

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ BUCUREȘTI**  
**FACULTATEA DE ÎMBUNĂTĂȚIRI FUNCiare ȘI INGINERIA MEDIULUI**  
**SPECIALIZAREA PROTECȚIA MEDIULUI**

**MICROBIOLOGIE - NOTE DE CURS**

**Conf. Dr. Irina Grebenișan**

**MORFOLOGIA BACTERIILOR**

**1. Bacteriile sferice (cocii)** au formă sferică, ovoidă, elipsoidală, reniformă, diametrele celulei fiind aproximativ egale. Cocii se pot grupa în șase subtipuri morfologice în funcție de poziția celulelor fiice după diviziune:

- coci simpli** sau izolați;
- diplococi** celulele sunt grupate câte două – *Streptococcus pneumoniae*;
- streptococi** celulele formează lanțuri *Streptococcus thermophilus*;
- tetracoci** celulele sunt grupate câte patru – *Micrococcus tetragenis*;
- sarcina** celulele sunt grupate în cuburi – *Sarcina lutea*;
- stafilococi** celulele sunt grupate sub formă de ciorchine – *Staphylococcus aureus*

**2. Bacterii cilindrice (bacili)** au formă de bastonașe care pot fi filamentoase sau sferic-ovale – cocobacili – *Bacillus subtilis*, *Clostridium sp.*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas sp.* Bacilii pot fi drepecți sau ușor curbați cu capete drepte sau rotunjite, pot fi izolați sau grupați câte doi – diplobacili, în lanțuri – streptobacili, palisadă (ca un gard), rozetă sau stea.

**3. Bacterii spiralate sau elicoidale** cuprind trei subtipuri morfologice:

- vibriionul** în formă de virgulă – *Vibrio cholerae*;
- spirilul** în formă de spirală cu spire rigide – *Spirillum volantum*;
- spirocheta** în formă de spirală cu spire flexibile – *Treponema*, *Leptospira*

**4. Bacterii filamentoase** sunt reprezentate de actinomicete și prezintă asemănări morfologice cu fungii, formează hife cu tendință de ramificare și spori. Bacteriile din genul *Streptomyces* sunt cunoscute ca fiind producătoare de antibiotice: streptomycina, cloramfenicolul, kanamicina, tetraciclina; enzime și compuși antitumorali.

**5. Bacterii pătrate** au fost izolate din ape hipersaline din Peninsula Sinai; prezintă vacuole cu gaz care dispar la presiune; formează grupuri de 8-16 pătrate. În funcție de condițiile de mediu, bacteriile își pot modifica forma acest proces numindu-se **pleomorfism** – la *Ptoteus mirabilis* celulele pot fi de formă bacilară (de obicei) sau filamente lungi (mai rar) și la *Haemophilus* celulele pot fi sub formă filamente sau cocobacili.

## **1.2. STRUCTURA CELULEI BACTERIENE**

### **1.2.1. PERETELE CELULAR**

Este un înveliș rigid care asigură celulei protecție față de șocurile osmotice, susținere mecanică și determină forma celulei bacteriene. Celulele lipsite de perete celular se numesc **protoplaști**. Participă la procesul de creștere și diviziunea celulară. Conține constituenți cu rol de factori antigenici, de receptori pentru bacteriofagi, de recunoaștere a celulelor capabile de conjugare. Conține enzime autolitice care degradează peptiglicanul în cursul sporulării sau biosintezei peretelui celular. La eubacterii peretele celular este constituit din **peptidoglican** – **mureină**. La arhebacterii peretele celular este constituit din **pseudomureină**. **Peptidoglicanul** este un polimer alcătuit din:

-**acidul N-acetilmuramic** și **N-acetil glucozamina** unite între ele prin legături  **$\beta$ -1,4 glicozidice**, formând lanțuri liniare (componenta glicanică);

-**tetrapeptid** (componenta proteică) constituit din:

\***aminoacizi cu două grupări amino** (lizina) între care se stabilesc legături încrucișate între lanțurile glicanice;

\***aminoacidul acid diaminopimelic**

În funcție de structura și de compoziția chimică, peretele celular bacterian poate fi colorat specific, bacteriile fiind încadrate din acest punct de vedere în trei tipuri:

1. Gram pozitive;
2. Gram negative;
3. acidorezistente.

#### **1. Bacteriile Gram pozitive**

- 80-90% din greutatea uscată a peretelui celular este reprezentat de peptidoglican;
- Peretele celular conține acizi teichoici și acizi teichuronici legați covalent de peptidoglican;
- Peretele celular poate fi degradat de lizozim care hidrolizează legăturile dintre acidul N-acetil muramic și N-acetil glucozamina, sau endopeptidaze care rup legăturile dintre tetrapeptidele din peptidoglican;

#### **2. Bacteriile Gram negative**

- Peretele celular nu conține acizi teichoici și teichuronici;
- Prezintă **membrană externă** care este constituită din (fig. 1):
  - fosfolipide (35%);
  - lipopolizaharide (50%);
  - proteine membranare globulare;
  - lipoproteine;
  - proteine cu rol în transportul membranal (porine).

### **1.2.2. SPAȚIUL PERIPLASMIC**

Compartiment prezent doar la **bacteriile Gram negative**, este delimitat la exterior de membrana externă, iar la interior de membrana citoplasmatică. La nivelul său sunt eliminate enzime precum: fosfataza alcalină, fosfodiesteraza ciclică, DN-aze, RN-aze sau alte proteine neenzimatice cu rol de legare și transport a diferitelor substanțe (glucide, aminoacizi, ioni anorganici). Chemoreceptorii ce sunt implicați în răspunsul chemotactic sunt localizați la nivelul spațiului periplasmic.

### **1.2.3. MEMBRANA PLASMATICĂ**

Separă citoplasma de suprafața internă a peretelui celular, de care este lipită datorită diferenței de presiune osmotică între conținutul celular și mediul extern. Reprezintă singura structură citoplasmatică permanentă a celulei bacteriene cu rol de delimitare a spațiului intracelular. Este constituită din două straturi de fosfolipide în care sunt incluse proteine membranare. Bistratul fosfolipidic prezintă o extremitate hidrofobă orientată spre interiorul membranei și una hidrofobă orientată spre exteriorul membranei. Proteinele membranare sunt inclavate în bistratul fosfolipidic, fiind asociate cu regiunea hidrofobă a lipidelor și având rol în transportul unor substanțe în interiorul celulei. Poate forma sisteme de membrane (**mezosomii**) care se ramifică în citoplasmă sau care se pot separa devenind entități aparent independente. Funcționează ca o barieră osmotică, fiind impermeabilă pentru anumite tipuri de molecule și permeabilă pentru altele.

### **1.2.4. CITOPLASMA**

Este considerată ca fiind un sistem coloidal complex format din proteine, glucide, lipide, apă, substanțe minerale. Aspectul variază în funcție de vârsta microorganismului și de condițiile de mediu:

- la celulele tinere apare ca o masă densă, omogenă, intens colorată;
- la celulele îmbătrânite capătă o structură granulară, cu vacuole evidente și o colorație slabă.

Conține cantități mari de ARN (ceea ce explică bazofilia intensă în celulele tinere). În interiorul citoplasmei se găsesc: nucleoidul, ribosomii, incluziunile, vacuolele și ceilalți constituenți ai protoplastului.

### **1.2.5. NUCLEOIDUL**

Constituie echivalentul bacterian al nucleului de la celulele eucariote, fiind lipsit de membrană nucleară și inclavat direct în citoplasmă. Este constituit dintr-o macromoleculă de ADN cu dimensiuni foarte mari (1400  $\mu\text{m}$  lungime și 2,5 nm diametru) în raport cu dimensiunea celulei bacteriene (0,5-1  $\mu\text{m}$  x 3-6  $\mu\text{m}$ ) ceea ce presupune o împachetare a ADN. Greutatea moleculară a ADN cromosomal bacterian variază între 10<sup>9</sup> și 10<sup>10</sup>, conținând 4x10<sup>6</sup> perechi de nucleotide. Bacteriile sunt haploide având un singur cromosom, însă în celulele tinere aflate în faza exponențială de creștere pot fi 2-4 copii cromosomale provenite din replicarea rapidă a cromosomului parental.

### **1.2.6. RIBOSOMII**

Sunt particule nucleoproteice intracitoplasmice, formate din ARNr și proteine ribosomale, fiind implicate în procesul de sinteză a proteinelor. Celulele aflate în faza de creștere logaritmică au în citoplasmă 1.500 până la 100.000 de ribosomi. Ribosomii prezenți în celulele procariote au constanta de sedimentare 70 S și sunt alcătuiți din două subunități:

-**subunitatea mare de 50 S** formată din molecule de ARNr 23 S și ARNr 5 S asociate cu 34 proteine ribosomale diferite;

-**subunitatea mică 30 S** formată din ARNr 16 S și 21 proteine ribosomale diferite.

