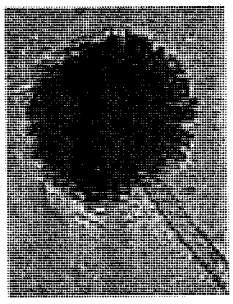
صناعة النشا :

تتضمن عملية التحويل الإنزيمى لبوليمرات النشا إلى دكسترينات وسكريات وتصنيع شراب الجلوكوز والفركتوز ثلاث عمليات هى الإسالة liquefaction والتسكر saccharification والتشابه isomerization .

وفى عملية الإسالة يتم تحويل النشا إلـــى مالتودكـــسترينات maltodextrins باستخدام إنزيم ألفا أميليز المتحصل عليه من بكتيريا باسيلس ليشينيفورميس Bacillus licheniformis (شكل ٦-١) .



شكل ٦-١. بكتيريا باسيلس ليشينيفورميس .



شكل ٦-٢ . فطر أسبرجلس نيجر .

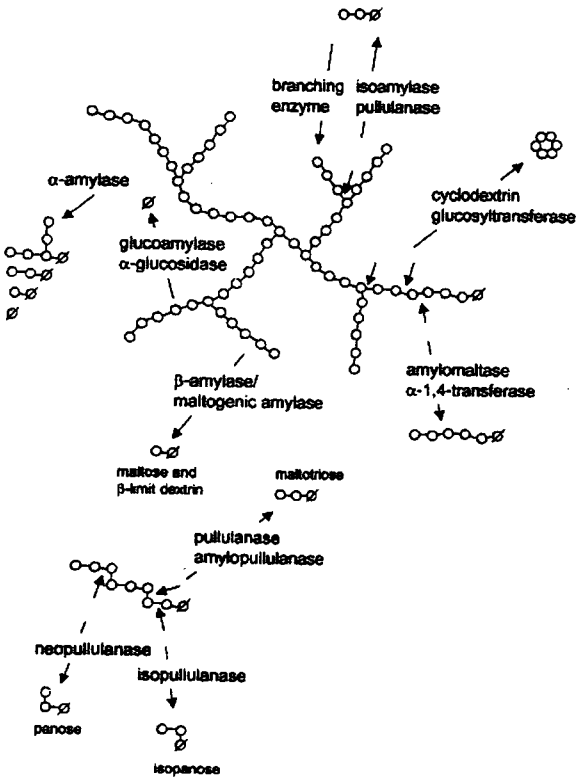
وفى خطوة التسكر يتم تحويل المالتودكسترينات إلى جلوكوز فى وجود إنزيمين ، الأول الجلوكواميليز المتحصل من فطر أسبرجلس نيجر Aspergillus niger (شكل ٦-٢) والذى يحرر جزيئات الجلوكوز من الأطراف غيـــر المختزلـــة لبـــوليمرات المالتودكسترينات ، والثانى البوليولانيز المتحصل عليه من أفـــراد جـــنس الباســـيلس Bacillus الذى يكمل التحليل فى سرعة ملحوظة .

أما فى عملية التشابه فيتم تحويل الجلوكوز إلى فركتوز ، ويتم تحفيـــز تفاعـــل تحويل الجلوكوز مباشرة إلى فركتوز بواسطة إنزيم الجلوكوز (الزيلوز) أيزوميريز الذى يتم الحصول عليه من بعض الأنواع البكتيرية من أفـــراد جـــنس فلافـــوبكتيريم Flavobacterium مثل النوع فلافـــوبكتيريم اربوريـــسنس F. arborescens وجـــنس ستربتوميـــسيس Streptomyces مثـــل النـــوع ستربتوميـــسيس فلافوجريـــسيس S. flavogriseus .

وفى العادة تجرى عمليات تحويل سكر الجلوكوز إلى فركتوز علـــى مـــستوى صناعى كبير فى تفاعلات متقطعة بمفاعلات حيوية ضخمة ذات مقلبـــات ، ونظـــراً لارتفاع سعر إنزيم الجلوكوز أيزوميريز يفضل استخدام الخلايا البكتيريـــة المـــسكنة immobilized bacterial cells فى هذا الصدد .

ويستخدم إنزيم الألفا أميليز المتحصل عليه من بكتيريا باسيلس ليشينيفورميز B. lichiniformis منذ عام١٩٧٣ فى تحليل الأميلوز والأميلوبكتين عشوائياً (شكل٦-٣) ، وهو إنزيم ثابت حرارياً يمكن استخدامه على درجة حرارة حتى ١١٠°م فى عملية إسالة النشا . كما يستخدم الألفا أميليز من بكتيريا باسيلس ستلس صنف اميلوليكويفاسينس B. subtilis var. amyloliquiefaciens ، وتنتج كميات كبيرة من إنزيم ألفا أميليز من باسيلس اميلوليكويفاسينس B. amyloliquefaciens ، ويتم تحسين إنتاج الإنزيم بوسائل شتى منها تطفير سلالات البكتيريا ، والحد من عملية التهوية فى المخمرات ، وزيادة مستوى غاز ثانى أكسيد الكربون .

وينتج إنزيم أميلوجلوكوسيديز Amyloglucosidase - وهو إنزيم خارجى - من بعض أنواع فطريات جنس الأسبرجلس Aspergillus وجنس الريزوبس Rhizopus .



شكل ٦-٣ . الهجوم الإنزيمى على جزء من جزئ الأميلوبكتين (جزيئات الجلوكوز على صورة دائرة ، والنهايات المختزلة على صورة دائرة بها خط) .

أما شراب المالتوز maltose syrups المستخدم فى صناعة المربات والحلويات والبيرة والخبز فيصنع باستخدام إنزيمات الألفا أميليز من الفطريات والميكروبات الأخرى مثل بكتيريات باسيلس ميجاتيريم B. megaterium وباسيلس سيركيولانس B. circulans وباسيلس سيريس B. cereus وباسيلس بوليميكسا B. polymyxa وأنواع من أجناس سيدوموناس Pseudomonas وستربتوميسيس Streptomyces ، ويتميز الإنزيم الميكروبى برخصه ووفرته بشكل كبير عن مثيله النباتى .

ومن الاستعمالات الأخرى الناجحة للإنزيمات المسكنة فى كثير من البلدان الأوروبية والولايات المتحدة الأمريكية واليابان استخدام إنزيم الجلوكوز أيزوميريز glucose isomerase على المستوى الصناعى فى إنتاج شراب الفركتوز بواسطة إحداث عملية تشابه ضوئى جزئى partial isomerisation للجلوكوز المتحصل عليه من النشا ، ويمكن استخدام إنزيم الجلوكوز أيزوميريز المسكن لأكثر من ١٠٠٠ ساعة متواصلة على درجات حرارة بين ٦٠ و ٦٥°م ، وصناعة إنتاج شراب الفركتوز من الصناعات الضخمة فى تلك البلدان وذلك للاحتياج إلى الشراب فى صناعات أخرى غذائية كثيرة ، ويبلغ حجم الإنتاج السنوى منه بواسطة الإنزيمات آلاف الأطنان ، ويعتبر استخدام الإنزيمات المسكنة فى هذه الصناعة هو أوسع مجال لاستخدام الإنزيمات المسكنة على الإطلاق ، وقد كان تاكى ساكى (١٩٦٦) أول من أستطاع إنتاج شراب ذات تركيز عالى من الفركتوز على المستوى التجارى باستعمال إنزيم الجلوكوز أيزوميريز ، ثم تلى ذلك إنتاج هذا الشراب بواسطة ثومبسون وآخرون (١٩٧٤) باستخدام إنزيم جلوكوز أيزوميريز يتم ربطه بمادة داى ايثيل امينو ايثيل سليلوز Diethylaminoethylcellulose (DEAE-cellulose) .

ولقد صادفت صناعة إنتاج شراب الفركتوز باستخدام الإنزيمات المسكنة نجاحاً كبيراً على المستويين الصناعى والتجارى لأسباب كثيرة منها :

- زيادة حلاوة سكر الفركتوز عن سكر الجلوكوز ، وهى خاصية ذات أهمية كبيرة من الناحية الاقتصادية .

- رخص الجلوكوز المتحصل عليه من النشا .
- احتواء شراب الفركتوز على كميات متساوية تقريباً من الجلوكوز والفركتوز .
- تميزه بأنه يشبه السكروز من الناحية الغذائية ، إلا أنه من المعتقد أن للسكروز بعض الضرر على الصحة ، وإن كان ذلك لايعنى أن الفركتوز أكثر أماناً من الناحية الصحية .

ويتم تحويل السكروز sucrose inversion عن طريق تحليله مائياً إلى السكر المحول بفعل إنزيم الأنفرتيز ، ويتألف ناتج التحليل الإنزيمى من مخلوط الجلوكوز والفركتوز بنسب متساوية ، وهذا المخلوط أحلى من السكروز ، ويستخدم فى المنتجات الغذائية والحلويات والكاندى لحفظ الرطوبة ومنع الجفاف ، ويستخدم السكر المحول فى إنتاج العسل الصناعى والمشروبات الكحولية والمربات لأن تبلوره أقل عن السكروز ، ويتم الحصول على إنزيمات الأنيولينيز من أفراد جنس الأسبرجلس Aspergillus ، وحالياً هناك مصادر متعددة للأنفرتيز من الخمائر مثل كليفيروميسيس فراجيليس Kluyveromyces fragilis وسكارومايسيس كارلسبيرجينسيز Saccharomyces carlsbergensis وسكارومايسيس سيرفيسيا S. cerevisiae .

وكذلك يستخدم إنزيم الألفا جلاكتوسيديز فى عملية تكرير السكر sugar refining مثل سكر البنجر ، وأفضل مصدر لهذا الإنزيم فطريات سيرسينيلا مسكارى Circinella muscari ، وابسيديا جريسسيولا Absidia griseola ، وأسبرجلس نيجر Aspergillus niger ، وبكتيريا باسيلس ستياروثرموفيلس Bacillus stearothermophillus ، وكذلك خميرة سكارومايسيس كارلسبيرجينسيز S. Carlsbergensis لتحليل الميليبيوز والرافينوز فى لبن فول الصويا والبذور الزيتية .

ويستخدم إنزيم الألفا أميليز فى عملية تكرير السكر أيضاً نظراً لوجود كميات من النشا فى قصب السكر ، ويمكن تحليل هذه الكميات قبل التبخير بواسطة إنزيم ألفا أميليز المتحصل عليه من بكتيريا باسيلس ليشينيفورميس B. licheniformis .

ويحلل إنزيم الدكسترانيز بوليمر الدكستران الذى تكونه بكتيريات جنس لوكونوستوك Leuconostoc أثناء صناعة السكر إلى أيزومالتوز وأيزومالتوترايوز ، ومن ثم تمنع الزيادة غير المرغوبة فى لزوجة عصير القصب والتى تجعل عملية الترويق والتبلور للسكروز بالتبخير صعبة ، وقد أقترح استخدام إنزيم الدكسترينيز كمكون ضمن محتويات معاجين الأسنان لمنع نخر الأسنان بإذابة الدكسترينات التى تنتجها بكتيريا الفم ولإنتاج الدكستران المستخدم كبدائل للدم .

ويتم الحصول على إنزيم الدكسترانيز الداخلى من عدد من الفطريات مثل بنيسيليم ليلاسينم Penicillium lilacinum وبنيسيليم فنيكيلوسم P. funiculosam وفيوزاريم مونوليفورمى Fusarium monoliformi ، والبكتيريات مثل كلبسيلا جيروجينيس Klebsiella jerogenes وفلافوبكتيريم Flavobacterium sp . أما الدكسترانيز الخارجى فيتم الحصول عله من بكتيريات باسيلس كواجيولانس B. coagulans وبكتيريا ارثروباكتر جلوبيفورميز Arthobacter globiformis .

وتعتبر بكتيريا كلبسيلا نيومونيا Klebsiella pneumonia المصدر التجارى لإنزيم البوليولانيز حيث تفرز جزء منه فى وسط نموها ويبقى جزء آخر مرتبط بالخلية ، وهناك مصادر أخرى لهذا الإنزيم تشمل أنواع من جنس الباسيلس Bacillus والنوع انتروباكتر ايروجينيز Enterobacter aerogenes ، ويعمل هذا الإنزيم على السلاسل الفرعية للأميلوبكتين فى النشا ، ومن أهم استخدامات هذا الإنزيم من الناحية التجارية استخدامه فى تصنيع المشروبات الكحولية .

ويكون إنزيم cyelodextrin-glucosyl transferase سيكلودكسترينات حلقية من النشا ، ويتم الحصول على هذا الإنزيم من بعض أنواع جنس باسيلس مثل باسيلس ماسيرانس Bacillus macerans وباسيلس ميجاتريم B. megaterium والنوع جيوباسيلس ستياروثرموفيلس Geobacillus stearothermophilus (الذى كان يعرف سلفاً باسم باسيلس ستياروثرموفيلس B. stearothermophilus) والذى تفرزه خارج خلاياها .

وينتج إنزيم السليوليز بكميات ضخمة من فطر تريكودرما فيردى Trichoderma viride ، ومن فطر عفن الخشب سبوروتريكم بلفيرولنتم Sporotrichum pulverulentum ، كما ينتج من الأنواع المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة مثل سبوروتريكم ثرموفيليك S. thermophilic وكاتوميم ثرموفيل Chaetomium thermophile وثرمومونوسبورا كرفاتاThermomonospora curvata ، وأنواع الكلوستيريديا Clostridia spp ، وأنواع الأنتروباكتر Enterobacter ، ولهذا الإنزيم تطبيقات متعددة طالما أن السليلوز أكثر المواد العضوية وفرة .

ويمثل وجود الإنزيمات الداخلية أساس للطرق التقليدية لصناعة المخبوزات ، حيث تحفز مثل هذه الإنزيمات التغيرات الطبيعية أثناء النمو والنضج والتخزين ، كما تؤدى هذه الإنزيمات إلى تسكير النشا قبل التخمر ، وتحليل الجلوتين gluten الذى يعتبر هام جداً فى الصفات الريولوجية rheological properties للعجين ، وتستخدم إنزيمات البروتييز من فطر أسبرجلس أوريزا Aspergillus oryzae بسبب ثباتها الحرارى المنخفض وتثبيطها أثناء الخبيز .

ويحدث التسكر بفعل الإنزيمات الداخلية ألف وبيتا أميليز التى تعمل معاً على النشا وتجعله متاحاً ، وتكون إنزيمات بيتا أميليز سكر المالتوز وتحد من الدكسترينات، وتكون إنزيمات ألفا أميليز جلوكوز ومالتوز وأوليجوسكريات منخفضة الوزن الجزيئى، ويتيح التأثير المركب لهذه الإنزيمات المالتوز لعمل إنزيم مالتيز الخميرة الذى يكون الجلوكوز ، والذى يمكن إذن استخدامه للتخمير وإنتاج الغاز ، والذى يجعل العمل على العجين أسهل لتحليل النشا وتغيير الصفات الريولوجية للعجين .