Sunt componente importante ale sistemului de traducere a informației genetice, la nivelul lor realizându-se reacții ce determină inițierea, alungirea și terminarea sintezei lanțului peptidic. Prezintă situsuri prin care interacționează cu ARNm și ARNt legând specific între ele moleculele de aminoacizi și determinând formarea proteinelor. În timpul biosintezei proteice ribosomii se grupează și formează **poliribosomi** ceea ce asigură eficiență mai mare acestui proces.

### 1.2.7. SPORUL

Reprezintă o formă primitivă de diferențiere celulară ce constă în formarea, în celula vegetativă a **bacteriilor Gram pozitive**, a unui nou tip de celulă cu o ultrastructură, compoziție chimică și enzimatică diferită, ceea ce-i conferă rezistență mare la condiții nefavorabile de mediu.

Tipuri de spori:

-**endosporul** – se formează în interiorul unei celule vegetative, prezintă rezistență mare la condițiile de mediu;

-**sporii de origine hifală** de la actinomicete (*Streptomyces*, *Nocardia*);

-**chiștii** – descriși la *Azotobacter* provin din transformarea celulelor vegetative;

-**gonidiile**;

-**mixosporii, heterocistii și akineții**.

În funcție de poziția unde se formează endosporii pot fi diferențiate taxonomic bacteriile: **ecuatorial** (*Bacillus anthracis*), **subterminal** (*B. cereus*), **terminal** (*Clostridium tetani*).

Sporul este format din:

-**înveliș sporal** (structură lamelară complexă);

-**cortex** (format din peptidoglican modificat);

-**sporoplasmă**;

-**nucleoplasmă**.

### 1.2.8. INCLUZIUNI INTRACELULARE

Sunt formațiuni structurale inerte care apar în citoplasma bacteriilor la sfârșitul perioadei de creștere activă. Sunt structuri legate de activitatea metabolică a celulei, fiind materiale de rezervă care se acumulează în diferite regiuni ale celulei atunci când cultura se dezvoltă lent sau nu se mai dezvoltă. În funcție de compoziția chimică, incluziunile pot fi clasificate astfel:

-**polimeri organici** – incluziuni de glicogen, amidon, poli-β-hidroxibutirat, cianoficină (în cazul cianobacteriilor) polimer format din acid aspartic și arginină;

-**polimeri anorganici** – incluziuni de polimetafosfat;

-**incluziuni anorganice simple** – granule de CaCO<sub>3</sub>, sulf coloidal (în cazul bacteriilor sulfuroase).

În cazul bacteriei *Bacillus thuringiensis* s-au evidențiat incluziuni (care nu au rol de depozit) proteice parasporale, cu structură cristalină, de tipul endotoxinei.

**Vacuolele** sunt structuri intracitoplasmatică sferice cu diametru de 0,3-0,5 μm, totalitatea lor formând vacuomul. Vacuolele prezintă o membrană lipoproteică monostratificată, conțin apă și substanțe dizolvate, iar numărul / celulă variază ele

având rol în reglarea presiunii osmotice și în etapa premergătoare a formării incluziunilor, de depozit a substanțelor de rezervă. Bacteriile acvatice au vacuole cu gaze numite **aerosomi** cu rol în flotației.

### ***1.2.8. APARATUL FOTOSINTETIC***

Pigmenții fotosintetizanti (clorofila a, carotenoizi, ficocianină – pigment albastru, ficoeritrină – pigment roșu) ai cianobacteriilor sunt localizați la nivelul **tilacoizilor** – structuri membranare particulare. Membranele intracelulare tilacoidale au forme variate – tubulare, veziculare, lamelare, fiind acoperite cu corpusculi mici numiți **ficobilisomi** care conțin ficobiliproteine. Tilacoidele servesc ca centru al reacțiilor biochimice în urma cărora are loc conversia energiei luminoase în energie chimică și transportul electronilor. În cazul bacteriilor genului *Chlorobium* aparatul fotosintetic este format din vezicule delimitate de o membrană monostrat, care nu au legătură cu membrana plasmatică.

### ***1.2.9. STRUCTURI EXTRAPARIETALE***

Constituie o barieră ce protejează celula față de condițiile nefavorabile de mediu (prevenirea atașării virusurilor sau procesul de desicare). Este o structură accesorie cu o consistență viscoasă, gelatinoasă, care acoperă complet celula și dau un aspect mucoid, fiind constituită din **polizaharide**;

**Capsula** se întâlnește la bacteriile Gram pozitive și negative. Pe mediu solid **bacteriile capsulate produc colonii netede** (de tip S=smooth), iar cele necapsulate colonii rugoase (de tip R=rough). Capsula îndeplinește roluri multiple precum:

- de protecție față de uscăciune;
- conferă virulență bacteriilor patogene, deoarece capsula este chemotactic negativă pentru fagocite;
- depozitează unele substanțe nutritive;
- conferă caracterul de antigenitate;

**Glicocalixul** este o structură extraparietală cu ajutorul căreia se ancorează fie de alte celule, fie de diverse suporturi. Glicocalixul este format din filamente polizaharidice și glicoproteice care se leagă de lipopolizaharidele membranei externe la bacteriile Gram negative și de mureina (peptidoglicanul) bacteriilor Gram pozitive.

### ***1.2.10. APENDICI LOCOMOTORI***

Sunt reprezentați de flageli – organite extracelulare care conferă mobilitate celulelor purtătoare. Flagelii sunt apendici de natură proteică (cea mai importantă este flgelina) cu diametru de 20 μm și lungime de 4-70 μm. Flagelul se formează din structurile de înveliș ale celulei și are o structură complexă fiind format din:

- corpuscul bazal** (ancorează flagelul la peretele celular prin intermediul unor structuri discoidale);
- cârligul** (conectează filamentul la suprafața celulară);
- filamentul extern** (flagelul propriu zis);

În funcție de numărul flagelilor bacteriile sunt clasificate astfel:

- monotrihe** (un singur flagel);
- amfitrihe** (cu doi flageli poziționați diametral opus);
- lofotrihe** (cu numeroși flageli grupați);
- peritrihe** (cu numeroși flagelidistribuiți pe toată suprafața celulei).

### 1.2.12. APENDICI NELOCOMOTORI

Sunt reprezentați de **pili** și **fimbrii**. **Pili** sunt structuri filamentoase drepte cu număr variat /celulă (1-10) a căror sinteză este codificată de gene situate pe plasmide (elemente genetice extracromosomale). Pili sunt de natură proteică, fiind constituiți din **pilină** și au rol în procesul de conjugare bacteriană și receptori pentru fagii filamentoși.

**Fimbriile** sunt structuri filamentoase drepte și rigide, constituite din proteine numite **fimbriline**, sunt codificate de gene cromosomale. Fimbriile se consideră că au rol în mărirea suprafeței de absorbție a substanțelor nutritive sau determină atașarea intercelulară sau de substrat. Bacteriile patogene care prezintă fimbrii manifestă o virulență mai mare față de cele fără fimbrii datorită atașării mai eficiente de celulele gazdei.

## 2. CARACTERE GENERALE ALE FUNGILOR

Studiile realizate pe fungi au relevat o mare diversitate a acestor organisme, care se datorează formei, structurii și particularităților biologice. Fungii formează cea mai mare grupare sistematică dintre organismele eucariote inferioare. Fungii sunt eucariote heterotrofe, incapabile de fotosinteză, care își obțin energia prin oxidarea compușilor organici. Ei se găsesc în special în sol unde participă la degradarea unor substraturi foarte variate. Fungii pot prezenta un mod de viață saprofit sau parazit (parazitează plantele și animalele). Celulele fungilor au o organizare tipic eucariotă, corpul vegetativ fiind alcătuit din hife care formează miceliul numit tal.

Miceliul variază în complexitate și dimensiune: de la formele unicelulare (levuri), la cele pluricelulare (mucegaiurile) și până la ciupercile macroscopice. Celulele prezintă un perete celular gros, al cărui principal component este chitina (poliglucid rezistent și flexibil, alcătuit din resturi de N-acetilglucozamină). Celulele fungice au, de obicei, mai mulți nuclei dar nu conțin plastide. Organizarea hifelor este coenocitică: în interiorul structurii filamentoase ramificate, protejată de peretele celular rigid, se găsește o masă citoplasmatică multinucleată. Hifele pot fi neseptate, de exemplu la *Phycomycetes* sau pot avea septe la *Ascomycetes* și *Basidiomycetes* ce sunt străbătute de pori.

### 2.1. STRUCTURA CELULARĂ A FUNGILOR

**Nucleul** - a fost pus în evidență prima dată de către De Bary (1866). Nucleul fungilor este mic având dimensiuni cuprinse între 0,75 - 20 μm. Forma nucleului este sferică sau ovală. Nucleul este înconjurat de o membrană dublă cu numeroși pori, caracteristică organismelor eucariote. În interior se află nucleoplasma și unul sau mai mulți nucleoli. Substanța caracteristică nucleului este cromatina, alcătuită din acidul dezoxiribonucleic, acidul ribonucleic și proteine. Numărul cromosomilor variază în funcție de specie, fiind în general mic, de exemplu *Penicillium notatum* are cinci, *Neurospora crassa* are șapte, iar *Aspergillus nidulans* are opt cromosomi.