ويفضل استخدام إنزيم ألفا أميليز من فطر أسبرجلس أوريزا A. oryzae بصفة خاصة إذ يزيد نشاطه بارتفاع درجة الحرارة حتى يثبط على ٦٠°م .

وتستخدم إنزيمات الإندوببتيديز الثابتة الحرارة والمتحصل عليها من بكتيريا باسيلس ستلس Bacillus subtilis فى بعض التطبيقات مثل صناعة البسكويت للتحليل المكثف للجلوتين حتى يصبح العجين طيع بما فيه الكفاية لكى يسهل تشكيله .

ويستفاد من إنزيم الفيتيز من فطر أسبرجلس فيكم Aspergillus ficcum فى معاملة دقيق القمح للتخلص من حمض الفيتيك وغيره من العوامل الأخرى المضادة للتغذية .

المنظفات البيولوجية Biological detergents :

تستخدم كميات ضخمة من الإنزيمات الميكروبية فى المنظفات ، فيستخدم إنزيم البروتييز القاعدى (مثل المنتج الإنزيمى التجارى الستلزين subtilisin) وإنزيم الأميليز – وكلاهما يتم الحصول عليه من أفراد بكتيريات جنس باسيلس Bacillus – وإنزيم الليبيز ضمن مكونات المنظفات البيولوجية كمساحيق للغسيل .

ويستخدم إنزيم البروتييز القاعدى – مثل المنتج الإنزيمى التجارى الستلزين subtilisin الذى يتم الحصول عليه من أفراد بكتيريات جنس باسيلس Bacillus مثل النوع باسيلس ليشينيفورميز B. licheniformis على وجه الخصوص – ضمن مكونات المنظفات البيولوجية كمساحيق للغسيل اليدوى والآلى بصفة خاصة ، ويزيل إنزيم البروتييز البقع قبل وأثناء نقع الملابس ، حيث يحلل مائياً الروابط الببتيدية فى البقع البروتينية ، ويتم تداول البروتييز فى صورة مغلفة لتحاشى الحساسية التى قد يسببها للعاملين .

كذلك يستخدم إنزيم الأميليز من الأفراد البكتيرية لجنس باسيلس Bacillus أيضاً ضمن مكونات المنظفات البيولوجية كمساحيق الغسيل ، حيث يستخدم فى عملية الغسيل الآلى لإزالة البقع النشوية من الملابس .

وتستخدم إنزيمات الليبيز المنتجة من الفطر الزيجى ريزوبس أوروبزا Rhizopus oryzae والفطريات الأسكية أسبرجلس نيجر Aspergillus niger وأسبرجلس أوريزا A. oryzae فى المنظفات حيث تحلل روابط الإستر فى البقع الدهنية .

وعادة تتميز الإنزيمات الميكروبية المستخدمة فى المنظفات البيولوجية بما يلى :

١. الثبات الحرارى حتى ٧٠°م .

٢. المقاومة للدنترة denaturation التى تحدثها المنظفات غير الأيونية .
٣. احتفاظها بنشاط عالى فى مدى واسع من الظروف القاعدية (pH 8 – 11) .
٤. عدم احتياجها لأيونات معدنية لأداء نشاطها – لأن المنظفات تحتوى على عوامل مخلبية مثل الإيثيلين داى أمين تترا أسيتات ethylenediamine tetraacetate ، والترای بولى فوسفات tripolyphosphate ، والتى يؤدى وجودها إلى عدم تيسر الكثير من الأيونات المعدنية – .
٥. مقاومتها للعوامل المؤكسدة مثل الهيبوكلوريت hypochlorite والبربورات perborate والتى تستعمل كمواد تبييض bleaches فى عملية الغسيل .

وعلى الرغم من الخصائص الجيدة للمنتج الإنزيمى التجارى الستلزين التى تؤهلها للاستخدام فى المنظفات البيولوجية إلا أنه يعاب عليه تناقص نشاطه بشكل ملحوظ فى وجود البربورات perborate ، وحساسيته المفرطة للأكسدة بواسطة فوق أكسيد الأيدروجين المنطلق من البربورات فى درجات الحرارة الأعلى من ٦٠°م ، وحدوث نقص قد يصل إلى ٩٠% من النشاط الإنزيمى نتيجة أكسدة المثيونين المتاخم لسرين الموقع الفعال إلى السلفوكسيد sulfoxide .

وقد ساهمت تقنيات الهندسة الوراثية فى توفير مستحضرات إنزيمية تجارية من الستلزين شديدة الثبات للمواد المؤكسدة ، حيث أمكن حل مشكلة الهدم التأكسدى بتحوير تركيب الإنزيم عن طريق إحلال حامض أمينى آخر محل المثيونين ٢٢٢ بدون تحطيم النشاط الإنزيمى حيث أن المثيونين ٢٢٢ لا يدخل مباشرة فى أداء الإنزيم لفعله التحفيزى ، يؤدى إحلال الألانين محل المثيونين ٢٢٢ إلى ثبات الستلزين كلية لتركيز ١ مولر من فوق أكسيد الأيدروجين H_2O_2 لمدة ساعة وإلى احتفاظ الإنزيم بما يزيد عن نصف نشاطه قليلاً مقارنة بالإنزيم المتحصل عليه من السلالات الميكروبية غير المعدلة وراثياً .

كما ساهمت الهندسة الوراثية أيضاً بدور فاعل فى زيادة النشاط التحفيزى للمستحضر الإنزيمى التجارى الستلزين فى الظروف الشديدة القلوية والتى تستخدم فيها

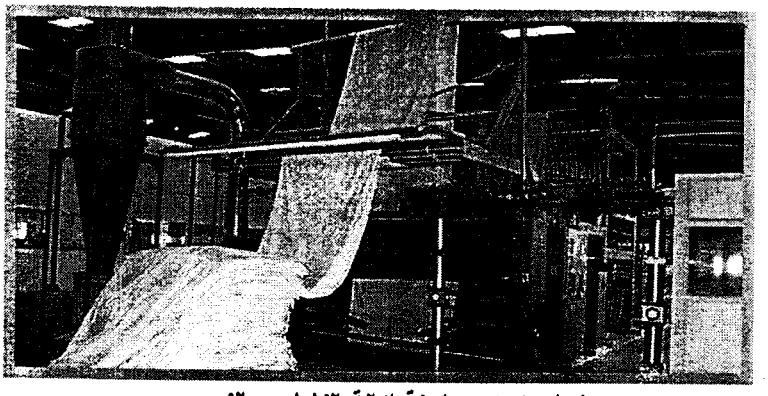
منظفات الغسيل ، إذ أنه من المعروف أن نشاط الستلزين يقل فى المدى من درجات الـ pH بين ٩,٥ – ١١ ، ويفسر مثل هذا النقص فى النشاط الإنزيمى إلى تأين أحد الحامضين التيروزين – ١٠٤ أو التيروزين – ٢١٧ أو كلاهما واللذان يقعان فى منطقة ارتباط مادة التفاعل بالإنزيم ، وقد أدى إحلال التيروزين – ١٠٤ بالفينيل ألانين إلى زيادة ملحوظة فى نشاط الإنزيم عند درجات الـ pH المرتفعة .

صناعة النسيج Textile industry:

تدخل الإنزيمات الميكروبية فى صناعة النسيج ؛ حيث أنها تفضل كثيراً فى عملية إزالة النشا من بين خيوط النسيج ، وهى العملية المعروفة بالـ desizing ؛ لأن هذه الإنزيمات تعمل فى درجات حرارة من ١٠٠ – ١١٠°م .

وفى صناعة الأقمشة تقتضى إحدى خطوات الصناعة إجراء ضغط ميكانيكى قوى لخيوط النسيج خلال عملية نسجه ، ولذلك تضاف عجينة النشا (أو ما يسمى الـ sizing) بهدف تقوية خيوط النسيج ، ومنع فقدها نتيجة الاحتكاك ، إلى جانب منع توليد كهربية إستاتيكية بالخيوط ، ثم تزال النشا كلية فى خطوات الصناعة التالية مثل خطوة الصباغة وخطوة التبييض وغيرها .

وتجرى عملية إزالة النشا بشكل مستمر (شكل ٦-٤) ، وتعتمد هذه العملية المستمرة على ثبات إنزيم الألفا أميليز البكتيرى الذى يستخدم عادة فى درجات الحرارة المرتفعة كأساس لإزالة النشا ، فبعد الغسيل الأولى فى ماء ساخن على ٩٠°م لحوالى ١٠ ثوانى ، يمرر القماش عدة مرات فى حمام مائى يحتوى على محلول لإنزيم الألفا أميليز (٠,٥ – ١% وزن – حجم) من بكتيريا باسيلس ستلس Bacillus subtilis ، و٠,٠٥% وزن – حجم لمحلول كلوريد كالسيوم الذى يستخدم بهدف الحفاظ على ثبات فعل الإنزيم ، و ٠,٢ – ٠,٥% وزن – حجم مادة سطحية غير أيونية وذلك على درجات حرارة بين ٦٥ – ٨٠°م لمدة ٢٠ ثانية فى كل مرة ثم تجرى عملية شطف للقماش .



شكل ٦-٤ . ماكينة إزالة النشا من النسيج .

إنزيمات صناعة الألبان :

يستخدم فى صناعة الألبان ومنتجاتها إنزيم اللاكتيز Lactase المنتج من بكتيريا اليوجورت ستربتوكوكس ساليفاريس تحت النوع ثرموفيليس Streptococcus salivarus subsp thermophilus ، وذلك لتحليل سكر اللبن (اللاكتوز) إلى جلوكوز وجلاكتوز .

وتبلغ نسبة اللاكتوز فى اللبن حوالى ٤,٨% وهو سكر ضعيف الذوبان منخفض الحلاوة ، ينتج عن كثرة تناوله إسهال متوسط للبالغين أو لبعض الأطفال بسبب ضعف مقاومتهم له كنتيجة لغياب إنزيم اللاكتيز المعوى ، وهو ما يعرف بإسهال الحليب ، وعادة يعانى مثل هؤلاء الأشخاص من الانتفاخ أو المغص الحاد والإسهال والامتصاص غير الجيد حال تناولهم كميات كبيرة من اللبن أو بعض منتجاته ، وعليه يحرم هؤلاء الأشخاص من أحد أهم المصادر الغذائية الطبيعية ، كذلك يسبب انخفاض ذوبان اللاكتوز تبلوره مما يتسبب فى القوام الجريش للمنتجات اللبنية المركزة ، وتحد المقاومة المنخفضة للاكتوز وعدم ذوبانه من استخدامه فى بعض الأغذية مثل الأيس كريم والكاندى وكذلك الأعلاف الحيوانية ، كما تحد هذه الأسباب من استخدام الشرش أيضاً بسبب محتواه العالى من سكر اللاكتوز(حوالى٧٥% على أساس الوزن الجاف)، ومن ثم يمثل الشرش مشكلة بيئية كبيرة لمصانع الألبان والبيئة ، ولذلك فهناك اهتمام

كبير من الناحيتين الغذائية والتجارية باختزال سكر اللاكتوز فى منتجات لبنية معينة ، وأهم الطرق لتحقيق ذلك هو استخدام إنزيم اللاكتيز .

ومن ناحية أخرى فإن أساس صناعة الجبن هو تخثر اللبن الحليب المستخدم فى صناعتها ، ويمكن عملياً الحصول على الخثرة بإضافة كل من أيونات الكالسيوم والمنفحة إلى اللبن ، والمنفحة عبارة عن مستخلص مائى يتم الحصول عليه من المعدة الرابعة للعجول الرضع ، والمكون المسئول عن تكوين الخثرة بالمنفحة هو الإنزيم المحلل للبروتين المسمى الكيموزين chymosin (يعرف أيضاً بالرنين rennin) ، ويتم تخليق الكيموزين من مكون يسمى preprochymosin يتم تصنيعه أثناء إفراز الإنزيم إلى مكون آخر يسمى البروكيموزين prochymosin ، والمكون الأخير ليس له أى نشاط إنزيمى ؛ إلا أنه عند قيم الـ pH المنخفضة يحدث له نوع من التحول إلى إنزيم الكيموزين ، ولذلك فإن إنزيم الكيموزين بالمنفحة هو خليط من كل من البروكيموزين والكيموزين .

ويحفز إنزيم الكيموزين تفاعل هدم البيتاكازين عند تركيز الأس الأيدروجينى pH الطبيعى للبن أى عند ٦,٦٠ ؛ مما يؤدى إلى إزالة glycosylated polypeptide من الميسلات ، وفى وجود أيونات الكالسيوم تتجمع الميسلات المعدلة ثانية لتكون شبكة ثلاثية الأبعاد تسمى الباراكازين paracasein ، ومن الشائع الإشارة إلى هذه الظاهرة باسم تخثر اللبن milk coagulation ، وهى تمثل الخطوة الأولى فى إنتاج الجبن .

وقد أدى العجز فى بعض الأوقات فى إنزيم الكيموزين المتحصل عليه من المعدة الرابعة للعجول الرضع إلى جانب ارتفاع أسعاره حالياً إلى استخدام إنزيمات البروتييز من الفطريات من بعض أفراد الجنس الزيجى ميوكر مثل النوع ميوكر بوسيلس Mucor pusillus والنوع ميوكر ميباى Mucor miebei إلى جانب الفطر الأسكى كرايفونيكتريا باراسيتيكا Cryphonectria parasitica (الذى كان يعرف باندوثيا باراسيتيكا Endothia parasitica) كبديل لرنين العجول ، ومن المعتقد أن

قوام وطعم الجبن المصنعة باستخدام هذه الإنزيمات ليس على نفس القدر المميز لخصائص تلك المصنعة باستخدام إنزيمات الرنين .

وتتكلف صناعة الألبان على مستوى العالم ما يزيد عن ١٠٠ مليون دولار أمريكى فى العام لتوفير إنزيم الكيموزين ، وقد شجع ذلك الكثيرين إلى محاولة الإنتاج الضخم للإنزيم من البكتيريات بوسائل الهندسة الوراثية ، وذلك بإنتاج الكيموزين البقرى بواسطة بكتيريا القولون إيشريشيا كولاى E. coli ، وقد أثمرت المحاولات عن نتائج طيبة ، وفى هذا الخصوص فقد وافقت منظمة الأغذية والدواء الأمريكية فى ٢٣ مارس ١٩٩٠ على استخدام الإنزيم المنتج بوسائل الهندسة الوراثية من بكتيريا إيشريشيا كولاى E. coli فى الألبان ومنتجاتها ، ويعتبر الكيموزين أول بروتين إنزيمى معدل وراثياً يصرح باستخدامه للاستهلاك الآدمى .

ويؤدى إيلاج جين البروكيموزين فى إيشريشيا كولاى E. coli إلى تكوين أجسام داخلية inclusion bodies ؛ ومن ثم تتطلب عملية إنتاج إنزيم نشط ونقى العديد من الخطوات الإضافية لفصل هذه الأجسام وإجراء تنقية للإنزيم ، وهناك محاولات ناجحة حالياً فى إنتاج الإنزيم بوسائل الهندسة الوراثية من بعض الخمائر مثل خميرة الخباز سكارومايسيس سيرفيسيا Saccharomyces cerevisiae وخميرة كلفيروميسيس Kluyveromyces sp وكذلك من بعض الفطريات الخيطية الأسكية مثل ترايكودرما ريزى Trichoderma reesei وأسبرجلس نيديولانس Aspergillus nidulans .

الأحماض العضوية :

يستخدم إنزيم الأكسيديز فى تخليق أحماض ألفا كيتو ، وهى أحماض هامة إذ تستخدم فى علاج التبولن المزمن للدم ، ونظراً لصعوبة تخليق هذه الأحماض كيماوياً من ناحية، وارتفاع ثمن إنزيم الأكسيديز من ناحية أخرى ، يفضل استخدام الإنزيمات المسكنة فى تخليقها .

ويستخدم إنزيم هستدين أمونيا لاييز من بكتيريا اكروموباكتر ليكويديم Achromobacter liquidium فى تحويل الحامض الأمينى الهستدين إلى حمض

اليوروكانيك urocanic acid، والأخير مركب وسطى ينتج خلال عملية هدم الهستدين، وحمض اليوروكانيك عامل هام فى sun-screening .

ويتم توظيف بكتيريا بريفيباكتريم امونياجينيز Brevibacterium ammoniagenes فى إنتاج حمض الماليك منذ عام ١٩٧٤ من قبل شركة Tanabe Seiyaku اليابانية المتخصصة فى مجال تصنيع الأدوية ، ويستخدم حمض الماليك فى علاج مرض الفشل الكبدى .

الأحماض الأمينية :

تعتبر الأحماض الأمينية بذات أهمية كبيرة فى تدعيم الغذاء وفى الطب وفى تخليق بعض المواد ، ويعتبر تخليق الأحماض الأمينية بواسطة النظم الإنزيمية أفضل من تخليقها كيماوياً .

وينتج الحمض الأمينى الأسبارتيك فى اليابان على المستوى التجارى منذ عام ١٩٧٣ بمساعدة إنزيم الأسبارتيز من بكتيريا القولون ايشريشيا كولاى E. coli ، ويستخدم حمض الأسبارتيك فى الطب وفى مجال الأغذية . كذلك يتم تحويل حمض الأسبارتيك فيما بعد إلى الألنين بواسطة إنزيم أسبارتات بيتا دى كربوكسيليز من بكتيريا سيدوموناس داكنهى Pseudomonas dacunhae .

ويستخدم إنزيم أمينو ببتيديز من بكتيريا سيدوموناس بيوتيدا Pseudomonas putida فى تخليق الحمض الأمينى فينيل جليسين الذى يدخل فى تخليق بعض المضادات الحيوية .

ومن الاستخدامات الهامة للإنزيمات المسكنة استخدام إنزيم أمينو أسيليز فى إنتاج الأحماض الأمينية ، حيث يستخدم هذا الإنزيم فى إنتاج الأحماض الأمينية فى اليابان بصفة خاصة ، وذلك من خلال تحميل الأعمدة بإنزيم أمينوأسيليز لإنتاج عدة أطنان من أحماض ل – مثيونين L-methionine ، ل– تربتوفان L-treptophan ، ل – فينيل آلانين L-phenylalanine – ل – فالين L-valine ، إذ أنه من المعروف أنه نظراً لوجود بعض الأحماض الأمينية الأساسية essential amino acids للنمو بكميات

قليلة فى بروتينات الكثير من الأغذية ذات الأصل النباتى ، لذا يجب إضافتها لتدعيم مثل هذه الأغذية لتلاءم الاستهلاك الحيوانى ، ويتمكن الحيوان من الاستفادة من الأحماض الأمينية من النوع L فقط ، ويمثل ذلك مشكلة لأن الأحماض الأمينية المنتجة كيماوياً تحتوى على النوعين D و L بنفس القدر ، بما يعنى أنه لا يمكن الاستفادة من ٥٠% من كمية الأحماض الأمينية المضافة إلى الغذاء .

وتستعمل الإنزيمات مثل إنزيم أمينو أسيليز فى عملية تحويل الأحماض الأمينية من النوع D الموجود فى الخليط الراسيمى إلى النوع L ، وقد استحدث شيبات وآخرون عام ١٩٦٩ طريقة لعملية التحويل هذه ، وفيها يتم تمرير الأحماض الأمينية من النوع L خلال عمود فصل يحتوى على إنزيم الأمينو أسيليز المسكن بربطه بالسيفادكس حيث ينجم عن ذلك إزالة مجموعة الأسيل deacylation من النوع L فقط حيث تفصل بعد ذلك ، يتم تعريض النوع D مرة ثانية لعملية racemization وتكرر العملية مرة ثانية .

مضادات الأكسدة :

ينتج عن الأكسدة الذاتية للمواد الغذائية بواسطة أكسجين الهواء الجوى أو الأكسجين المذاب فقد لقيمتها الغذائية وجودتها الحسية وتكوين السموم ، ويمكن استخدام عدد من الإنزيمات كمضادات أكسدة لإزالة الأكسجين أو الأنواع النشطة الأخرى من الأغذية .

ويعتبر إنزيم الجلوكوز أكسيديز من مضادات الأكسدة الشائعة الاستخدام لمنع التغير فى لون ونكهة الأغذية أثناء تصنيعها ونقلها وعدد من العصائر والمشروبات الكحولية والصلصلة .

يتم الحصول على إنزيم الجلوكوز أكسيديز من عدد من الفطريات الأسكية مثل فطر أسبرجلس نيجر Aspergillus niger ، وبنيسيليم جلاكم Penicillum glaucum وبنيسيليم نوتاتم P. notatum .

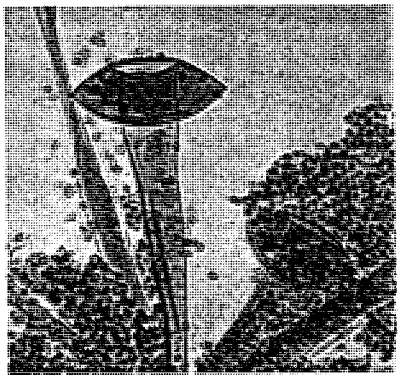
ويستخدم إنزيم الجلوكوز أكسيديز فى إزالة بقايا سكر الجلوكوز من البيض

وبياض البيض لمنع تفاعلات ميلارد Maillard وفقد النكهة ، كما يستخدم الجلوكوز أكسيديز فى التقديرات المبنية على الإنزيمات لتقدير سكر الجلوكوز ، كما يستخدم فى إنتاج حمض الجلوكونيك من سكر الجلوكوز .

تصنيع البروتين :

يستخدم إنزيم الليبيز من الفطر الزيجى ريزوبس ارهيزس Rhizopus arrhizus فى معاملة العظام نصف الطازجة والمحتوية على قدر كبير من الدهون لإزالة هذه الدهون لتسهيل استخلاص الجيلاتين ، ويعتبر هذا الفطر من الفطريات الهامة سواء فى البحث العلمى أو فى البيوتكنولوجيا (شكل ٦-٥) .

وفى تفاعل البلاستين plastein – الذى يتضمن تحليل البروتين بواسطة إنزيم البروتييز ثم تغيير ظروف التفاعل ليعمل البروتييز بشكل عكسى ليعيد تخليق روابط الببتيد ، لكن فى حالة الأحماض الأمينية والببتيدات يعيد التتابع والتركيب من جديد – يستخدم هذا التفاعل لتجميع إسترات الأحماض الأمينية إلى بروتين ، وتدعيم بروتين فول الصويا بالمثيونين ، وزيادة ذوبانها بإدخال حمض الجلوتاميك ، وإزالة البقايا غير المرغوبة ، كما هو الحال فى التخلص من الفينيل آلانين الموجود بالبروتين المعد لاستهلاك بعض المرضى .



شكل ٦-٥ . فطر ريزوبس ارهيزس .

ومن البروتينات المصنعة محلى الأسبارتام aspartame المكتشف فى عام ١٩٦٥ ، والذى يستخدم منذ عام ١٩٧٤ ، وقد ثار حوله جدل كبير فى احتمال أنه

يسبب أورام حتى ثبت أنه آمن فى الاستخدام عام ٢٠٠٧ ، والأسبارتام مركب تخليقى عبارة عن إستر ثنائى الببتيد ، تبلغ حلاوته ٢٠٠ مرة ضعف السكروز ، ويباع الأسبارتام فى دول كثيرة مثل أمريكا وأوروبا ، ويصنع بمساعدة إنزيمات المتالوبروتييز ، وتستخدم هذه الإنزيمات بسبب عدم احتوائها على نشاط لإنزيمات الإستريز .

عوامل النكهة :

تستخدم إنزيمات البروتييز من الفطريات الأسكية أسبرجلس أوريزا Aspergillus oryzae وأسبرجلس سوجي A. sojae فى عملية تصنيع صلصلة الصويا من فول الصويا ، حيث تضاف أثناء عملية التخمر لوقفها .

كما تستخدم إنزيمات الكربوهيدريز carbohydrases لتحليل بعض السكريات غير المرغوبة مثل الرافينوز والستاكيوز فى بعض المنتجات .

ويفيد إنزيم البروتييز المتعادل فى التخلص من نكهة الفول bean flavour فى عمليات تصنيع المنتج الصينى المعروف بلبن الصويا soya milk ، وهى عملية هامة لجودة المنتج النهائى .

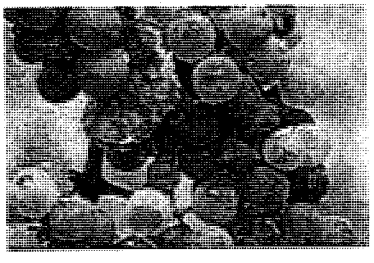
وتوظف بكتيريا سيدوموناس بيوتيدا Pseudomonas putida المسكنة فى جل الآجار منذ فترة فى تحليل مركب الكافيين الموجود بالبن بهدف إنتاج قهوة بدون كافيين .

تصنيع الفاكهة :

تضاف مستحضرات مختلطة من إنزيمات البكتينيز والهيميسليوليز والسليوليز من الفطر الزيجى الريزوبس Rhizopus والفطريات الأسكية الأسبرجلس Aspergillus والترايكودرما Trichoderma للفواكه أثناء تصنيعها لتحسين استخلاص العصير واللون والنكهة بواسطة تدعيم فعل الإنزيمات الداخلية الموجودة فى الفاكهة ولاختزال الوقت اللازم للتخمير والترويق .

وتؤدى المعاملة بإنزيمات البكتينيز المعتاد الحصول عليها من أنواع الجنس الأسكى أسبرجلس Aspergillus إلى اختزال لزوجة العصائر ، والحصول على منتج مركز وثابت .

ويفيد استخدام إنزيمات الجلوكانيز فى تسهيل عملية ترويق وترشيح الخمور المصنوعة من عنب مصاب بالفطر الأسكى بوتريتس سيناريا Botrytis cinera (شكل ٦-٦) ، حيث ينتج هذا الفطر الجلوكان وهو لا يتحلل بواسطة إنزيمات الدكسترانيز .



شكل ٦-٦ . عنب مصاب بفطر بوتريتس سيناريا .

ومن أمثلة الإنزيمات الميكروبية الهامة الأخرى فى تصنيع وإنتاج العصائر إنزيم نارنجنيز naringinase وإنزيم ليمونيز limonase من بكتيريا أرثروباكتر جلوبيفورميز Arthrobacter globiformis إذ تحلل المكونات المرة فى عصائر بعض فواكه الموالح وبصفة خاصة الجريب فروت مثل مركب النارنجين .

استخلاص المنتجات الطبيعية :

تستخدم إنزيمات السليوليز والهيميسليوليز والبروتييز من فطريات تريكودرما فيردى Trichoderma viride وأسبرجلس نيجر Aspergillus niger فى استخلاص الهيدروكربونات من نباتات جنس الأيوفوربيا Euphorbia ، كما تستخدم إنزيمات مشابهة فى استخلاص بروتينات السابوجيننات sapogenins من الجنس النباتى هيليبورس Helleborus الواسع الانتشار فى كل من أوروبا وأسيا .

ويستخدم إنزيم الجلوكومانيز المتحصل عليه من بكتيريا باسيلس سيركيولانس Bacillus circulans فى اختزال الوزن الجزيئى للصموغ الذائبة الموجودة فى مستخلصات القهوة قبل تركيزها .

ويستخدم مخلوط من إنزيمات الكربوهيدريز والسليوليز من فطر أسبرجلس نيجر A. niger لإزالة قشور الجمبرى .

العلاج الحيوى :

تستخدم إنزيمات ديهالوجينيز من بكتيريا سيدوموناس بيوتيدا Pseudomonas putida فى تحليل الكثير من البقايا والمواد السامة الناتجة عن استخدام الكثير من مبيدات الآفات فى الممارسات الزراعية الحديثة .

وتستخدم بكتيريا سيدوموناس دينيتريفيكانس Pseudomonas denitrificans فى صورة حرة أو مسكنة فى التخلص بشكل مستمر من النترات الملوثة لمياه الشرب حيث تؤكسد النترات كاملة لنواتج غازية ، وقد تزايد دور هذه البكتيريا فى السنوات الأخيرة نظراً للإفراط فى استخدام الأسمدة النيتروجينية وزيادة التلوث بالنترات .

كذلك تلعب الإنزيمات دور هام فى تحليل الفينولات فى مياه المخلفات الناتجة عن المختبرات والمستشفيات وأماكن تصنيع الفحم ، ويستخدم هنا فطر ايروبازيديم بيولاتنس Aureobasidum pullatans (شكل ٦-٧) وبكتيريا سيدوموناس Pseudomonas sp .

شكل ٦-٧ . فطر Aureobasidum pullatans .