**Reticulul endoplasmatic** - din celulele fungice este constituit din două membrane unitare separate printr-un lumen. RE poate avea formă tubulară sau lamelară și este mai evident în celulele tinere.

**Ribosomii** sunt distribuiți în mod neuniform în citoplasmă sau sunt atașați de RE. **Mitocondriile** sunt asemănătoare cu cele de la alte organisme, îndeplinind aceleași funcții. **Complexul Golgi** este și el prezent în celulele fungice. **Vacuolele** sunt prezente în număr mare în celulele mature, fiind prevăzute cu o membrană simplă.

**Citoplasma** prezintă la exterior o membrană fină lipoproteică - plasmalema, urmată de hialoplasmă (la periferia celulei), iar în interior este prezentă granuloplasma. Continuitatea citoplasmei este asigurată de plasmodesme între celule și

anastomoze între hife. În componența citoplasmei intră: glucide (glicogen), proteine, lipide, acid ribonucleic, acizi organici, enzime, fosfați de fitosterine. Citoplasma celulelor fungice este hialină, omogenă și refringentă.

**Peretele celular** este constituit din chitină, micoceluloză, caloză, hemiceluloză poliglucide complexe, acizi organici, etc. În funcție de absența sau prezența peretelui celular, celulele fungice pot fi gimnoplaste - fără perete celular (la grupe inferioare de fungi) și dermatoplaste - cu perete celular (grupele evolute).

## **2.2. STRUCTURA MICELIULUI**

Aparatul vegetativ al fungilor este numit miceliu. Miceliul este divers constituit în funcție de gradul de evoluție al fungilor. La ciupercile superioare, miceliul este alcătuit din hife septate transversal, care formează un miceliu pluricelular. Celulele pot fi uninucleate, binucleate sau plurinucleate. La foarte multe ciuperci hifele sunt incolore, dar odată cu diferențierea sporilor miceliul se colorează. La unele specii de fungi, miceliul care formează corpii sporiferi se colorează în roșu, galben, albastru, ca urmare a faptului că celulele sintetizează o serie de pigmenți care colorează peretele. În funcție de dezvoltarea în interiorul sau la suprafața diferitelor substraturi, miceliul poate fi intern sau extern.

## **3. NOȚIUNI DE VIRUSOLOGIE GENERALĂ**

**Virusologia** este știința care studiază virusurile și afecțiunile provocate de aceste entități. Apariția și dezvoltarea acestei științe a început odată cu descoperirea în anul 1892 de către Ivanovski a faptului că boala mozaicului tutunului este provocată de un agent infecțios.

Câțiva ani mai târziu, experimentele realizate de Beijerinck cu extracte din frunze de tutun infectate cu virusul mozaicului tutunului, au adus dovada că acest agent infecțios este filtrabil, rezistent în timp și poate prin inoculare la plante sănătoase să provoace boala.

În următoarele decenii au fost descoperite numeroase virusuri care parazitează oamenii, animalele, plantele și microorganismele (bacteriile și fungii). În 1911 Rous a evidențiat virusul sarcomului aviari, în 1915 Twort a izolat virusuri specifice bacteriilor, iar în 1917 D'Herelle a evidențiat apariția plajelor de liză dovedind astfel posibilitatea infectării și parazitării bacteriilor de către virusuri.

### **3.1. CARACTERELE GENERALE ALE VIRUSURILOR**

Virusurile se deosebesc fundamental de organismele procariote sau eucariote, fiind încadrate într-un regn aparte numit VIRA. Virusurile sunt entități biologice infecțioase cu organizare acelulară.

Particula virală completă se numește **virion** sau **virus infecțios matur** și rezultă în urma autoasamblării componentelor sale sintetizate de celula gazdă, pe baza informației genetice conținută de acidul nucleic viral.

Particula virală lipsită de capsidă se numește **virus vegetativ** când se află liber în citoplasma celulei gazdă în timpul replicării sale sau **provirus** când este integrat în cromosomul gazdei.

Virusurile nu au echipament enzimatic de biosinteză și catabolism propriu, ci doar unele enzime cu rol în pătrunderea, replicarea și eliberarea din celula gazdă. Virusurile sunt paraziți absoluți, constanți și obligați deoarece nu cresc, nu se divid și nu se pot reproduce în afara unei celule gazdă vie.

Pe baza informației genetice conținută în acidul nucleic și cu ajutorul sistemelor biochimice ale celulei gazdă – sistemele enzimatice Lipmann ce asigură acumularea energiei, sistemelor de transport de electroni, ribozomilor și ARNt

virusurile își pot sintetiza componentele structurale. Deoarece nu conțin acid muramic în structura învelișurilor externe virionii nu sunt sensibili la multe antibiotice.

### **3.2. PARTICULARITĂȚILE MORFOLOGICE ȘI STRUCTURALE ALE VIRUSURILOR VERTEBRATELOR**

Morfologia și structura virusurilor a putut fi elucidată prin studiile de microscopie electronică, prin analize de difracție cu raze X, analize biochimice sau imunologice. Astfel, a fost relevată o diversitate mare a tipurilor morfologice și a dimensiunilor virusurilor.

Dimensiunile virusurilor variază în limite mari, fiind cuprinse între 10-400 nm diametru.

Virionul este constituit din:

- **genom viral** (acid nucleic ADN sau ARN niciodată ambele);
- **capsidă**;
- **peplos**.

**Genomul viral** este constituit fie dintr-o moleculă de ADN, fie din ARN dispusă helical, lineară sau circulară, monocatenară sau bicatenară (tabelul 1).

Tabelul 1

Tipuri de acizi nucleici virali

ARN monocatenar	Virusul gripal
	Virusul poliomieltic
	Bacteriofagul Q $\beta$
	HIV
ARN dublucatenar	Virusul guturaiului
	Virusurile plantelor
ADN monocatenar	Bacteriofagul $\phi$ X174
ADN dublucatenar	Bacteriofagul $\lambda$
	SV 40

Informația genetică deținută de genomul viral poate determina propria replicare și „deturnarea” metabolismului celulei gazdă în scopul sintetizării componentelor structurale virale.

**Capsida virală** este constituită din unități structurale de natură proteică numite capsomere. Capsomerele se asociază și formează structuri cu simetrie helicală sau icozaedrică.

**Invelișul extern** (peplos) se formează în momentul când virionul părăsește celula gazdă. Peplosul este constituit din:

- un strat dublu lipidic (ce conține sfingolipide și colesterol) provenit din membrana celulară a gazdei;
- pe suprafața internă prezintă o foiță proteică (proteine de membrană);
- pe suprafața externă prezintă spicule (spikes) proeminente de natură glicoproteică, care au extremitățile ascuțite, drepte sau în formă de butoni.

Cele mai cunoscute spicule sunt cele de la *Orthomyxovirus* numite hemaglutinine și neuraminidaze. Hemaglutininele au aspect de bastonașe cu formă de prismă cu baza triunghiulară fiind de natură glicoproteică și funcționează ca antigen ducând la apariția de anticorpi.

Neuraminidaza se prezintă sub forma unor butoni, este tot de natură glicoproteică și are următoarele roluri:

1. distrugerea mucoproteinelor care protejează căile respiratorii permițând fixarea virionilor de celule;



2. degradarea receptorilor celulari favorizează pătrunderea virionului în celulă sau eliberarea virusului din celulă și infectarea altor celule;

3. participă la procesul de asamblare a virionilor.

**Proteinele de membrană** sunt localizate în stratul dublu lipidic și formează un strat intern complet cu rol în menținerea integrității virionului

### 3.3. BACTERIOFAGII

Bacteriofagii sunt virusuri care parazitează bacteriile și din punct de vedere al ciclului de viață pot fi: litici (virulenți) – T<sub>4</sub> și/sau lizogeni (temperați) – λ. Bacteriofagii au fie genom constituit dintr-o moleculă de ADN dublucatenar sau monocatenar linear, fie genom ARN.

Din punct de vedere al ciclului de viață bacteriofagii pot fi litici și/ sau lizogeni (temperați). Din punct de vedere structural fagii au fost clasificați în trei tipuri: icosaedrici (φX174), icosaedrici cu coadă (T<sub>4</sub>) și filamentoși (φ29, M<sub>13</sub>). Bacteriofagii pot fi virulenți (litici) (T<sub>4</sub>) sau temperați (lizogeni) (φ80, λ). Structura bacteriofagului T<sub>4</sub> este următoarea: cap, coadă, placă bazală, fibrele cozii.

**Bacteriofagii virulenți** își "injectează" materialul genetic (genomul, cromosomul viral) în citoplasma celulei gazdă, care este replicat independent de cromosomul bacterian, are loc transcrierea, se sintetizează proteinele virale și componentele structurale ale bacteriofagului, se assemblează particulele virale și în final celulele bacteriene sunt lizate.

**Bacteriofagii temperați** după ce-și introduc genomul în celula gazdă, acesta se integrează în cromosomul bacterian devenind profag și se replică odată cu cromosomul celulei gazdă, iar genele virale în marea lor majoritate nu se exprimă. Integrarea se realizează la nivelul unor situsuri specifice (genomul fagului λ se integrează între operonii gal și bio) sau la întâmplare în diferite regiuni ale cromosomului bacterian. Starea de lizogenie poate fi perpetuată de-a lungul mai multor generații bacteriene, dar în anumite condiții genomul viral poate fi excizat din cromosomul celulei gazdă și eliberat în citoplasmă, evoluând spre ciclul litic. Acesta este fenomenul inducției fagice (inducției litice).

Integrarea genomului fagilor lizogeni în cromosomul bacterian se realizează cu ajutorul unei enzime numite integrază codificată de gena int. Excizia profagului care apare în cazul inducției fagice a unei tulpini lizogene este determinată de enzima excizionaza codificată de gena xis.

Starea de lizogenie determină unele modificări la nivelul membranei externe a celulelor bacteriene, care duc la alterarea situsurilor de legare, astfel că bacteria este protejată de atacul altor bacteriofagi virulenți înrudiți cu fagul temperat.

Inducția litică se datorează faptului că proteinele virale represoare, care determină inhibarea exprimării genelor virale sunt inactivate. Inducerea ciclului litic depinde de cantitatea relativă a proteinelor represoare Cro (care inhibă sinteza represorului cI și permite transcrierea genelor virale implicate în multiplicarea și morfogeneza fagului, determinând excizia profagului din cromosomul bacterian și deci evoluția litică) și cI (care inhibă exprimarea majorității genelor virale, determinând starea de lizogenie). Inducția fagică poate fi declanșată spontan sau poate fi stimulată de factori fizici (radiații ionizante (X), neionizante (UV), temperatură) sau chimici (antibiotice - mitomicina C în cazul tulpinilor de *Streptomyces* producătoare de streptomycină).

## 4. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC LA PROCARIOTE ȘI EUCARIOTE.

### CICLUL CELULAR LA EUCARIOTE

Acizii nucleici sunt substanțe macromoleculare alcătuite din nucleotide. Nucleotidele sunt formate dintr-o bază azotată, o pentoză și un radical fosfat. Bazele azotate sunt de două tipuri: purinice (adenina și guanina) și pirimidinice (citozina,

timina și uracilul). Pentozele sunt reprezentate de dezoxiriboză în structura ADN și riboză în ARN. O bază azotată și o pentoză sunt legate prin legături  $\beta$ -N-glicozidice și formează o nucleozidă. Nucleotidele sunt formate prin adăugarea radicalului fosfat la nucleozidă. În structura ADN intră dezoxiriboză, adenina, guanina, citozina, timina și radicalul fosfat. În structura ARN intră riboză, adenina, guanina, citozina, uracilul și radicalul fosfat. Nucleotidele sunt legate între ele prin legături fosfodiesterice.

Sistemele biologice cuprind două tipuri fundamentale de organizare: acelulară sau moleculară, în această categorie încadrându-se virusurile și virozii și celulară care cuprinde două categorii divergente de organizare, procariotă și eucariotă. Organizarea celulară procariotă cuprinde bacterii, actinomicete și cianobacterii, iar cea eucariotă drozdii, fungi, plante și animale. Se consideră că există și o a treia categorie intermediară – organizarea mezocariotă la un singur grup de microorganisme *Dinoflagellate* (alge).

Virusurile sunt entități biologice cu organizare acelulară. Un virus este alcătuit dintr-un înveliș proteic numit capsidă și un miez de acid nucleic. Miezul de acid nucleic este constituit din ADN sau ARN, niciodată ambele (ADN la dezoxiribovirusuri și ARN la ribovirusuri). ADN poate fi dublu catenar, linear sau circular sau dublucatenar linear.

Unele ribovirusuri animale au genomul segmentat ARN este alcătuit din mai multe segmente de ARN “minus”, care generează catene de ARN “plus”, acestea funcționând ca ARNm. De exemplu virusul gripal are genomul constituit din opt fragmente de ARN monocatenar. Acest virus se numește virus cu catenă negativă pentru că ARN conținut în capsida virală nu are funcție de mesager.

Virozii sunt alcătuiți dintr-o moleculă de ARN, neasociat cu proteine. De exemplu viroidul care determină infecții la cocotier.

#### **4.1. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC LA PROCARIOTE**

Bacteriile, inclusiv actinomicetele și cianobacteriile prezintă organizare celulară procariotă, deci se autoreproduc și au morfogeneză autonomă.

Genomul procariot este alcătuit din două categorii de determinanți genetici:

- a) gene esențiale localizate în structura cromosomului;
- b) gene accesorii localizate în structura plasmidelor, a transpozoniilor, secvențelor de inserție, bacteriofagilor.

Cromosomul bacterian este alcătuit dintr-o moleculă de ADN dublucatenar circular închis covalent. Acesta este situat în regiunea centrală a celulei bacteriene, este inclavat direct în citoplasmă fiind prins prin mezosom de membrana plasmatică și formează nucleoidul (nucleosom, nucleoplasmă) sau nucleul de tip procariot lipsit de membrană nucleară.

ADN bacterian nu este complexat cu proteine histonice, dar la unele grupe bacteriene ADN este asociat cu proteine bazice asemănătoare histonelor. Se presupune că aceste proteine au rol în neutralizarea încărcăturii negative a grupărilor fosfat ale ADN, asigurându-i stabilitatea. Din punct de vedere chimic nucleoidul este un complex ADN-ARN-proteine (80% ADN, 10% ARN – ARNr și ARNm și 10%proteine – ARN polimerază).

Elementele genetice accesorii au următoarele proprietăți :

- a) conțin informație genetică neesențială pentru reproducerea organismului purtător, unele nu conferă nici o proprietate detectabilă;
- b) sunt capabile de replicare independentă față de cromosomul bacteriei purtătoare.

Cele mai importante elemente genetice accesorii la procariote sunt plasmidele. Plasmidele sunt reprezentate de molecule de ADN dublucatenar circular covalent închis sau linear. Ele sunt delimitate spațial de cromosomul bacterian, se pot replica autonom față de acesta. Moleculele de ADN plasmidial pot prezenta trei conformații moleculare: circulare covalent închise (CIC), circulare deschise (CD) și lineare (L).

## 4.2. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC EUCARIOT

Caracteristicile organizării genetice eucariote sunt:

- a) existența membranei nucleare duble care închide materialul genetic;
- b) repartizarea informației genetice pe mai mulți cromosomi.

Datorită localizării materialului genetic pe mai mulți cromosomi transcrierea și traducerea informației genetice se realizează separat, prima în nucleu, cea de-a doua în citoplasmă la nivelul ribosomilor.

Complexarea permanentă a ADN cromosomal cu histone (proteine bazice ce conțin resturi de arginină și lizină) face ca la eucariote substanța nucleară – cromatina să prezinte un aspect fibros la microscopul electronic. Complexarea cu proteine histonice a ADN cromosomal are drept consecință prezența unui ciclu celular cu două faze distincte: replicativă și distributivă.

### 4.2.1. CICLUL CELULAR LA EUCARIOTE

În celulele somatice, cromosomii suferă procese ciclice de spiralizare, despiralizare și sinteză replicativă, procese care asigură transmiterea informației genetice de la o generație la alta, în cadrul ciclului celular.

Ciclul celular reprezintă perioada dintre două diviziuni mitotice succesive. Ciclul celular este divizat în două etape: **interfaza (I)** și **diviziunea celulară - mitoza (M)**. **Interfaza** este perioada cea mai activă din punct de vedere metabolic - are loc sinteza ADN, a proteinelor histonice. Interfaza este subdivizată în trei faze:

- a) **faza presintetică G<sub>1</sub>** - (G = gol sintetic)
  - nu se sintetizează ADN, dar are loc acumularea compușilor necesari replicării cromosomilor monocromatidici, dublării centriolilor și formării aparatului mitotic. Au loc sinteze de ARN, proteine enzimatică și neenzimatică.
  - există celule care nu se divid continuu, nefiind implicate permanent în cicluri proliferative repetate, deși ele rămân viabile și active metabolic îndeplinind funcții specifice tisulare pentru perioade lungi de timp. Ele pot reveni la ciclul celular proliferativ, sub acțiunea unor factori extracelulari, așa cum se întâmplă în cazul vindecării unei leziuni - procesul cicatrizării. Acest tip de celule se spune că se află în faza G<sub>0</sub>. Decizia unei celule G<sub>0</sub> de a reintra în ciclul celular sau a celulelor ciclice de-a ieși din circuit se produce în ultima parte a fazei G<sub>1</sub>.
- b) **faza S** - (S = sinteză)
  - se dublează cantitatea de ADN, cromosomii devenind bicromatidici. La sfârșitul mitozei și în G<sub>1</sub> cromosomii sunt monocromatidici.
- c) **faza postsintetică G<sub>2</sub>**
  - nu se sintetizează ADN, dar se asigură condițiile pentru formarea aparatului de diviziune a celulei și se acumulează substanțe cu rol energetic necesare pentru realizarea mitozei.