وتلعب الإنزيمات أيضاً دوراً هاماً فى التخلص من سمية مخلفات الصناعات الكيميائية قبل دخولها إلى النظم البيئية ، فعلى سبيل المثال تحلل أفراد بكتيريا من جنس ميكوبكتيريم Mycobacterium كلوريد الفينيل وهو مادة مسرطنة تصل إلى البيئة من مصانع إنتاج البولى فينيل كلوريد .

صناعة الجلود :

تستخدم إنزيمات البروتييز الميكروبية ذات الطبيعة القلوية مثل المستحضر الإنزيمى التجارى الستلزين فى نزع الشعر والصوف والوبر من جلود الحيوانات حيث تعمل على انتفاخ جذورها مما يسهل إزالتها من خلال السماح لإنزيمات البروتييز لتهاجم البروتين بشكل اختيارى فى منبت الشعر hair follicle .

صناعة الورق :

تستخدم النشا لسد مسام سطح الورق كما يغطى بها الورق وذلك بهدف تقويته، وتتم عملية التحليل المائى للنشا لخفض لزوجتها باستخدام إنزيمات ألفا أميليز من الميكروبات .

وفى حالة استخدام نشا البطاطس يستخدم ألفا أميليز الفطرى الذى يكون نشط فقط على درجات الحرارة المنخفضة نسبياً ، أما فى حالة استخدام نشا الذرة فيستخدم ألفا أميليز البكتيرى .

المضادات الحيوية :

هناك حوالى ١٥٠ مضاد حيوى تنتج حالياً على المستوى التجارى ، وتستخدم هذه المضادات الحيوية فى الطب والزراعة ، وتنتج هذه المضادات الحيوية من خلال التخمرات التقليدية ثم يحور بعضها بواسطة الإنزيمات .

وتعتبر البكتيريا المصدر الأساسى لإنزيم البنسلين أسيليز penicillin acylase ، حيث ينتج هذا الإنزيم حوالى ٢٥ نوعاً من البكتيريا ، كما ينتج أيضاً بواسطة الفطريات ، يعتمد على إنزيم البنسيلين أسيليز المتحصل عليه من البكتيريا فى تجهيز حمض ٦ – أمينو بنسيلنيك ٦–aminopenicillanic acid (6-APA) بالتخمير على ٣٧°م من بنسلين G أو V المنتج طبيعياً ، حيث يزيل مجموعة البنزيل .

ويعتبر حمض ٦ – أمينوبنسيلنيك بمثابة مركب وسطى هام فى تصنيع أنواع البنسلين ، وقد حاول العلماء منذ عام ١٩٥٠ فى اليابان بخاصة إنتاج حمض ٦ –

أمينوبنسليك حيث أنه بمثابة مادة بادئة starting material لتصنيع أنواع مختلفة نصف تخليقية من البنسلين بهدف زيادة مجال فعل البنسلين ليشمل البكتيريا السالبة لجرام إلى جانب الموجبة لجرام مما يدعم صراع الإنسان الطويل ضد المسببات المرضية البكتيرية ، وهناك نوعين من البنسلين يتم إنتاجهما من خلال التخمرات الصناعية ، النوع الأول : بنسلين G ويعرف باسم phenylacetyl-6-APA ، والنوع الثانى : بنسلين V ويعرف باسم phenoxyacetyl-6-APA ، وكلا النوعين من البنسلين يحتويان على نواة كيميائية من ٦-APA وعلى سلسلة جانبية ، تتحكم السلسلة الجانبية لجزئ البنسلين فى نشاطه المضاد للأحياء ، وعندما يتم إزالة هذه السلسلة وإحلال أخرى محلها فإن ذلك يغير مجال المضاد الحيوى والخصائص الأخرى ، وفى الوقت الحالى يستخدم الكثير من الصناعات الصيدلانية الإنزيمات المسكنة فى إنتاج الـ ٦-APA على مستوى صناعى كبير ، يبلغ معدل الإنتاج السنوى من حمض ٦-APA على الأقل ٣٥٠٠ طن تتطلب فى إنتاجها حوالى ٣٠ طن من إنزيم البنسلين أسيليز .

إنزيمات الهندسة الوراثية :

يبلغ عدد إنزيمات القطع restriction enzymes المتاحة تجارياً من سلالات البروكاريوتات المختلفة حوالى ٢٠٠ إنزيم ، وتقريباً تمتلك كل البكتيريا والأركيا التى تم فحصها مايسمى بنظم التعديل والقطع ، وهى قطع من الإنزيمات تمكنها من التمييز بين الحامض النووى د ن أ الخاص بها والحامض النووى د ن أ الغريب الغازى للخلية البكتيرية ، وتتكون هذه النظم من :

١- إنزيمات التعديل التى تنتج نموذج مميز من المثيلة فى مواقع بعينها على طول تتابع الحامض النووى د ن أ للكروموسوم البكتيرى .

٢- إنزيمات القطع التى تكسر الحامض النووى د ن أ بالضبط عند نفس المواضع .

وتجعل إنزيمات القطع عملية التعديل الوراثى الجزيئى ممكنة ، مما يمكن العلماء من قطع وتجزئ جزيئات من الحامض النووى فى مواضع معروفة بالضبط . ومن أمثلة البكتيريات التى يتم الحصول منها على إنزيمات القطع الإندونيوكلييز

بكتيريات ستربتوميسيس Streptomyces fimbriatus ونوكارديا Nocardia otitidis-caviarum .

تطبيقات أخرى للإنزيمات :

هناك استخدامات أخرى متفرقة للإنزيمات الميكروبية منها التخليق الإنزيمى للإسترات esters واللاكتونات lactones من الأحماض الكربوكسيلية لاستخدامها ضمن مواد النكهة .

ويستخدم إنزيم ميثانول ديهيدروجينيز من بكتيريا ميثيلوباكتيريم اورجانوفيلم Methyllobacterium organophilum فى أكسدة الجليسرول إلى جلوترالدهيد ، ويدخل الجلوترالدهيد فى تصنيع مستحضرات التجميل ، وفى تسكين الخلايا الميكروبية وإنزيماتها على حوامل صلبة لتكرار استخدامها فى بعض العمليات الصناعية .

ويمثل فطر التيماريا تنيز Altemaria tenuis أو الفطر البازيدى تراميتيس فرسيكلور Trametes versicolor (الذى كان يعرف من قبل باسم كوريلس فرسيكلور Coriolus versicolor) , (شكل ٦-٨) المصدر التجارى لإنزيم لاكيز laccase ، وهو من الإنزيمات واسعة الاستخدام فى مجالات متعددة مثل إسراع جفاف مواد الطلاء والدهانات التقليدية وتحليل اللجنين .

وينتج مركب أكسيد البروبيلين propylene oxide من البروبيلين بمساعدة إنزيم إثيلين مونو أكسجينيز الذى يتم الحصول عليه من بكتيريا ميكوبكتيريم Mycobacterium ، وينتج أكسيد البروبيلين بشكل تجارى كبير نظراً لتطبيقاته الصناعية الواسعة فى مجال صناعة البلاستيك .

شكل ٦-٨ . فطر كوريلس فرسيكلور

. Coriolus versicolor

وحديثاً تدخل الإنزيمات فى أجهزة الإحساس الحيوية biosensors مثل استخدام غشاء من البنسيلينيز – ألبيومين pencillin-albumin حساس للمضاد الحيوى البنسيلين ، وتستخدم طفرات بكتيريا سالمونيلا تيفيميورم Salmonella typhimurium مسكنة على الكترود من الأكسجين لقياس إمكانية أن تكون العينات موضع الاختبار مسرطنة .

وفى السنوات الأخيرة تم تطوير تكنيك لتحويل حمض اسيتاميدوسينماميك إلى فينيل آلانين باستخدام إنزيمات من السلالات البكتيرية الكاليجينيز فيكاليز Alcaligenes faecalis وباسيلس سفريكس Bacillus sphaericus ، وتستخدم بعض الشركات التجارية إنزيم فينيل آلانين أمونيا لايز لإنتاج فينيل آلانين من الترانسيناميات وأيونات الأمونيوم ، كما تنتج السيرين من الجليسين والفورمالدهيد باستخدام إنزيم السيرين هيدروكسى ميثيل ترانس فيريز الميكروبى .

وتستخدم الإنزيمات الميكروبية فى المجالات العلاجية الطبية مثل إنزيم الكولاجينيز لعلاج قرح الجلد ، واليوريكيز لعلاج مرض النقرس ، إلى جانب عدد من الإنزيمات كعوامل محللة للجلطة ، والعامل IX_a لعلاج الهيموفيليا ب ، والهيلسيورونيديز كعقار .

جدول ٦-٣ . الاستخدامات الصناعية الهامة للإنزيمات المنتجة بواسطة الميكروبات .

الإنزيم	المصدر	الاستخدام	الصناعة
الألفا - أميليز	Bacillus subtilis	تحليل النشا لتغليف الورق	الورق
	Bacillus licheniformis	عملية الهرس لصناعة البيرة	التخمير brewing
	Aspergillus oryzae	إنتاج الشراب	الشيكولاته الكاكاو
		إزالة البقع	التنظيف الجاف
		إزالة البقع	غسيل الملابس على البارد
		إزالة البقع على البارد	غسيل الملابس على البارد
		معاون لعملية الهضم	الصيدلية والطبية
		شراب الذرة	النشا والشراب
		تحليل الألياف	النسيج
الجلوكوأميليز	Aspergillus oryzae	تحليل النشا لإنتاج الشراب	النشا والشراب
	Aspergillus niger	عملية الهرس لصناعة البيرة	التخمر
	Rhizopus oryzae		
Pullulanase	Klebsiella aerogenes	يحلل كل من الـ pullulan والأميلوبكتين	صناعة النشا
البروتييز	Bacillus subtilis	إزالة البقع	التنظيف الجاف
	Bacillus licheniformis	إزالة البقع	غسيل الملابس
	Aspergillus oryzae	تحليل الألياف	النسيج
	Streptomyces	الـ Bating	الجلود
		تطرية اللحوم	اللحوم
		معاون لعملية الهضم	الصيدلية والطبية
		استخلاص الفضة من الأفلام التالفة	التصوير الفوتوجرافى
		تصريف المياه	السباكة

الإنزيـــــم	المصـــــدر	الاستخدام	الصناعـــــة
الستربتوكينيز	Streptococcus	الجروح إزالة الأنسجة	الصيدلية والطبية الصيدلية والطبية
الستربتودورنيز	Streptococcus	الجروح إزالة الأنسجة	الصيدلية والطبية الصيدلية والطبية
الكيراتنيز	Streptomyces	تصريف المياه	السباكة
الجلوكـــــوز أيزوميريز	Bacillus coagulans Streptomyces albus	شراب الذرة	النشا والشراب
الأنفرتيز	Streptomyces cerevisiae	الكاندى	الحلويات
البنسلينيز	Bacillus	إزالة البنسلين	البحث العلمى
الكاتاليز	Micrococcus	منع أكسدة الأغذية ، يستخدم فى إنتاج الجبن وخبز الكيك والأغذية المشعة .	الصناعات الغذائية والألبان
هيليورونيديز	بكتيريات مختلفة	تنظيف الجروح ومنع الإلتصاقات الجراحية .	الطبية
بيتا – جلوكانيز	Bacillus subtilis Aspergillus niger Penicillium emersonii	تحليل البيتا جلوكان	التخمرات

الإنزيـــم	المصـــدر	الاستخدام	الصناعـــة
اللاكتيز	Saccharomyces lactis Aspergillus oryzae Aspergillus niger Rhizopus oryzae	تحليـــل اللاكتـــوز إلى جلوكـــوز وجلاكتوز	صناعة الألبان والحلويات
البكتينيز	Aspergillus oryzae Aspergillus niger Rhizopus oryzae	تحليل البكتين	ترويـــق عـــصائر الفاكهـــة والمشروبات الكحولية
الليبيز	Aspergillus oryzae Aspergillus niger Rhizopus oryzae	تحليل روابط الإستر فى الدهون	صناعة الألبان المنظفات
الرنين	Mucor miehei spp. Recombinant enzyme produced in E. coli and fungi	تحليل روابط معينـة فـى كازين تؤدى إلى تخثر اللبن	الكابـا صناعة الجبن

المراجع :

Khalikova, E., P. Susi, T. Korpela (2005). Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69, 306-325

Kosaric, N., K. Yu, J.E. Zajic, J. Rozanis (2004). Dextranase production from Penicillium funiculosum. Biotechnol. Bioeng. 15 (4), 729-741.

Kriegshauser, G., W. Liebl (2000). Pullulanase from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima: purification by β-cyclodextrin affinity chromatography. J. Chromatography, 737, 245-251.

Mamo, G, R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson (2006). A thermostable alkalineactive endo-beta-1-4-xylanase from Bacillus halodurans S7: Purification and characterization. Enzyme and Microbial Technol., 39, 1492-1498.

Mitea, C, R. Havenaar, J.W. Drijfhout, L. Edens, L. Dekking, F. Koning (2008). Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. Gut Jan; 57, 25-32.

Niir Board of Consultants and Engineers (2000). Enzymes Biotechnology Handbook, pages 490, Publisher: Asia Pacific Business Press Inc.

Numan, M.T., N.B. Bhosle (2006). α-L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 33, 247-260.

Panesar, P.S., R. Panesar, R.S. Singh, J.F. Kennedy, H. Kumar (2006). Microbial production, immobilization and applications of β-D-galactosidase. J. Chem. Technol. Biotechnol., 81, 530-543.

Parvanova-Manchevaa, T. and V. Beschkov (2009). Microbial denitrification by immobilized bacteria Pseudomonas denitrificans stimulated by constant electric field. Biochem. Eng. J. 44 (2-3), 208-213.

Rajakumar, S., P.M. Ayyasamy, K. Shanthi, P. Thavamani, P. Velmurugan, Y.C. Song and P. Lakshmanaperumalsamy (2008). Nitrate removal efficiency of bacterial consortium (Pseudomonas

sp. KW1 and Bacillus sp. YW4) in synthetic nitrate-rich water. J. of Hazardous Materials 157 (2-3), 553-563.

Schuster, E., N. Dunn-Coleman, J.C. Frisvad, P.W. Van Dijck (2002). On the safety of Aspergillus niger-a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59 (4-5), 426–435.

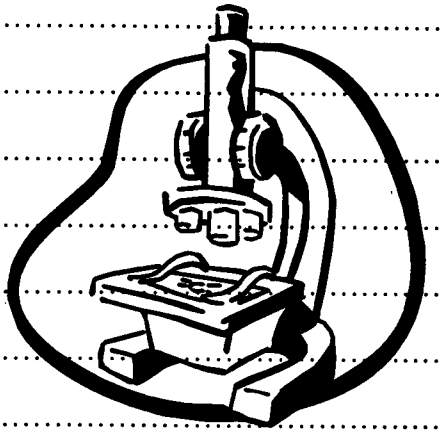
Singh, P, P.K. Gill (2006). Production of inulinases: Recent advances. Food Technol. Biotechnol., 44, 151-162.