Durata ciclului celular variază la diferite tipuri de celule eucariote. Astfel drojdiile se pot divide la aproximativ 120 min. Cele mai multe celule vegetale și animale se divid la 10-12 ore. La mamifere, dacă se atribuie 24 ore unui ciclu celular, atunci mitoza durează 1 oră, faza G<sub>1</sub> circa 10 ore, faza S până la 9 ore, iar faza G<sub>2</sub> aproximativ 4 ore.

## 5.1. TIPURILE DE NUTRIȚIE A MICROORGANISMELOR

Microorganismele au fost grupate în două categorii în funcție de sursa de carbon pe care o folosesc:

- ✓ Autotrofe – folosesc CO<sub>2</sub> ca unică sau principală sursă de carbon anorganic;
- ✓ Heterotrofe – folosesc substanțe organice ca sursă de carbon pentru biosinteze și producere de energie.  
În funcție de modul de obținere a energiei microorganismele au fost grupate în două categorii (tabelul 5.1.):
- ✓ Fototrofe – folosesc energia radiantă luminoasă (fig. 5.1, 5.2);
- ✓ Chemosintetizante – obțin energia din reacții chimice (fig. 5.3).

Microorganismele chemoheterotrofe sunt dependente de compușii organici ca sursă de carbon și energie și pot fi clasificate astfel:

- ✓ Saprofitrofe – obțin compușii organici din mediul înconjurător;
- ✓ Simbiotrofe – preiau compușii organici de la alt organism cu care trăiesc permanent în contact direct;
- ✓ Biotrofe – obțin substanțele organice din celulele vii ale gazdei simbiotice;
- ✓ Necrotrofe – obțin compușii organici din celulele moarte ale gazdei simbiotice.

Microorganismele chemoheterotrofe pot fi clasificate în două categorii în funcție de modul în care obțin substanțele necesare biosintezelor:

- ✓ Microorganismele osmotrofe – preiau substanțele dizolvate în mediu prin transfer prin membranele celulare;
- ✓ Microorganismele fagotrofe – înglobează substanțele pe care le digeră înainte de a utiliza producția de digestie.

În funcție de modul de nutriție și gradul de dependență de alte microorganisme, microorganismele chemoheterotrofe pot fi clasificate astfel:

- ✓ Saprofite obligate libere – microorganisme heterotrofe libere, care nu au capacitatea de simbioză mutualistă sau parazitară;
- ✓ Facultativ necrotrofe – microorganisme cu potențial simbiotic, normal libere, cu nutriție saprotrofă, care pot deveni parazite având nutriție necrotrofă;
- ✓ Necrotrofe obligate – include paraziți specializați a căror existență liberă se limitează la supraviețuirea în țesutul mort al gazdei infectate;
- ✓ Facultativ biotrofe – microorganisme facultativ simbiotice, sunt biotrofe în stadiul simbiotic și saprotrofe în stadiul liber;
- ✓ Obligate biotrofe – microorganisme simbiotice mutualiste sau parazitare, incapabile de existență liberă (doar ca spori sau chiști).

## **5.2. METABOLISMUL**

Metabolismul reprezintă totalitatea proceselor chimice care au loc în celulele organismelor vii (fig. 5.4). Metabolismul include:

- ✓ anabolismul care reprezintă totalitatea reacțiilor de sinteză a constituenților celulari (metaboliți primari și secundari) ce necesită energie;
- ✓ catabolismul care reprezintă totalitatea reacțiilor de degradare ce asigură eliberarea elementelor compușilor moleculari sau macromoleculari ai unei celule și producerea de energie.

Reacțiile anabolice sunt necesare pentru creșterea, reproducerea și repararea structurilor celulare. Reacțiile catabolice furnizează organismului energia necesară proceselor vitale, inclusiv deplasarea, transportul și sinteza moleculelor complexe.

În toate reacțiile catabolice are loc transferul de electroni, care permite captarea energiei în legăturile macroergice ale moleculelor de ATP sau alte molecule asemănătoare. Transferul de electroni este în strânsă legătură cu procesele de oxidare și reducere (tabelul 5.2.).

Oxidarea poate fi definită ca reacția în care se pierd sau se îndepărtează electroni. Deși multe substanțe se combină cu oxigenul și transferă electroni acestuia, în cazul în care în mediu sunt prezente alte substanțe acceptoare de electroni oxigenul poate lipsi. Reducerea poate fi definită ca reacția în care se câștigă electroni.

Atunci când o substanță pierde electroni sau este oxidată se eliberează energie, dar trebuie să existe o altă substanță care să primească electronii sau să se reducă în același timp.

### **6.1. CREȘTEREA ȘI MULTIPLICAREA MICROORGANISMELOR**

Microorganismele cresc și se multiplică dacă în mediu sunt suficiente substanțe nutritive pentru sinteza tuturor compușilor necesari formării constituenților celulari. Multiplicarea microorganismelor se realizează prin mecanisme diferite de diviziune:

- ✓ diviziune directă (fisiune binară);
- ✓ înmugurire;
- ✓ diviziune mitotică,
- ✓ formarea sporilor de propagare.

Fisiunea binară – celulele bacteriene se alungesc până ating o anumită lungime, apoi în zona ecuatorială se formează un sept transversal care separă celula în două celule fiice identice (fig. 6.1). Fragmentarea – este caracteristică bacteriilor filamentoase (actinomicete) fiind implicată în formarea sporilor. Înmușurirea – este caracteristică levurilor, prin înmușurire se formează două celule pornind de la o celulă parentală (fig. 6.2.). La nivelul celulei mamă se formează printr-un proces de mitoză o protuberanță (mugure), care crește treptat, apoi se desprinde de celula inițială și își continuă dezvoltarea individual. Diviziunile mitotică sau meiotică – sunt caracteristice microorganismelor eucariote și presupun formarea unui fus de diviziune mitotic, respectiv meiotic care separă cromosomii în celulele fiice.

### **6.2. CREȘTEREA EXPONENȚIALĂ A UNEI POPULAȚII MICROBIENE**

Modelarea matematică a creșterii unei populații bacteriene cultivate în mediu lichid în sistem închis (de tip batch) a permis reprezentarea grafică ca logaritmul din numărul de celule în funcție de timpul de incubare. Curba de creștere exponențială a bacteriilor este constituită din patru faze (fig. 6.3):

- ✓ faza de lag;
- ✓ faza de creștere exponențială;
- ✓ faza staționară;
- ✓ faza de declin.

Faza de lag – reprezintă faza de latență în care nu se realizează diviziuni celulare și nici creșterea biomasei, ci doar pregătirea microorganismelor pentru multiplicare. Faza exponențială – reprezintă faza de creștere logaritmică în care se realizează multiplicarea rapidă a microorganismelor. Celulele din această fază sunt tinere, au citoplasma abundentă și omogenă, fără substanțe de rezervă, în care se realizează numeroase procese metabolice. Faza staționară – celulele din această fază sunt mature, în citoplasma lor se acumulează substanțe de rezervă și incluziuni, iar activitatea metabolică scade. Numărul celulelor viabile rămâne constant pentru că numărul celulelor care mor este compensat de cel al celulelor care rezultă din diviziune. Faza de declin – din cauza epuizării substanțelor din mediul de cultură și a acumulării substanțelor toxice rezultate în urma activității celulare numărul de celule scade progresiv. Celulele conțin cantități mari de substanțe de rezervă, formează spori și se pot produce fenomene de liză celulară.

## 7. BIOPREPARATE CU CIUPERCI PRODUCATOARE DE MICORIZE

### 1. NOTIUNI GENERALE:

Micorizele sunt rezultatele unei asociații în cursul căreia rădăcelele plantelor sunt colonizate de ciuperci microscopice specifice. Această interrelație implică:

- asocierea relativ constantă a celor doi parteneri;
- infecția plantei de către ciuperci fără simptome patologice;
- invadarea exclusivă a cortexului radicular cu menținerea sterilității meristemului apical și a cilindrului vascular;
- absența leziunilor și menținerea proprietăților fiziologice normale ale celulelor radiculare;
- dezvoltarea superioară a plantelor purtătoare de micorize comparativ cu cele lipsite de acestea.

Plantele și ciupercile se află într-o relație simbiotică sau de parazitism reciproc fiziologic, echilibrat.