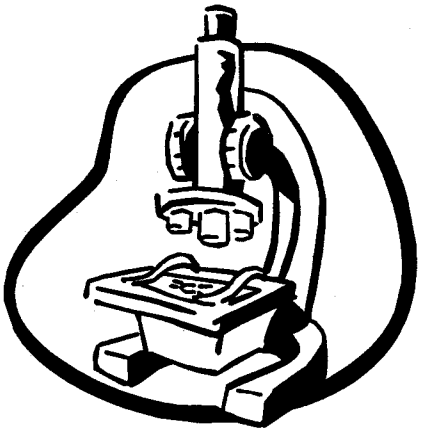
Suresh, P.S., A. Kumar, R. Kumar, V.P. Singh (2008). An in silico [correction of insilico] approach to bioremediation: laccase as a case study. J. Mol. Graph. Model. 26 (5), 845–849.

Turner, P., G. Mamo, Eva N. Karlsson (2007). Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. Microbial Cell Factories, 6:9.

Wheeldon, I.R., J.W. Gallaway, S. Calabrese Barton and S. Banta (2008) Bioelectrocatalytic hydrogels from electron-conducting metallopolypeptides coassembled with bifunctional enzymatic building blocks. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 105(40): 15275-15280.

Xu, F. (2005). Applications of oxidoreductases: Recent progress. Ind. Biotechnol. (Mary Ann Liebert, Inc.) 1(1), 38-50.





الفصل السابع

توفير وحفظ الكائنات الحية الدقيقة

■ التنوع الميكروبى وتطبيقاته ■

عُرفت العمليات البيوتكنولوجية الأولية ومجموعات المزارع الميكروبية microbial collections منذ العالم القديم ، فقد أنتج المصريون الخبز المخمر ، كما أنتجوا نوع من البيرة من حبوب الغلال المخمرة ، كذلك أنتج اليونانيون والرومان النبيذ الذى وجد سوقاً رائجة حول العالم ، وقد تميزت منتجات الخبز والبيرة والنبيذ بمذاق جذاب ، وقد استخدم المصنعون القدامى فى الإنتاج عجينة خاصة أو مادة متخمرة من دفعات الإنتاج السابقة للدفعات التالية ، وقد استمرت هذه العملية لقرون حتى أصبحت مزارع الخميرة النقية pure cultures ومزارع اللقاحات السمادية وغيرها متوفرة تجارياً فى مراكز تجميع المزارع الميكروبية .

ومن الواضح أن هناك تطبيقات ضخمة للميكروبات فى مجالات التقنية الحيوية، ويعتمد نجاح هذه التطبيقات بالأساس على السلالة الميكروبية المستخدمة ، ولذلك يحتاج مستخدمى الكائنات الحية الدقيقة إلى الاحتفاظ بالميكروبات المفيدة لآماد طويلة ، كما يحتاجون أيضاً إلى مصادر موثوق بها للحصول منها على مزارع ميكروبية نقية، وهناك أكثر من ٥٠٠ مركز حول العالم توفر سلالات البكتيريا والفطر والخميرة إلى جانب الفيروسات والبلازميدات ، وتعرف هذه المراكز بمراكز تجميع السلالات Culture Collection Centers أو مراكز الثروة الميكروبية ، وتحصل هذه المراكز على السلالات المحفوظة بها من الميكروبيولوجيين بالجامعات والمعاهد البحثية ، ومن الصناعات الميكروبيولوجية التى لم تعد تستخدم سلالاتها القيمة بعد .

ومن الأفضل للعاملين فى حقل الميكروبيولوجيا عزل الميكروبات من مصادرها الطبيعية كالتربة والمياه والنباتات وغيرها ، فهذه المصادر تعج بالميكروبات التى لم تعزل وتعرف بعد ، أو بالأحرى التى لم تكتشف قدراتها بعد .

عزل الميكروبات :

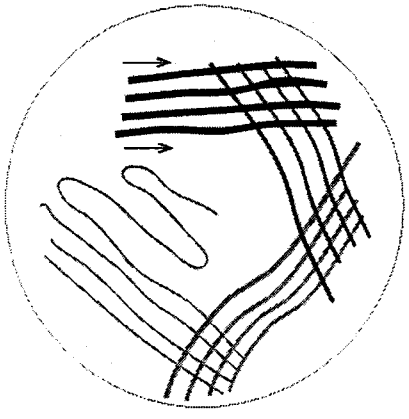
يقصد بالعزل فصل ميكروب بصورة منفردة من خليط من الميكروبات التى توجد عادة فى المصادر والمستودعات الطبيعية للميكروبات ، ثم زراعة هذا الميكروب المعزول ، أى تنميته معملياً على بيئة زرع صناعية ملائمة .

١- طريقة الأطباق :

يتم عزل الكثير من البكتيريا ومعظم الفطريات والخمائر فى أطباق بعمل تخفيفات من العينة المحتوية على الميكروب فى بيئة نموه ذاتها ، وهى أفضل من التخفيف فى ماء الصنبور المعقم أو حتى فى محلول من ملح الطعام بتركيز ٠,٨٥% ، إذ تموت بعض الميكروبات بعد فترة قصيرة من تعليقها فى الماء أو المحلول الملحى ، ويمكن أيضاً التخفيف فى محلول مائى ١% ببتون .

أ- طريقة الأطباق المخطوطة :

للعزل بهذه الطريقة تغمس إبرة التلقيح ذات العقدة فى المعلق الميكروبى ، ويخطط بها فى خطوط متوازية على سطح بيئة مغذية صلبة بطبق بترى ، حيث يخفف اللقاح الذى تنقله الإبرة تدريجياً ، ويمكن الحصول على مستعمرات منفردة فى النهاية (شكل ٧-١) .



شكل ٧-١ . نماذج التخطيط فى طريقة الأطباق المخطوطة .

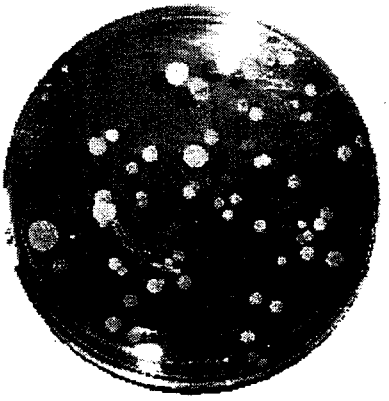
ب- طريقة الأطباق المصبوبة :

فى هذه الطريقة يتم عمل تخفيفات أيضاً ملائمة من العينة المحتوية على الميكروب موضع العزل ، وتنقل كمية من العينة المخففة لطبق بترى معقم ، وتصب فوقها كمية البيئة الغذائية المبردة (شكل ٧-٢) ، وتترك المزرعة حتى تتصلب ثم

تحضن على درجة حرارة ملائمة لنمو مستعمرات فردية (شكل ٧-٣) يمكن عـزل الميكروب منها .

شكل ٧-٢ . طريقة الأطباق المصبوبة .

وتفيد أيضاً طريقة الأطباق المصبوبة فى عزل البكتيريا اللاهوائية إجباراً مـن النوع الذى لا يقتل بسرعة عند تعرضه للأكسجين ، حيث تجهز المزارع وتحضن فى أوعية محكمة الغلق على أن تحتوى على مادة كيماوية تعمل على امتصاص أو إزالة الأكسجين .

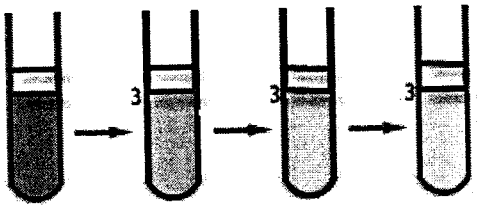


شكل ٧-٣ . مستعمرات بكتيرية نامية على بيئة آجار مغذى .

٢- المزرعة المهتزة :

تفيد هذه الطريقة بصفة خاصة فى عزل الميكروبات الأكثر حساسية للأكسجين، حيث تلقح أنبوبة محتوية على بيئة آجار منصهرة ومبردة ، ثم ترج وينقل جزء مـن محتوياتها إلى أنبوبة أخرى محتوية على نفس البيئة ، ثم ترج وتستخدم فى تلقيح بيئة أخرى ، وهكذا تكرر العملية حتى يتم عمل عدة تخفيفات ، ويصب طبقة من البرافين المعقم على سطح المزرعة ، ويمكن الاستغناء عن غطاء البرافين حال احتواء البيئـة

على عامل مختزل حيث يزال الأكسجين من الوسط بأكسدة العامل المختزل ، وتحضن المزارع فتتكون فيها المستعمرات على امتداد عمود الآجار (شكل ٧-٤) .



شكل ٧-٣ . عزل مزرعة بكتيرية لاهوائية نقية بطريقة المزرعة المهتزة .

ويزال غطاء البرافين بإبرة معقمة ، ثم يتم نقل مستعمرات فردية ، حيث يستخرج عمود الآجار بإمرار غاز خالى من الأكسجين خلال ماصة شعرية تدخل بين البيئة وجدار الأنبوبة ، وينقل عمود الآجار لطبق بترى معقم ، ويقطع بسكين معقم لأقراص قد تحتوى على مستعمرات منفردة .

وتعمل تخفيفات من كل مستعمرة فردية تم الحصول عليها بنفس الطريقة السابقة، ويتم عمل سلسلة من المزارع المهتزة ، أو يتم التخطيط على طبق آخر .

ويراعى تكرار زرع ونقل المستعمرات النقية لتحاشى نقل الميكروبات التى تفشل فى النمو لكنها ملوثة للبيئة .

٣- عزل خلية واحدة :

من الممكن عند عدم ملائمة طرق العزل الميكروبى بواسطة مزارع الأطباق أو المزرعة المهتزة أن يستخدم المجهر فى عزل خلية ميكروبية واحدة .

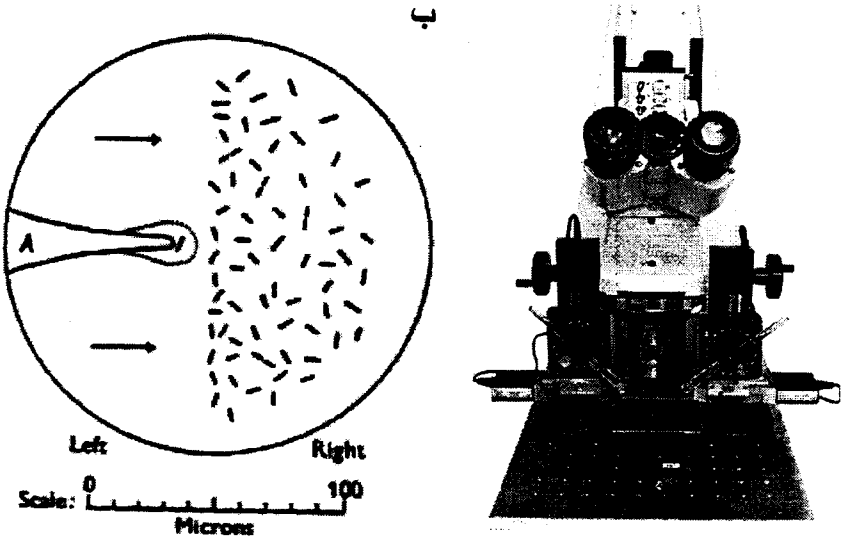
وفى هذه الطريقة تستخدم أداة ميكانيكية هى ميكرومانيبيولاتور micromanipulator متصل بأدوات زجاجية ذات دقة عالية ، ويساعد استخدام هذه الأداة فى التحكم بدقة فى عملية العزل (شكل ٧-٥) .

٤- العزل على بيئة انتقائية :

يمكن العزل على بيئة انتقائية تسمح بنمو ميكروب بعينه فى حين تثبط نمو خليط الميكروبات الأخرى الموجودة فى عينة العزل .

ويتم تركيب البيئات الانتقائية بحيث تحتوى على مواد معينة تسمح بنمو

الميكروب المراد عزله فى حين تثبط الميكروبات الأخرى كما هو الحال فى تثبيط نمو البكتيريا الموجبة لجرام بإضافة البنسلين إلى وسط النمو ، أو فى تثبيط نمو البكتيريا السالبة لجرام بإضافة المضاد الحيوى بوليمكسين ب ، أو فى تثبيط نمو الفطريات بإضافة النيستاتين أو الأكتيديون .



شكل ٧-٥ . ميكرومونوبيلاتر ميكانيكى عالى الدقة (أ) وسحب كائن مفرد بعيداً عن بقية الخلايا (ب) .

طرق الحفظ :

لا ينبغى أن يطرأ أى تغيير يذكر على أجهزة الوراثة فى الخلية الميكروبية قد يفضى إلى تنحى الصفة القيّمة المرغوبة فى السلالة أثناء حفظها . وليس هناك تكنيك حفظ واحد يلاءم كل الكائنات الحية ، ويمكن حفظ الخلايا الميكروبية لفترات قصيرة على الآجار المائل slants أو بوخز الآجار المحتوى على المواد الغذائية ، أو بحفظها لفترات أطول فى صورة مجفدة أو فى أى شكل مجمد آخر ، ويمكن حفظ الكائنات التى تكون جراثيم فى صورة جافة فى مواد صلبة .

ولا تضمن أساليب حفظ الخلايا الميكروبية تحت الظروف العادية ، أو حتى

المثابرة على زراعتها دورياً فى أوساط غذائية جديدة أية حماية للميكروبات من التغيرات الوراثية .

وبصفة عامة ، هناك أربعة طرق أساسية لحفظ الميكروبات وهى :

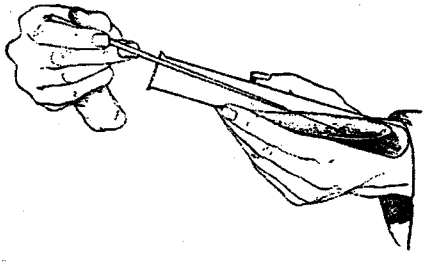
١- النقل على فترات لبيئات جديدة Periodic transfer :

أبسط وأرخص طريقة لحفظ المزارع الميكروبية النقية حية هى تكرار نقلها على بيئات آجار مائلة جديدة لها نفس تركيب البيئة الأصلية (شكل ٧-٦) ، وذلك على فترات منتظمة تختلف على حسب نوع الميكروب ، ويمكن الاحتفاظ بحيوية البكتيريا غير ذاتية التغذية على بيئة الآجار المغذى عدة أسابيع إلى عدة شهور ، فى حين يجب تجديد مزارع البكتيريا المرضية مابين ١-٢ أسبوع للاحتفاظ بها حية وذات قدرة على إحداث المرض .