### 2. CLASIFICAREA MICORIZELOR:

După raportul dintre hifele ciupercilor și celulele corticale ale rădăcinii avem:

- **ectomicorize (ectotrofe)** – ciupercile produc infecții hifale intercelulare;
- **endomicorize (endotrofe)** – localizare intracelulară a hifelor;
- **endo – ecto** sau **ecto – endomicorize** – include ambele tipuri de infecții;
- **peritrofe**

Caracteristicile genetice ale plantelor determină nu numai natura grupului de ciuperci care infectează rădăcina ci și tipul de micorize stabilite.

### 3. ECTOMICORIZELE:

Sunt asociații simbiotice rezultate din interacțiunea complexă a miceliilor ciupercii cu rădăcina plantei, în care fungii rămân permanent localizați extra și intercelular. Sunt larg răspândite.

Plantele gazdă sunt în special copacii care cresc pe soluri brune sau podzolizate. Micorizele sunt mai rare la arborii izolați și situați în soluri cernoziomice. Micorizele au fost descrise la: *Pinaceae* (pin), *Fagales* (fag), *Juglandales* (nuc), *Dipterocarpaceae* (frasin), *Mirtaceae* (dafin), *Tiliaceae* (tei).

Ciupercile de ectomicorize aparțin claselor: *Bazidiomycete evoluate* (ciuperci cu pălărie), *Ascomycetes*, *Rhizomycetes*. Speciile cele mai întâlnite sunt: *Amanita muscaria*, *Boletus taoides*, *Boletus edulis*, *Ruscula sp.*, *Lactarius deliciosus* etc.

Fungii de ectomicorize se dezvoltă optim la 15 – 30°C și pH 4 – 6 (uneori chiar 3). Aceste ciuperci produc metaboliți secundari: fitohormoni (auxine, citochinine, gibereline), vitamine, acizi grași polinesaturați, antibiotice, pe care îi eliberează direct în țesuturile plantei.

#### **Particularități anatomice ale ectomicorizelor:**

Ectomicorizele au unele aspecte structurale definitorii: mantaua fungică, rețeaua Hartig, hifele externe.

Teaca sau mantaua fungică formează un țesut fungic gros pseudoparenchimatous care acoperă rădăcelele plantei gazdă, poate reprezenta până la 40% din greutatea uscată a rădăcinii respective. Nu e o simplă rețea de hife ci un sistem complicat, ramificat, întreprins, dezvoltat din hifele care patrund între celulele epitelice și uneori chiar între celulele cortexului radicular. Rezultat al unei dezvoltări considerabile a hifelor ciupercilor producătoare de micorize, teaca asigură o mare suprafață de contact între cei doi parteneri ai asociației fără ca hifele să patrundă în celulele vii active.

#### Hifele externe

Teaca fungică are conexiuni cu solul din care se dezvoltă o rețea luxuriantă de hife ramificate sau lanțuri hifale numite **rizomorfe**. Frecvent acestea cresc spre suprafața solului pentru că în condiții favorabile se diferențiază, formând corpuri sporifere epigeice sau hipogee a căror nutriție este asigurată de planta gazdă.

Din 1949 s-a demonstrat necesitatea absolută a conexiunii corpurilor sporifere cu țesuturile vegetale. Apariția acestor corpuri este împiedicată dacă se secționează rizomorfele cu plăci metalice introduse în pământ. Acest fapt demonstrează că majoritatea ciupercilor comestibile cu sau fără pălărie (inclusiv hifele) prezente în apropierea copacilor sunt corpuri sporifere de ectomicorize și nu saprofiți de materie organică în descompunere așa cum s-a prezentat inițial.

Reteaua Hartig este o caracteristică structurală a ectomicorizelor.

Deși asigură un contact strâns cu celulele gazdei, hifele rămân mereu localizate între celulele cortexului fără să producă infecții intracelulare.

**Zonele de contact dintre fungi și planta gazdă în ectomicorize:**

- în zona extremității radiculare fungii sunt în contact direct cu celulele senescente ale vârfului vegetativ meristematic;
- în zona anterioară rețelei Hartig teaca fungică este în contact cu celulele epidermice vii;
- în zona rețelei Hartig fungii pătrund între celulele epidermice și uneori între celulele corticale ca sisteme hifale vii;
- în zona rețelei Hartig senescentă celulele epidermice și cele corticale sunt pătrunse de hifele fungice.

#### **4. ENDOMICORIZE. MICORIZELE VEZICULO – ARBUSCULARE**

Acest tip de micorize este cel mai comun, fiind întâlnit la cele mai multe plante cultivate. Cele mai mult studiate sunt micorizele plantelor cu importanță economică: grâu, porumb, soia, tomate, măr, căpșun, trestie de zahăr, arbore de cafea, arbore de cauciuc, orhidee, piersic. Fungii care produc aceste micorize sunt larg răspândiți în sol, mai ales în regiunea perivasculară radiculară.

D.p.d.v. taxonomic sunt descrise 4 genuri din familia Endogomaceae: *Glomus*, *Sclerocystis*, *Gigaspora*, *Acaulospora*. Cele mai utilizate ciuperci producătoare de micorize sunt cele din genul *Glomus*.

Experimentele de inoculare a gazdelor cu suspensii sporale axenice au demonstrat că cei mai mulți fungi au un spectru larg de gazde. Astfel *Glomus* formează micorize cu mai mult de 20 specii cultivate. Există și excepții: fungii din micorizele de la ovăz nu pot fi transmiși la orez și invers; în schimb, cei izolați de la grâu sau secară infectează atât orezul cât și ovăzul (orzul?).

Fungii simbioți obligați parazitează cu o specificitate de gazdă redusă. Fenomenul s-ar explica prin largă distribuție în sol și printr-o proprietate fundamentală a metabolismului radicular comună mai multor specii de plante.

**Formarea micorizelor veziculo-arbusculare**

Micorizele endotrofe de acest tip formează structuri sferice numite vezicule și structuri ramificate cu funcție de organ absorbtiv de tipul haustoriilor numiți arbusculi.

În evoluția infecției simbiotice au fost descrise 3 faze succesive:

- dezvoltarea excesivă în sol a miceliului extraradicular (cel puțin la câțiva centimetri de suprafața rădăcinii);
- apariția unui sistem hifal intercelular în cortex;
- infecția intracelulară, formarea de hife încolăcite, vezicule și arbusculi în celulele vegetale.

În cazul micorizelor veziculo-arbusculare, hifele miceliene ies din rădăcina infectată pentru a forma o rețea laxă în rizosferă și în solul adiacent. Greutatea hifelor extraradiculare e 1-6% din greutatea rădăcinii proaspete. Lungimea hifelor din sol e corelată cu lungimea rădăcinii infectate, ex. trifoi – 1,29m hife/cm de rădăcină.

Contactul dintre membrii asociației de tip micoriză endotrofă este foarte asemănătoare celui observat în infecțiile fungice biotrofe ale plantelor. Pe măsura ce hifele fungice infectante patrund în celula vie, peretele celular vegetal și

plasmalema par să se invagineze a.î. hifele sunt acoperite cu un înveliș derivat din aceste structuri de suprafață. Se pare că fungii inhibă sau modifică activitatea enzimelor gazdei implicate în producerea și maturarea peretelui celular.

Zona de contact implica participarea plasmalemelor vii ale ambilor membri ai asociației separată de un spațiu apoplastic ce constă din: peretele hifal modificat și peretele celulei gazdă. Apoplastul este țesutul “mort” al plantei, care nu manifestă activitate metabolică activă ci lentă, ex. peretele vaselor lemnoase, ritidomul.

Pe măsură ce asociația îmbătrânește se comportă ca și cum fungii ar deveni mai puțin apti să mențină sau să genereze modificările caracteristice ale peretelui celular celulei gazdă. Plasmalema celulei gazdă continuă să elibereze vezicule ce conțin polizaharide și să formeze polimeri fibroși, dar își recapătă proprietatea de a-i organiza într-o structură.

Fungii de micorize endotrofe atacă planta gazdă ca un parazit pentru că hifele se comportă ca haustorii fungilor patogeni obligați. În general fungii producători de ectomicorize rămân localizați în straturile externe ale cortexului radicular. Când încearcă să pătrundă în interiorul rădăcinii ei sunt distruși de răspunsul defensiv al gazdei.

Endospermul și meristemul apical sunt lipsiți de infecție fungică. De aceea endospermul plantei reprezintă o barieră fungică. Când ciupercile depășesc această barieră, ciupercile producătoare de micorize devin patogene.

## **5. MICORIZELE ECTO-ENDOTROFE**

Sunt prezente doar la speciile de arbori din Gimnosperme (ex. brad, pin, molid) care formează obișnuit endomicorize. Se pare că sunt limitate numai la primele stadii de vegetație ale arborilor (pepiniere). Considerate inițial ca forme de tranziție, aceste micorize au particularități anatomice ale ambelor tipuri majore de micorize.

Rădăcinile cu ecto-endomicorize sunt mai alungite, mai subțiri, mai puțin ramificate dicotomic decât cele purtătoare de ectomicorize. Mantaua fungică nu e atât de bine dezvoltată. Aceste micorize au concomitent rețea Hartig în cortex și hifele pătrund intracelular.