ويراعى فى هذه الطريقة اختيار الوسط الغذائى الملائم لنمو النوع الميكروبى ، والتحضين على درجة الحرارة المناسبة ، والفترات الدورية التى تجدد عليها المزارع. وتحفظ المزارع فى الثلاجة على ٥°م فى وعاء مناسب لتحاشى جفافها .

ويعاب على طريقة النقل الدورى على فترات تواجد طفرات وزيادة فرص حدوث تلوث فى المزارع وحدوث تغيرات وراثية غير مرغوبة .

ويمكن للبكتيريا والفطريات المحفوظة بهذه الطريقة فقد بعض من صفاتها المرغوبة نتيجة عملية تكرار نقل المزارع .



شكل ٧-٦ . النقل على فترات دورية .

٢- الحفظ تحت غطاء من الزيت المعدنى Mineral oil slant :

يمكن حفظ الكثير من مزارع البكتيريا لفترة طويلة تصل لعدة سنوات بغمر سطح النمو بكمية وافرة من زيت البرافين المعقم ، بحيث تغطى السطح المائل من

الآجار تماماً ، ويصل مستوى الزيت حوالى ١ سنتيمتر فوق الآجار المائل .

ويراعى تعقيم الزيت المعدنى قبل استخدامه وذلك على درجة حرارة ١٧٠ م لمدة ١-٢ ساعة ، ثم يبرد قبل غمر المزارع المراد حفظها به .

ويقلل وجود الزيت المعدنى من فقد ماء المزرعة المحفوظة بتأثير التبخير ويبطئ من تبادل الغازات .

وعلى الرغم من اختلاف حيوية المزارع التى يتم حفظها تحت طبقة الزيت المعدنى تبعاً لنوعها ، إلا أنه يمكن أخذ جزء من النمو المغمور فى الزيت المعدنى بإبرة تلقيح وتجديدها مع الاحتفاظ بالمزرعة الأصلية .

ويعاب على طريقة حفظ الميكروبات تحت الغطاء الزيتى فقد بعض الفطريات المحفوظة لقدرتها التجرثمية ، ونشاطها البيوكيماوى ، ولذلك فهى مناسبة أكثر للفطريات غير المتجرثمة .

٣- التجفيد (Lyophilization (freez-drying :

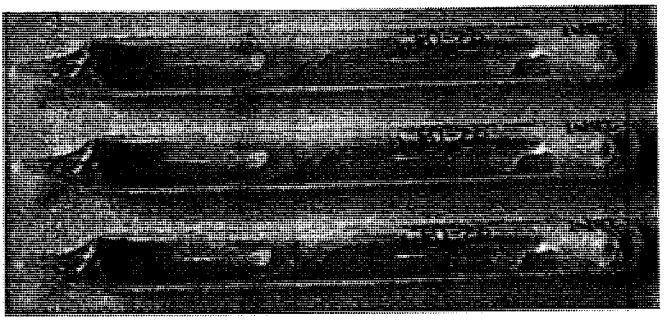
يعد التجفيد أكفأ الطرق لحفظ المزارع الميكروبية ، إذ يمكن بهذه الطريقة حفظ البكتيريا بحيويتها وبدون أية تغيرات عدة قرون، كما يتم نقلها دون الحاجة إلى تبريد . وفى طريقة التجفيد تجفف الخلايا بسرعة فائقة وهى مجمدة حيث يوضع معلق الخلايا فى أنابيب صغيرة مسحوبة القمة ثم تغمر فى مزيج من الثلج الجاف والكحول (- ٨٧°م) ثم توصل فوهة الأنبوبة إلى جهاز تفريغ عال ، وبعد تمام التجفيف تلحم الأنابيب وهى تحت ظروف التفريغ (شكل ٧-٧) .

وتحفظ الخلايا الميكروبية من خلال تجميد أنشطتها الحيوية بالتجفيف عند درجات حرارة تقل كثيراً عن نقطة تجمد الماء ، والأساس فى هذا الأسلوب هو انتزاع الماء من الخلية دون الإخلال بمكوناتها وجزئياتها وترتيبها الفراغى داخلها ، وفى هذه الحالة تبقى الخلية حية بيولوجيا ، ولكنها مجمدة النشاط بسبب نقص الماء ، فإذا ما ارتوت بالماء ولو بعد مئات السنين استأنفت أنشطتها الحيوية كما كانت تماماً قبل انتزاع الماء منها .

وترجع حتمية تجميد الخلايا الميكروبية فى هذا الأسلوب لوقف نشاطها والإبقاء على الترتيب الفراغى لمكوناتها على ما هو عليه ، حتى يتسنى لها استئناف أنشطتها حال توافر الماء لها ، أما ترك الخلية لتجف فى الهواء عند درجة حرارة الغرفة أو فى الفرن يؤدى لاختلال فى ترتيب مكوناتها الفراغى ، ومن ثم إلى موتها فى نهاية المطاف .

ويرجع حفظ الخلايا الحية من أنواع البكتيريا بالتجفيف إلى مئات الملايين من السنين، إذ ما أن تبلغ الخلية مرحلة متقدمة من العمر حتى تفقد معظم ما بها من ماء ، بلا حاجة حتى للتجميد ، وتتكمش محتوياتها محتفظة بالترتيب الفراغى لجميع المكونات على ما هو عليه ، وتحاط بأغلفة عديدة لتكون وحدات حية ولكنها بلا نشاط يذكر تسمى "الجراثيم" ، وتبقى الجراثيم مجمدة النشاط طوال سنين عديدة ، وتكتسب قدرة غير عادية على تحمل ظروف قاسية لا تتحملها الخلية الخضرية النشطة ، مثال ذلك أنها تبقى حية حتى عند نقطة الغليان ، وبمجرد امتصاصها الماء تستأنف الخلية نشاطها كما كانت قبل الجفاف ، وعندئذ لا تتحمل الظروف البيئية القاسية كما كانت وهى جافة .

وتتميز طريقة التجفيد فى حفظ المزارع الميكروبية بطول مدة بقاء المزارع محتفظة بحيويتها مع ضآلة فرصة حدوث تغيرات فى صفاتها إلى جانب صغر أوعية حفظ المزارع مما يتيح تخزين المزارع المجفدة فى مساحة تخزين صغيرة للغاية .



شكل ٧-٧ . مزارع بكتيرية مجفدة .

٤- التجفيف Drying :

يتم حفظ الكثير من البكتيريا كالأكتينوميسيتات والفطريات المكونة للجراثيم بالتجفيف بالهواء ببطء على درجة حرارة الوسط على سطح التربة المعقمة أو السليكا جل أو الكرات الزجاجية .

وفى طريقة الحفظ بالتجفيف فى التربة توضع التربة المنخولة فى أنابيب اختبار إلى نصف حجمها وتعقم فى جهاز الأوتوكلاف ، وبعد أن تختبر لتمام وكفاءة تعقيمها، يصب عليها معلق الخلايا أو معلق الجراثيم ، وتترك على درجة حرارة الغرفة لمدة ٧-١٠ أيام ، ثم تحفظ فى الثلاجة لمدة طويلة دون تغيير فى حيويتها ، وتعتبر هذه الطريقة أفضل وسيلة لحفظ مزارع فطريات الفيوزاريم Fusarium .

وفى طريقة التجفيف على السليكاجيل تعقم الأنابيب المملؤة لمنتصفها بالسليكا جيل بالحرارة الجافة وتحفظ فى أوعية محكمة الغلق ، ثم يضاف معلق الجراثيم أو الخلايا الخضرية للمزارع المراد حفظها إلى أنابيب السليكا جل ، وترج الأنابيب لتوزيع اللقاح على حبيبات السليكاجيل ، وبعد جفاف الأنابيب على ٢٥°م تخزن الأنابيب فى أوعية مغلقة بمكان جاف .

وفى طريقة التجفيف على حبيبات البورسلين التى تلاءم الكثير من أنواع البكتريا ، يتم تعقيم أنابيب زجاجية صغيرة بها بضعة حبيبات بورسلين فى الأوتوكلاف ، وتنقل الحبيبات لطبق بترى معقم وتلقح كل حبيبة بنقطة من معلق الخلايا البكتيرية ، ثم تعاد الحبيبات الملقحة مرة أخرى للأنابيب ، وتغطى الأنابيب بدون إحكام ، وتجفف تحت تفريغ ، ثم تفصل الحبيبات عن بعضها ، وتخزن الأنابيب فى أوعية مغلقة بمكان جاف .

٥- التجميد :

يمكن باستخدام طريقة التجميد حفظ المزارع الميكروبية لفترة طويلة ، والأساس فى هذه الطريقة هو خفض النشاط الحيوى للمزارع الميكروبية المراد حفظها من خلال خفض درجة حرارتها ومحتواها الرطوبى .

وهناك نوعين من التجميد هما :

١- التجميد العادى :

تحفظ أنابيب المزارع الميكروبية السائلة بحالة مجمدة فى فريزر عادى على درجة حرارة مابين -٥ م إلى -٢٠°م ، وتتميز طريقة التجميد العادى ببساطتها ، وشيوعها ، وعدم احتياجها لأى معدات أو أجهزة خاصة .

ويؤخذ على طريقة التجميد العادى عدم ملائمتها لحفظ معظم الميكروبات لمدة أكثر من ١-٢ سنة ، كما قد يؤدى التجميد لتلف الخلايا وتقليل حيويتها ، لذلك يراعى أن يكون محتوى الوسط من المواد القطبية عند أقل حد ممكن ، وكذلك يرعى صهر المزارع المتجمدة بسرعة عند إعادة استخدامها مرة أخرى .

٢- التجميد الفائق Ultrafreezing :

تجمد الخلايا الميكروبية وتخزن على درجة حرارة منخفضة جداً بوسيلتين ، الأولى استخدام فريزر ميكانيكى على درجة حرارة بين -٥٠°م إلى -٨٠°م ، والثانية استخدام فريزر خاص بالنيتروجين السائل على درجة حرارة - ١٥٦°م إلى - ١٩٦°م.

وعند استخدام الفريزر الميكانيكى تعلق الخلايا فى طورها اللوغاريتمى فى وسط سائل يحتوى على الجليسرول والداى ميثيل سلفوكسيد ؛ حيث تساعد هذه المواد على الحفاظ على حيوية الخلايا والحد من الضرر الناشئ عن التجميد والحماية من البرودة الشديدة، ويحفظ المعلق الخلوى بأنابيب معقمة فى فريزر ميكانيكى على ٧٠°م، وتخفض حرارة المزارع تدريجياً بمعدل ١°م فى الدقيقة حتى ٢٠°م ، ثم تخفض بأسرع مايمكن إلى درجة الحفظ ، ومن الممكن حفظ الكثير من مزارع البكتيريا والفطريات لمدة خمسة سنوات بهذه الطريقة .

أما عن الحفظ فى درجة حرارة النيتروجين السائل فقد أدى سهولة الحصول على النيتروجين السائل إلى تقديم طريقة جيدة لحفظ المزارع الميكروبية ، حيث تحفظ هذه المزارع فى أمبولات بها أوساط غذائية تحتوى (بالحجم) على ١٠% جليسرول

أو ٥% داى ميثيل سلفوكسيد يحمى الخلايا من الضرر من خلال منع تكون بلورات ثلجية أثناء عملية التجميد وذلك بداخل زجاجيات محكمة اللحام تماماً فى جهاز تجميد يعمل بالنيتروجين السائل حيث تتناقص درجة حرارتها بمعدل ١-٢°م فى الدقيقة حتى تصل إلى - ٥٠°م ، ثم تخزن الأمبولات على - ١٥٦-١٩٦°م فى مبرد النيتروجين السائل .

ولا تقل طريقة الحفظ باستخدام النيتروجين السائل كفاءة عن طريقة الحفظ بالتجفيد ، بل على العكس فإن كثير من العينات لا تصلح طريقة التجفيد للاحتفاظ بها ، ويكون البديل حينئذ هو الحفظ بطريقة النيتروجين السائل ، تصل مدة الاحتفاظ بالمزارع بواسطة طريقة النيتروجين السائل إلى فترات غير محدودة .

٦- حفظ الميكروبات المهندسة وراثياً :

هناك صعوبة فى حفظ الميكروبات المهندسة وراثياً والتى تحمل بلازميدات مهجنة بقطع من الحامض النووى د.ن.أ ، إذ أن هذه المزارع تكون أقل ثباتاً من الناحية الوراثية ، وقد تفقد بلازميداتها الغريبة ، ولايؤثر فقد البلازميدات على حيوية الخلايا بل على العكس قد تكون أسرع فى نموها ، ومن هنا يجب الاحتياط بشدة والحرص على عدم فقد البلازميدات .

وتنمية السلالات الميكروبية الحاملة لجينات المقاومة للمضادات الحيوية فى وجود تلك المضادات الحيوية المقاومة لها يسمح بنمو وتكاثر السلالات المحتوية على البلازميدات فقط .

ويوصى بحفظ المزارع الميكروبية المهندسة وراثياً فى أوساط غذائية تحتوى على العامل الانتخابى الملائم للبلازميد الموجود بمثل هذه المزارع

المراجع :

Hunter-Cevera J.C., A. Belt (1996). Maintenance cultures for biotechnology and industry. Academic, London.

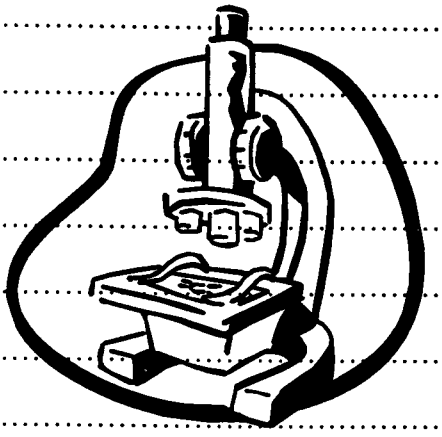
Kirsop, B.E., A. Doyle (eds) (1991). Maintenance of microorganisms and cultured cells. Academic, London.

Kirsop, B.E., C.P. Kurtzman, D. Hawksworth, L.R. Hill, A. Doyle, R. Hay (eds) (1989-1990). Living sources for biotechnology. Vols 1-4. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

Smith, D., A.H.S. Onions (1994). The preservation and maintenance of living fungi. Int. Mycological Institute. CAB Int., Egham.

Sugawara, H., S. Miyazaki (1999). World Directionay of collections of cultures of microorganisms. WFCC_MIRCEN-WDC, Mishima.

Uruburu, F. (2003). History and services of culture collections. Int. Microbiol. 6, 101-103.



ملحق ١ . نظام مرجع برجى لتقسيم البكتيريا (الطبعة الثانية) .

Organization of *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition

Taxonomic Rank

Volume 1. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria

Domain *Archaea*
- Phylum A1. *Crenarchaeota*
  - Class I. *Thermoprotei*
- Phylum A11 *Euryarchaeota*
  - Class I. *Methanobacteria*
  - Class II. *Methanococci*
  - Class III. *Halobacteria*
  - Class IV. *Thermoplasmata*
  - Class V. *Thermococci*
  - Class VI. *Archaeoglobi*
  - Class VII. *Methanopyri*

Domain Bacteria
- Phylum BI. *Aquificae*
  - Class I. Aquificae
- Phylum BII. *Thermotogae*
  - Class I. Thermotogae
- Phylum BIII. *Thermodesulfobacteria*
  - Class I. *Thermodesulfobacteria*
- Phylum BIV. "*Deinococcus-Thermus*"
  - Class I. *Deinococci*
- Phylum BV. *Chrysiogenetes*
  - Class I. *Chrysiogenetes*
- Phylum BVI. *Chloroflexi*
  - Class I. *Chloroflexi*
- Phylum BVII. *Thermomicrobia*
  - Class I. *Thermomicrobia*
- Phylum BVIII. *Nitrospira*
  - Class I. *Nitrospira*
- Phylum BIX. *Deferribacteres*
  - Class I. *Deferribacteres*

Phylum BX. *Cyanobacteria*
Class I. *Cyanobacteria*
Phylum BXI. *Chlorobi*
Class I. *Chlorobi*

Volume 2. Domain Bacteria: The Proteobacteria
Phylum BXII. Proteobacteria
Class I. *Alphaproteobacteria*
Class II. *Betaproteobacteria*
Class III. *Gammaproteobacteria*
Class IV. *Deltaproteobacteria*
Class V. *Epsilonproteobacteria*

Volume 3. Domain Bacteria: The Low G + C Gram-Positive Bacteria
Phylum BXIII. *Firmicutes*
Class I. *Clostridia*
Class II. *Molicutes*
Class III. *Bacilli*

Volume 4. Domaqin Bacteria: The High G + C Gram-Positive Bacteria
Phylum BXIV. *Actinobacteria*
Class I. *Actinobacteria*
Class II. *Flavobacteria*
Class III. *Spingobacteria*

Volume 5. Domain Bacteria: The Planctomycetes, Spirochaetes, Fibrobacteres, Bacteriodetes, and Fusobacteria
Phylum BXV. *Planctomycetes*
Phylum BXVI. *Chlamydiae*
Phylum BXVII. *Spirochaetes*
Phylum BXVIII. *Fibrobacteres*
Phylum BXIX. *Acidobacteria*
Phylum BXX. *Bacteroidetes*
Phylum BXXI. *Fusobacteria*
Phylum BXXII. *Verrucomicrobia*
Phylum BXXIII. *Dictyoglomi*
Phylum BXXIV. *Gemmatimonadetes*

ملحق ٢ . جوائز نوبل لأبحاث فى مجال الميكروبيولوجى خلال الخمسين عاماً الأخيرة .

السنة	العالم	البحث
١٩٥٧	D. Bovet (Italy)	لكتشاف أول مضاد للهيستامين .
١٩٥٨	G.W. Beadle (USA) E.L. Tatum (USA) J. Lederberg (USA)	الوراثة الميكروبية .
١٩٥٩	S. Ochoa (USA) A. Kornberg (USA)	لكتشاف الإنزيمات المحفزة لتخليث الأحماض النووية .
١٩٦٠	F.M. Burnet (Australia) P.B. Medawar (Great Britain)	لكتشاف التحمل المناعى المكتسب للأنسجة المنقولة .
١٩٦٢	F.H.C. Crick (Great Britain) J.D. Watson (USA) M. Wilkins (Great Britain)	لكتشافات متعلقة بالحامض النووى د ن أ .
١٩٦٥	F. Jacob (France) A. Lwoff (France) J. Monod (France)	لكتشافات عن التنظيم الجينى .
١٩٦٦	F.P. Rous (USA)	لكتشاف فيروسات السرطان .
١٩٦٨	R.W. Holley (USA) H.G. Khorana (USA) M.W. Nirenberg (USA)	حل الشفرة الوراثية .
١٩٦٩	M. Delbuck (USA) A.D. Hershey (USA) S.E. Luria (USA)	لكتشافات متعلقة بالفيروسات والإصابة الفيروسية للخلايا .
١٩٧٢	G. Edelman (USA) R. Porter (Great Britain)	أبحاث على تركيب المضادات الحيوية .
١٩٧٥	H. Temin (USA) D. Baltimore (USA) R. Dulbecco (USA)	لكتشاف تخليق حامض د ن أ المعتمد على حامض ر ن أ بواسطة فيروسات الأورام ر ن أ ، تكاثر فيروسات الأورام د ن أ .
١٩٧٦	B. Blumberg (USA) D.C. Gajdusek (USA)	آلية منشأ وانتشار فيروس الالتهاب الكبدى ب ، أبحاث على الاصابات الفيروسية البطيئة .
١٩٧٧	R. Yallow (USA)	تطوير تكنيك الـ radioimmunoassay .
١٩٧٨	H.O. Smith (USA) D. Nathans (USA) W. Arber (Switzerland)	لكتشاف إنزيمات القطع واستخدامها فى حل مشاكل الوراثة الجزيئية .
١٩٨٠	B. Benacerraf (USA) G. Snell (USA) J. Dausset (France)	لكتشاف انتيجينات التوافق الهستولوجى .

	B. Berg (USA) W. Gilbert (USA) & F. Sanger (Great Britain)	تطوير تقنية إعادة صياغة الحامض النووى د ن أ (Berg) ، وتقنية تتابع الحامض النووى د ن أ (جائزة الكيمياء)
١٩٨٢	A. Klug (Great Britain)	تطوير الميكروسكوب الإلكترونى الكريستالوجرافى وتوضيح تركيب الفيروسات ومعقدات البروتين – الحمض النووى الأخرى (جائزة الكيمياء) .
١٩٨٤	C. Milstein (Great Britain) G.J.F. Kohler (Germany) N.K. Jerne (Denmark)	تطوير تكنيك تكوين الأجسام المضادة الأحادية (Kohler, Milstein) ، والعمل النظرى فى المناعة (Jerne) .
١٩٨٦	E. Ruska (Germany)	تطوير الميكروسكوب الإلكترونى الناقل (جائزة الفيزياء) .
١٩٨٧	S. Tonegawa (Japan)	الأساس الوراثى لتوليد تنوع الجسم المضاد .
١٩٨٨	J. Deisenhofer, R.Huber, and H. Michel (Germany)	بلورة ودراسة مركز التفاعل الضوئى من الغشاء البكتيرى .
	G. Elion (USA) G. Hitchings (USA)	تطوير عقاقير لعلاج السرطان والملاريا والأمراض الفيروسية .
١٩٨٩	J.M. Bishop (USA) H.E. Varmus (USA)	لكتشاف الـ oncogenes .
	S. Altman (USA) T.R. Cech (USA)	لكتشاف حمض catalytic RNA .
١٩٩٣	K.B. Mullis (USA)	لختراع تفاعل البوليمريز المتسلسل .
	M. Smith (USA)	تطوير التطفر الموجه الموقع
	R.J. Roberts USA P.A. Sharp (USA)	لكتشاف جينات الـ split .
١٩٩٦	P.C. Doherty (Australia) R.M. Zinkkernagel (Swizerland)	لكتشاف الآلية التى تتعرف بها الـ T lymphocytes على الخلايا المصابة بالفيروس .
١٩٩٧	S. Prusiner (Australia)	لكتشاف البريونات
٢٠٠٣	R. MacKinnon (Australia)	تركيب بروتينات قنوات البوتاسيوم والكلوريد البكتيرية .
	P. Agre (Australia)	لكتشاف الـ aquaporins .
٢٠٠٥	B. Marshall (Australia) R. Warren (Australia)	لكتشاف دور Heliobacter pylori فى إحداث القرح المعوية .

ملحق ٣ . بعض المراكز الرئيسية العالمية لتجميع المزارع البكتيرية .

Some of the world's major bacterial culture collections.

Collection	Address
ATCC	American Type Culture Collection 10801 university Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 USA Telephone: 703-365-2700; Fax: 703-365-2701 Web site.org/
BCCM/LMG	Belgian Coordinated Collections of Microorganisms Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (RUG) K.L.Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent BELGIUM Telephone: 32-9-264 51 o8; Fax: 32-9-264 53 46 E.mail: bccm.Img@rug.ac.be Web site: www.belspo.be/bccm/
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) Mascheroder Weg Ib, D-38124 Braunschweig GERMANY Telephone: 49-531-2616 Ext. 0; Fax: 49 531-2616 Ext, 418 E-mail: help@dsmz.de Web site: www.dsmz.de
IFO	Institute for Fermentation, Osaka 17-85 Juso-Honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka, 532 JAPAN Telephone: 81-6-300-6555; Fax:81-6-300-6814 Web site: wwwsoc.nacsis.ac.jp,/ifo/index.html.
NRRL	Agricultural Research Service Culture Collection National Center for Agricultural Utilization

	Research 1815 North University Street, Peoria, IL 61604 USA Telephone: 309-681-6560; Fax: 309-681-6672 E-mail: nrrl@mail.ncaur:usda.gov Web site: nrrl.ncaur.usda.gov.
JCM	Japan Collection of Microorganisms RIKEN Hirosawa, Wako-shi, Saitama, 351-01 JAPAN Telephone: 81-48-462-1111; Fax:81-48-462-4617 Web site: www.jcm.riken.go.jp.
NCIMP	National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Ltd. 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB24 3RY Scotland UNITED KINGDOM Telephone: 44-0-1224 273332; Fax: 44-0-1224 487658 E-mail: ncimb@abdn.ac.uk Web site:www.ncimb.co.uk
NCTC	National Collection of Type Cultures PHLS Central public Health Laboratory 61 Colindate Avenue, London, NW9 5HT UNITED KINGDOM Telephone: 44-181-2004400, Fax: 44-181, 2007874 Web site: www.ukncc.co.uk

ملحق ٤ . تكنيكات التصنيف العامة وتقسيم البكتيريا

تتضمن التكنيكات المستعملة فى تعريف وتصنيف البكتيريا مايلى :

الشكل المظهرى الميكروسكوبى :

يشمل شكل وحجم الخلية ، ونتيجة تفاعلها مع صبغ جرام والصبغ الصامد للأحماض ، ووجود التركيبات الخاصة مثل الجراثيم الداخلية والكابسول والحبيبات ، ويوضح المجهر الإلكترونى نواحى تركيبية إضافية مثل الجدار الخلوى والأسواط والبيلى والفمبريا .

الشكل المظهرى الماكروسكوبى :

يشمل مظهر المستعمرات مثل الشكل والارتفاع والحجم واللون والشفافية والقوام والسطح وسرعة النمو وشكل النمو فى الأوساط الغذائية المختلفة .

الصفات الفسيولوجية / البيوكيماوية :

يعتمد على الإنزيمات والصفات البيوكيماوية الأخرى للبكتيريا مثل وجود إنزيمات متخصصة وتقدير الأنشطة الغذائية والأيضية ، مثل تخمير السكريات المختلفة ، وهضم كل من البوليمرات المعقدة كالبروتينات والسكريات العديدة ، والحساسية للمضادات الحيوية .

التحليل الكيميائى :

تحليل أنواع المواد الكيميائية المتخصصة التى يحتوى عليها الميكروب ، مثل الببتيدات بالجدار الخلوى والليبيدات فى الغشاء السيتوبلازمى .

التحليل السيرولوجى :

يتكشف عن البكتيريا جزيئات تسمى الأنتيجينات antigens يتعرف عليها الجهاز المناعى ، وأحد الاستجابات المناعية للأنتيجينات هو إنتاج الأجسام المضادة antibodies التى ترتبط بالأنتيجينات ، وهذه الاستجابة متخصصة بمعنى أن الأجسام المضادة يمكن أن تستخدم كوسيلة لتعريف البكتيريا فى العينات والمزارع .

التحليل الوراثى والجزيئى :

يعتبر فحص المادة الوراثية بذات أهمية قصوى فى تعريف وتصنيف البكتيريا .

تركيب قواعد الجوانين + السيتوزين :

تدل نسبة الجوانين والسيتوزين مقارنة بمحتوى الأدينين والثيمين فى الحامض النووى د ن أ على القرابة لأنها صفة لا تتغير بسرعة ، وعندما تكون هناك فروق معنوية فى هذه النسب فيتوقع أن تكون هذه الميكروبات ذات قرابة وراثية بعيدة .

تحليل حامض د ن أ بالمجسات الوراثية :

يمكن تعريف الأنواع البكتيرية بتحليل مادتها الوراثية ، وذلك باستخدام أجزاء صغيرة من الحامض النووى د ن أ (أو ر ن أ) يطلق عليها مجسات تتكامل مع تتابعات متخصصة من حامض د ن أ من ميكروب معين ، يرتبط حمض د ن أ غير المعروف موضع الاختبار من عينة أو مزرعة بسطح خاص ، وبعد إضافة العديد من المجسات المختلفة ، يفحص الطبق لعلامات مرئية تدل على أن المجسات أصبحت مثبتة بحمض د ن أ موضع الاختبار ، ويدل ارتباط المجسات على مناطق حمض د ن أ موضع الاختبار على تطابق تام مما يجعل التعريف ممكناً .

تتابع الحامض النووى وتحليل حمض ر ن أ الريبوسومى :

يعتبر تتابع قواعد النيتروجين فى حمض ر ن أ الريبوسومى كمكون رئيسى للريبوسومات من أهم الأدلة القيمة للعلاقات التطورية ، فالريبوسومات لها نفس الوظيفة أى تخليق البروتين فى كل الخلايا ، وتميل لأن تبقى ثابتة فى محتواها من الأحماض النووية لفترات طويلة ، وهكذا فإن الاختلافات الكبيرة فى التتابع أو البصمة لحمض ر ن أ الريبوسومى من المحتمل أن تدل على مسافة بين الأسلاف .

ملحق ٥ . تصنيف الفطريات .

Domain: Eukarya

Kingdom: Fungi

Phylum: *Blastocladiomycota*

Phylum: *Chytridiomycota*

Phylum: *Glomeromycota*

Phylum: *Microsporidia*

Phylum: *Neocallimastigomycota*

Subkingdom: Dikarya (inc. *Deuteromycota*)

Phylum: *Ascomycota*

Class: *Pezizomycotina*

Class: *Saccharomycotina*

Class: *Taphrinomycotina*

Phylum: *Basidiomycota*

Class: *Agricomycotina*

Class: *Pucciniomycotina*

Class: *Ustilaginomycotina*

Subphyla Incertae sedis

Subphylum: *Entomophthoromycotina*

Subphylum: *Kickxellomycotina*

Subphylum: *Mucoromycotina*

Subphylum: *Zoopagomycotina*

ملحق ٦ . ملخص لتطور التقسيم البيولوجى .