Speciile de plante lipsite de simbioză fungică naturală sunt înconjurată invariabil de un miceliu abundent aparținând speciei *Cenococcum graniforme* recunoscută ca fiind capabilă să intre în simbioză cu diferite plante.

## **6. MICORIZELE PERITROFE**

Se caracterizează prin hife plastice care înconjoară rădăcina cu care au contact indirect, superficial, fără conexiune directă. Miceliile epirizice au o foarte mare zonă de extindere, putând atinge cca 4m/m<sup>3</sup>sol. Ele preiau nutrienții rezultați prin descompunerea resturilor radiculare și îi utilizează ca sursă de energie.

## **7. ROLUL MICORIZELOR ÎN BIOLOGIA PLANTELOR**

Prezența micorizelor conferă plantelor avantaje numeroase și diferite, între care cele legate de nutriție, dezvoltare și protecție contra agenților patogeni sunt cele mai des evidențiate.

Micorizele funcționează ca adevărate organe absorbitive radiculare. Deoarece rețeaua Hartig formează o mare suprafață de contact cu celulele vegetale, absorbția nutrienților e mult mai mare decât cea prin perii radiculari; în plus ramificațiile rădăcinilor induse de fungi crește și mai mult suprafața absorbantă, creând situsuri adiționale de legare a hifelor.

Radacinile infectate cu fungi de micorize sunt de 2-3 ori mai lungi decât cele neinfectate, de asemenea au masă mult mai mare și sunt mai ramificate. Formarea perilor radiculare e suprasată, iar funcția lor e preluată de hifele fungice ce măresc raza de disponibilitate a nutrienților din plante.

Fungii de micorize au rol foarte activ în preluarea nutrienților, ei secretă metaboliți care cresc solubilitatea ionilor minerali legați în sol și care de asemenea cresc mobilitatea acestora. Ioni anorganici sunt preluați eficient și translocați direct în rădăcină, prevenindu-se pierderea lor prin levigare.

Hifele fungice larg răspândite în sol traversează regiunile deficitare în nutrienți sau cu nutrienți inaccesibili din apropierea rădăcinilor, pentru a se ramifica și explora zone noi, la distanță inaccesibilă plantei ca atare. Cu timpul, în jurul



ciupercilor producătoare de micorize, apar noi zone cu deficit de nutrienți, dar ramificarea și creșterea continuă a hifelor și conexiunile lor cu solul permit exploatarea extensivă a acestuia.

Procesul e mult mai avantajos energetic pe unitatea de suprafață absorbantă decât creșterea și ramificarea rădăcinii:

- exploatare intensivă: fosfat anorganic insolubil, fosfat puțin solubil
- exploatare extensivă

Pi e puțin mobil în sol, nu se menține în soluția solului. În solurile fertile Pi e menținut în soluția solului datorită humusului (cu cât solul are mai mult humus cu atât Pi solubil e mai mult). Micorizele mențin Pi în soluția solului mai ales pe soluri sărace în humus.

În cursul simbiozei fungii produc multe substanțe care mențin echilibrul simbiotic cu celulele radiculare și care de asemenea influențează semnificativ procesul de absorbție. Ciupercile producătoare de micorize sintetizează **auxină**, fitohormon care stimulează dezvoltarea sistemului radicular și **citochinină**, fitohormon care împiedică maturarea și suberizarea țesutului radicular, favorizând prelungirea perioadei fiziologic active. Modificarea echilibrului hormonal determină și modificări ale dezvoltării plantelor de cultură. S-au descris la tutun, căpșun și porumb maturări mai rapide decât la plantele lipsite de micorize.

Unii autori susțin existența chiar a unui **fenomen de dependență** a gazdei de micorize, în sensul acumulării superioare de biomasă (intensificarea fotosintezei și a cantității de carbon fixat care trece spre fungi).

## 8. ROLUL PROTECTOR AL MICORIZELOR

Ciupercile producătoare de micorize formează o barieră fizică, ce împiedică accesul fitopatogenilor din sol. Mantaua fungică acoperă părțile mai fragile ale radicelelor fără să lase nici o breșă, împiedicând astfel un contact direct al rădăcinilor tinere cu solul.

Mulți fungi de micorize produc acizi volatili cu efect fungistatic și antimicotic care limitează dezvoltarea microorganismelor, menținând un echilibru între fungii simbiotici și cei patogeni din sol. Dacă o parte din rădăcini au fost distruse de prezența micorizelor active, dezvoltarea de fungi în regiunea neinfectată poate compensa semnificativ aceste distrugerii.

Ciupercile producătoare de micorize au un efect de protecție împotriva agenților patogeni inclusiv a celor din filosferă datorită **inducerii rezistenței sistemice dobândite (SAR)**.

## 9. ALTE FUNCȚII ALE MICORIZELOR

Fungii de micorize sunt responsabili uneori de degradarea și absorbția nutrienților din litieră (stratul de frunze acumulat pe sol).

Miceliul extramatriceal al fungilor din micorizele veziculo-arbusculare are un rol important în legarea granulelor de nisip și în stabilizarea dunelor. Asemănător se comportă și hifele externe ale ciupercilor producătoare de ectomicorize.

Având în vedere toate aceste efecte benefice, ciupercile producătoare de micorize sunt folosite sub forma unor **biopreparate inoculante** în agricultură și silvicultură. Inocularea artificială cu fungi producători de micorize e indicată în cazul împăduririi regiunilor anterior lipsite de apă, regiunilor situate la mare altitudine sau a zonelor cu climă nefavorabilă, a solurilor neprielnice și nutrițional adverse (ex. soluri nisipoase sau podzolizate, sărăturate). De asemenea în cazul introducerii unor specii în noi habitate e nevoie de inoculare cu ciuperci producătoare de micorize.

Biopreparatele inoculante se obțin prin prelevarea și măcinarea rădăcinilor arborilor cu micorize bine dezvoltate. Se obțin până la 75g spori/kg rădăcină uscată. Stabilitatea preparatului e de aproape 4 luni. Utilizarea fungilor de micorize veziculo-arbusculare e mai limitată. Biopreparatul se obține prin cultivarea ciupercilor de endomicorize pe rădăcinile unor plante cu dezvoltare vegetativă mare. Ex. *Glomus* e cultivat pe rădăcini de salată și se obține produsul comercial **VAM inoculant**. Rezultate spectaculoase s-au obținut pe soluri slab fertile: brun-roșcate, podzolizate, sărăturate. În cazul solurilor cu fertilitate naturală ridicată (cernoziomuri) efectele nu sunt la fel de semnificative.

Crearea artificială de micorize endotrofe s-a dovedit utilă în cazul colonizării plantelor pe **habitate marginale** (sterilul de la mine metalifere sau cărbune, halele de cenuși ale termocentralelor etc.). Producerea artificială a micorizelor cu fungi foarte eficienți reprezintă o alternativă la chimizarea solului prin creșterea eficienței de preluare a nutrienților și scăderea nevoii de administrare a îngrășămintelor, putându-se asigura dezvoltarea unor plante care în unele condiții create tolerează creșterea pe soluri cu fertilitate scăzută sau pe diferite sisteme perturbate.

## 8. MICROBIOTA APELOR

**Microbiota izvoarelor** este foarte redusă fiind formată din microorganisme provenite din acvifere sau din straturile subterane în timpul trecerii spre suprafață. Microbiota izvoarelor cuprinde bacterii Gram negative (*Pseudomonas*) și forme prostecate (*Caulobacter*). Izvoarele pot fi de două tipuri:

-minerale (*Gallionella ferruginosa*, *Leptothrix ochracea*);

-termale (*Sulfolobus acidocaldarius* 570C, *Leptothrix thermalis* 900C).

**Microbiota râurilor** este foarte diferită în funcție de viteza de curgere, debit, adâncime și compoziție chimică. Râurile conțin comunități bacteriene ce se diversifică pe măsura îndepărtării de izvoare: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Caulobacter*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Gallionella*.

În apele poluate predomină bacteriile *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium sp.*, etc. În pâraiele curate și repezi este prezent *Sapromyces*. În râurile bogate în substanțe organice asimilabile sunt prezenți *Fungi Imperfecti* și *Ascomycetes*.

**Microbiota lacurilor cu apă dulce** include toate categoriile de microorganisme: eubacterii, actinomicete, cianobacterii, microfungi, microalge și protozoare. Dintre genurile cel mai frecvent întâlnite pot fi menționate: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Spirillum*, *Streptomyces*, *Vibrio*.