Summary of early concepts, five kingdoms, six kingdoms and recent advances in biological taxonomy

Linnaeus 1735 2. kingdoms	Haeckel 1866 3 kingdoms	Chatton 1925 2. empires	Copeland 1938 4. kingdoms	Whittaker 1969 5 kingdoms	Woese et al. 1977 6. kingdoms	Woese et al. 1990 3. domains
(not treated)	Protista	Prokaryota	Monera	Monera	Eubacteria	Bacteria
					Archaebacteria	Archaea
			Protista	Protista	Protista	
Vegetabilia	Plantae	Eukaryota		Fungi	Fungi	Eukarya
			Plantae	Plantae	Plantae	
Animalia	Animalia		Animalia	Animalia	Animalia	

ملحق ٧ . كشاف بالأسماء العلمية للميكروبات .

Index

A

Absidia griseola 178
Acetobacter spp 30
Acetobacter suboxydans 103
Acetomonas 102
Achromobacter liquidium 188
Acidobacterium 141
Actinomyces 127
A. bovis 127
A. israelii 128
Agaricus 157
A. bisporus 157
A. campestris 157
Agrobacterium 101, 103
Agrobacterium tumefaciens 103
Alcaligenes faecalis 198
Altemaria tenuis 197
Anabaena spiroides 98
Aquifex 91
Archaeoglobus 90
Arthobacter globiformis 179, 193
Ashbya gossypii 156
Aspergillus 152, 173, 175, 192
A. ficcum 181
A. itaconicus 153
A. oryzae 28, 153, 180, 182, 191, 199, 200
A. nidulans 187
A. niger 152, 174, 178, 182, 190, 193, 199, 200
A. sojae 191
A. terrus 153
A. wentii 153
Aureobasidum pullatans 194
Azospirillum 102

B

Bacillus 46, 118, 173, 174, 179, 181, 182, 199
B. anthracis 118, 119
B. amyloliquefaciens 175
B. brevis 120
B. cereus 119, 176
B. circulans 176, 193
B. coagulans 179, 199
B. licheniformis 174, 175, 179, 181, 199
B. macerans 180
B. megaterium 176, 180
B. megaterium var *phosphaticum* 120
B. polymyxa 120, 176
B. sphaericus 119, 198
B. stearothermophillus 178, 180
B. subtilis 120, 181, 184, 199, 200
B. subtilis var. *amyloliquiefaciens* 175
B. thuringiensis 119
Bacteroides 140, 142
Bdellovibrio 114
Beauveria bassiana 27
Bifidobacterium 136
B. bifidum 136
Borrelia 140
Botrytis cinera 193
Bradyrhizobium japonicum 70
Brevibacterium ammoniagenes 188
Burkholderia 109
B. cepacia 109

C

Candida 165
Candidatus Brocadia anammoxidans 137, 138
Campylobacter 115
C. fetus 115
C. jejuni 115
Ceratocystis ulmi 152
Chaetomium thermophile 180
Chlamydia 139
Chlamydiophila 139
C. pneumoniae 139
Chlorobium 100
Chlorobium limicola 100
Chloroflexus 95, 96
Chondrococcus columnaris 141
Chroococcus turgidus 98
Chytridiopsis 162

Circinella muscari 178
Claviceps purpurea 152, 155, 156.
Clostridium 116, 180
Cl. acetobutylicum 117
Cl. tetani 117
Cl. butyricum 117
Coriolus versicolor 197, 198
Corynebacterium 129
C. diphtheriae 130
C. glutamicum 131
Cryphonectria parasitica 187
Cylindrospermum 99
Cytophaga 141

D
Deinococcus 92
D. radiodurans 93
Desulfovibrio 114
Desulfurococcus 89
Dictyoglomus 143
D. thermophilum 143

E
Encephaolitozoon cuniculi 162
Endogone 149
Endothia parasitica 187
Enterobacter 65, 180
E. aerogenes 112, 179
Enterococcus faecalis 125
Enterocystozoon bieneusi 162
Entomophthora 150
Eremothecium gossypii 156
Erisyphe graminis 152
Escherichia 65
E. coli 35, 51, 52, 70, 94, 111, 112, 187, 200
Euphorbia 193

F
Fibrobacter 140
F. succinogenes 140
Flavobacterium 141, 175, 179
F. arborescens 175
Flexibacter 141
F. columnaris 141
Frankia 134
Fuosobacterium 142
F. nucleatum 142
Fusarium
F. incarnatum 154
F. moniliforme 154, 179
F. semitectum 154

G
Gemmata 137
G. obscuriglobus 138
Geobacillus stearothermophilus 180
Gibberella fujikuroi 154
Glomus 159
Gluconobacter 102
Gluconobacter suboxydans 103
Glugea 162

H
Halobacterium
H. salinarium 87, 88
Halococcus 88
Helicobacter 115
Hydrogenobacter 91

K
Klebsiella 112
K. aerogenes 199
K. jerogenes 179
K. pneumonia 179
Kluyveromyces 187
K. fragilis 178

L
Lactobacillus
L. bifidus 136
L. casei 123
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* 29, 123
L. delbrueckii subsp delbrueckii 123
L. plantarum 123
L. sanfranciscensis 70

Lactococcus 124
L. lactis subsp. *lactis* 124
Leptospira 140
Leuconostoc 123, 124, 179
L. mesenteroides 124

M
Metarhizium anisopliae 27
Methanobacterium 85
Methanococcus 85
Methanomicrobium 85
Methanosarcina 85
Methyllobacterium organophilum 197
Micrococcus 128, 199
M. luteus 128
Micromonospora 131
Microspora 161
Microsporum audouinii 154
Mucor 149, 150
M. miebei 187, 200
M. pusillus 187
Mycobacterium 194, 198
Mycoplasma 118

N
Neisseria 110
N. gonorrhoeae 110
Neurospora 152
N. crassa 152
Nitrobacter 30
N. winogradskyi 47, 48
Nitrosomonas 30
Nocardia otitidis-caviarum 197
Nosema 162
Nostoc 98

O
Oscillatoria 98

P
Pediococcus 124
P. soyae 28
Penicillium
P. emersonii 200
P. camemberti 155
P. chrysogenum 155
P. funiculosam 179
P. glaucum 190
P. griseofulvin 155
P. lilacinum 179
P. nigricans 155
P. notatum 155, 190
P. roqueforti 155
Pilobolus 149
Planctomyces 137
Pleurotus 157
Propionibacterium 131
P. acnes 131
P. shermanii 131
Proteus 65,
P. vulgaris 112,
Pseudomonas 46, 66, 109, 111, 112, 177, 194
P. aeruginosa 112, 113
P. dacunhae 188
P. denitrificans 194
P. fluorescens 112
P. putida 112, 189, 192, 194
P. solanacearum 109
P. syringae 112, 113

R
Ralstonia
R. solanacearum 109
Rhizobium 23, 66, 101, 104, 105
R. meliloti 70
Rhizopus 149, 175, 192
R. arrhizus 190
R. microsporus var. oligosporus 150
R. nigricans 149, 150, 151
R. oligosporus 150, 150
R. oryzae 182, 200
Rhodospirillum 102
Rickettsia 101, 106
R. prowazekii 107
R. typhi 107
R. rickettsii 107

S
Saccharomyces 152, 156, 178
S. boulardii 165
S. carlsbergensis 178
S. cerevisiae 35, 108, 156, 164, 187
S. lactis 200
S. roxuii 28
Salmonella 65
S. typhimurium 198
Schizosaccharomyces 152
Scutellospora castanea 160
Shigella 65,
Sporocytophaga 141
Sporotrichum
S. pulverulentum 180
S. thermophilic 180
Staphylococcus 120
S. aureus 121
Streptococcus 124, 125, 199
S. cremoris 124
S. faecalis 125
S. lactis 66, 124
S. lactis subsp. *diacetyllactis* 66
S. salivarius subsp. *thermophilus* 29, 185
Streptomyces 132, 174, 175, 177, 199, 200
S. albus 199
S. avermitilis 133
S. cerevisiae 199
S. flavogriseus 175
S. fimbriatus 197
S. griseus 132, 133
S. ipomoeae 133
S. scabies 133
Streptosporangium 134
S. album 134
Sulfolobus 40, 83, 89
Synechococcus lividus 97

T
Thermomonospora curvata 180
Thermoplasma 89
Thermotoga 91
Thermus 92
T. aquaticus 94
Thiobacillus 109
Thiomargarita namibiensis 15, 16
Tourulopsis 165
Trametes versicolor 197
Treponema 140
T. pallidum 139
Trichoderma 192
T. viride 180, 193
T. reesei 187
Tropheryma whippelii 76

U
Ustilago
U. maydis 158, 159

V
Verrucomicrobium spinosum 143
Vibrio furnissii 70

Y
Yarrowia lipolytica 165

Z
Zymomonas 108
Z. mobili 108

المحتويات

الفصل الأول : التنوع الميكروبى

ماهية الميكروبات ١٠
ماهية التنوع الميكروبى ١٠
١. البكتيريا ١٤
٢. الفطريات ١٩
نظم البكتيريا والفطريات ٢١
المزارع المختلطة ٢٢

الفصل الثانى : البروكاريوتات والأيوكاريوتات

مفهوم البروكاريوتات ٢٨
مجاميع البروكاريوتات ٢٩
١- الأركيا ٣٢
٢- البكتيريـــا ٣٤
صبـــغ جـــرام ٣٤
الميتابوليزم ٣٦
١- المعيشة الكيموهيتيروتروفية ٣٧
٢- المعيشة الكيموليثوتروفية ٤١
٣- المعيشة الضوئية ٤١
الهالواركيا ٤٤
أساليب توليد الطاقة ٤٤

الفصل الثالث : أهمية تعريف وتصنيف الكائنات الحية الدقيقة

مقدمة ٥٠
التصنيف الطبيعى ٥١
التصنيف التطورى ٥١

التصنيف الوراثى ٥٢
التصنيف العددى..... ٥٢
الرتب التقسيمية..... ٥٣
التقسيم والتطـــور ٥٤
الخصائص الكلاسيكية ٥٦
الخصائص المظهرية..... ٥٦
الخصائص الفسيولوجية والأيضية..... ٥٧
الخصائص البيئية..... ٥٧
التحليل الوراثى..... ٥٨
أ. التحول..... ٥٨
ب. التزاوج ٥٩
ج. البلازميدات ٥٩
الخصائص الجزيئية..... ٦١
١- تركيب قواعد الحامض النووى..... ٦١
٢- تزاوج الحامض النووى..... ٦٢
٣- تتابع الحمض النووى..... ٦٢
٤- البصمة الجينومية ٦٤
٥- تتابع الأ حماض الأمينية ٦٤
٦- الساعات الجزيئية ٦٦
٧- أشجار النسب ٦٦
تحليل المجتمعات الميكروبية فى الأوساط الطبيعية :..... ٦٨
الطرق القائمة على تتابع الحامض النووى فى الميكروبيولوجيا البيئية :..... ٦٨
١- مجسات الحامض النووى..... ٦٨
٢- تفاعل البوليمريز المتسلسل..... ٦٩
٣- تتبع بندقية الجينوم الكامل..... ٦٩

الفصل الرابع : التنوع التقسيمى للبكتيريا المفيدة

الأركيـــا والبكتيريا شديدة التفرع والبكتيريا الضوئية ٧٨
أولاً : مجموعة الأركيـــا..... ٧٨

ثانياً : مجموعة البكتيريا ٨٥
البروتيوبكتيريا ٩٤
١- الألفا بروتيوبكتيريا ٩٤
٢- البيتا بروتيوبكتيريا ١٠١
٣- الجاما بروتيوبكتيريا ١٠٣
٤- الدلتا بروتيوبكتيريا ١٠٦
٥- الابسيلون بروتيوبكتيريا ١٠٧
البكتيريا الموجبة لجرام المنخفضة فى الجوانين + السيتوزين ١٠٨
أولاً : الكلوستريديا ١٠٨
ثانياً : الموليكيوتس ١٠٩
ثالثاً : الباسيلاى ١١٠
الأكتينوبكتيريا ١١٧
البلانكتوميسيتات والإسبيروكيتات والفبريوبكتيرات والبكتيرويدتات والفيوزوبكتيريا ... ١٢٧

الفصل الخامس : الفطريات

تصنيف الفطريات ١٣٦
الفطريات الزيجية ١٣٧
الفطريات الأسكية ١٣٩
الفطريات الباذيدية ١٤٤
الأصداء والتفحمات ١٤٦
الجلوميروميكوتا ١٤٧
الميكروسبوريديميكوتا ١٤٨
الخمائر ١٥٠

الفصل السادس : التنوع الميكروبى كمستودع غنى بالإنزيمات

إنتاج الإيثانول التخميرى ١٦٠
استخدام الإنزيمات فى الصناعات الغذائية ١٦٠
صناعة النشا ١٦٠
المنظفات البيولوجية ١٦٧

صناعة النسيج ١٦٩
إنزيمات صناعة الألبان ١٧٠
الأحماض العضوية ١٧٢
الأحماض الأمينية ١٧٣
مضادات الأكسدة ١٧٤
تصنيع البروتين ١٧٥
عوامل النكهة ١٧٦
تصنيع الفاكهة ١٧٦
استخلاص المنتجات الطبيعية ١٧٧
العـــلاج الحيـــوى ١٧٨
صناعـــة الجلـــود ١٧٩
صناعة الورق ١٧٩
المضادات الحيوية ١٧٩
إنزيمات الهندسة الوراثية ١٨٠
تطبيقات أخـــرى للإنزيمات ١٨١

الفصل السابع : توفير وحفظ الكائنات الحية الدقيقة

عـــزل الميكروبـــات ١٩٠
١- طريقـــة الأطبـــاق ١٩١
٢- المزرعـــة المهتـــزة ١٩٢
٣- عزل خلية واحدة ١٩٣
٤- العزل على بيئة انتقائية ١٩٣
طـــرق الحفظ ١٩٤
١- النقل على فترات لبيئات جديدة ١٩٥
٢- الحفظ تحت غطاء من الزيت المعدنى ١٩٥
٣- التجفيـــد ١٩٦
٤- التجفيف ١٩٨
٥- التجميد ١٩٨
٦- حفظ الميكروبات المهندسة وراثياً ٢٠٠