**Microbiota lacurilor cu apă sărată** este reprezentată de bacterii halotolerante, în special halofile, care conțin vacuole cu gaze ce le permit modificarea poziției pe verticala coloanei de apă și pigmenti carotenoizi cu rol protector față de intensitatea prea mare a luminii solare, care le colorează coloniile în roșu sau oranj strălucitor. Dintre genurile cel mai frecvent întâlnite sunt: *Halobacterium halobium*, *Halococcus sp.*, *Chromobacterium sp.*

**Microbiota apelor subterane (acviferelor)** - este important de cunoscut tipul și numărul microorganismelor prezente în apele freatice pentru a putea stabili caracterul lor potabil. Cu ajutorul tehnicilor uzuale de numărare directă și cultivare *in vitro* a microorganismelor și a celor moderne – utilizarea markerilor moleculari (ATP, fosfolipide, acid muramic) au fost evidențiate microorganisme (bacterii, microfungi și protozoare) nu doar în zonele superficiale ci și în sedimentele acvifere nisipoase și în apa freatică. Bacteriile cel mai frecvent evidențiate au fost bacterii anaerobe facultativ și obligate, heterotrofe, sulfat reducătoare, denitrificatoare, ferobacterii, metanogeni din genurile: *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, etc.

**Microbiota marină** este alcătuită din 3 categorii de microorganisme:

- autohtone (permanente);
- alohtone (temporare sau contaminante);
- ubicvitare (comune solului și mediului marin)

Cele mai multe bacterii marine sunt Gram negative, mobile, aerobe, facultativ anaerobe, iar cele din adâncul sedimentelor obligat anaerobe. Bacteriile care trăiesc la suprafață sunt cromogene, sintetizează pigmenti (galbeni, portocalii, bruni, verzi, roșii negri), care le protejează față de efectul nociv al radiațiilor luminii. Bacteriile marine au diverse roluri fiind

amonificatori, nitrit și nitrat bacterii, denitrificatori, sulfoxidante și sulfat reducătoare, ferobacterii, proteolitice, fermentative, chitinolitice, celulozolitice.

### **Caracteristici generale**

#### **a. Bacteriile marine:**

- ✓ speciile întâlnite aparțin genurilor: *Vibrio*, *Streptomyces*, *Spirillum*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* etc.;
- ✓ numărul bacteriilor este maxim în regiunile litorale și scade progresiv în zonele pelagice (apele de larg);
- ✓ un număr mare de bacterii se întâlnește în primii centimetri ai sedimentelor și scade în profunzimea sedimentelor.

#### **b. Cianobacteriile marine:**

- ✓ sunt răspândite ubicvitar;
- ✓ în regiunile de țărm sunt atașate de plante, mâl, nisip, roci (*Nodularia*, *Rivularia*, *Plectonema*, *Oscillatoria* etc.);
- ✓ unele specii formează bacterioplanctonul fiind reprezentate de genurile: *Pelagothrix*, *Nostoc* etc.;
- ✓ multe specii sunt halotolerante;
- ✓ unele tulpini (*Anabaena*, *Nodularia* etc.) sunt responsabile de “înfloririle” din zonele eutrofizate.

#### **c. Fungii marini:**

- ✓ levurile frecvent întâlnite sunt: *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* etc.;
- ✓ în general se cunosc 149 specii de *Ascomycetes*, 91 specii de *Pyrenomyces*, 51 specii de *Loculoascomycetes*, 56 specii de *Deuteromyces* și 4 specii de *Basidiomycetes*.

#### **d. Microfite:**

- ✓ se împarte în fitoplancton și microfitorbentos (bental) în funcție de domeniul în care trăiesc;
- ✓ fitoplanctonul este prezent în concentrație maximă în stratul superior al zonei eufotice;
- ✓ majoritatea microfitelor sunt fotoautotrofe, dar unele cresc și heterotrof;
- ✓ alături de bacteriile fototrofe îndeplinesc funcția de producători primari în cadrul ecosistemelor acvatice;
- ✓ compoziția microflorei M.Negre (litoralul românesc): *Bacillariophyta*, *Pyrophyta*, *Chlorophyta*, *Chrysophyta*, *Cyanophyta*, *Euglenophyta*, *Xanthophyta*;
- ✓ caracteristică este dominanța *diatomeelor*;
- ✓ “înflorirea “ apelor provocată de algele planctonice (cunoscută sub numele de “apă roșie”) este un fenomen frecvent întâlnit la litoralul românesc în zonele de mică adâncime; cel mai adesea fenomenul este cauzat de dezvoltarea masivă a diferitelor specii de diatomee (*Skeletonema costatum*, *Cyclotella caspis*, *Leptocylindrus danicus*, *Thalassionema nitzschioides*, *Nitzschidelicatissima*, *N. seriata*), peridinee (*Exuviaella cordata*, *Goniaulax polyedra*), cyanoficee (*Microcystis aeruginosa*), coccolithophoride (*Pontosphaera huxleyi*);
- ✓ densitățile algelor în timpul înfloririlor pot atinge valori de peste 100 milioane celule/litru, determinând mortalități masive ale faunei bentale; cordonul litoral de ape înflorite reprezintă o barieră în calea peștilor ce se apropie de mal.

#### **e. Zooplancton:**

- ✓ diversitate redusă – 142 specii în M. Neagră: *Cystoflagellata*, *Hydromedusae*, *Tintinnoidea*, *Scyphomedusae*, *Ctenophora*, *Rotatoria*, *Cladocera*, *Copepoda*, *Isopoda*, *Chaetognatha*, *Appendicularia*;
- ✓ se remarcă prezența unor forme dulcicole în sezonul marilor viituri ale Dunării (specii de rotifere, copepode, cladocere);
- ✓ zooplanctonul are o dezvoltare sezonieră, maximele de abundență primăvara – vara.

#### **f. Microorganisme bentale:**

- ✓ au o particularitate fundamentală și anume activitatea metabolică lentă;
- ✓ factorii determinanți sunt: disponibilitatea redusă de nutrienți, presiunea hidrostatică mare și temperatura scăzută.

## *Zonele de dezvoltare a microbiotei marine*

### **a. Interfața apă/aer:**

- ✓ este un habitat foarte aerat, intens luminat, cu o concentrare masivă de nutrienți și supus unor fluctuații de temperatură diurne și sezoniere;
- ✓ organismele sunt în continuă mișcare datorită acțiunii curenților și valurilor;
- ✓ se dezvoltă eubacterii, cianobacterii, alge, microfungi și protozoare alcătuind neustonul (gr. “neuo”= a aluneca);
- ✓ bacteriile aflate în număr mare (câteva milioane/cm<sup>2</sup>) sunt reprezentate de bacterii heterotrofe: *Nevskia* (specifică acestui habitat), *Leptothrix*, *Caulobacter*, *Alcaligenes*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Sarcina* etc.;
- ✓ cianobacteriile sunt reprezentate de: *Anabaena*, *Aphanizomenon* etc., iar fungii de diferite specii de levuri și de *Chladosporium*;

### **b. Zona de larg până la 200 m adâncime:**

- ✓ cuprinde organisme microscopice care înoată sau plutesc în pătura superficială a apelor de larg; formează planctonul (gr. “planktos” = care călătorește);
- ✓ planctonul are densitatea maximă în zona aerobă, în care fitoplanctonul realizează producția primară de materie organică;
- ✓ fitoplanctonul ocupă coloana de apă situată la adâncimea de 20 – 50 cm, ce corespunde condițiilor optime de fotosinteză;
- ✓ cianobacteriile preferă regiuni cu intensitate mai mică a luminii, datorită complexului lor de fotopigmenți și anumitor factori de mediu (temperatură, nutrienți etc.).

### **c. Zona bentală:**

- ✓ sedimentul bentonic reprezintă un mediu favorabil pentru dezvoltarea microorganismelor; aerob la suprafață și progresiv anaerob în adâncime permite dezvoltarea producătorilor secundari, care folosesc compușii organici depuși;
- ✓ organismele care se dezvoltă în această zonă formează bentosul (gr. “benthos” = adâncul mării).

### **d. Zona litorală:**

- ✓ se găsesc comunități de microorganisme care trăiesc pe suprafața nisipurilor marine submerse, sub forma unor mici colonii;
- ✓ aceste comunități sunt alcătuite din eubacterii, cianobacterii, alge și protozoare, formând comunitățile epipsamice (gr. “psammos” = nisip).

### **e. Pe suprafața organismelor animale:**

- ✓ organismele animale acvatice (crustacee, pești, mamifere, viermi, copepode) sunt acoperite de un strat de microorganisme care colonizează suprafața corpului lor;
- ✓ bacteriile formează comunități cu densități cuprinse între 1000 – 10.000 celule/cm<sup>2</sup>;
- ✓ aceste organisme formează comunitățile epizoice;
- ✓ comunitățile epizoice pot cuprinde și microorganisme patogene.

### **f. Pe suprafața plantelor acvatice:**

- ✓ reprezintă o comunitate de suprafață alcătuită din microorganisme asociate cu rădăcinile plantelor acvatice;
- ✓ include microorganisme fotoautotrofe, heterotrofe, saprofite și parazite;
- ✓ această comunitate de microorganisme poartă numele de epifiton (gr. “epi” = pe, “fiton” = plantă);
- ✓ aproape toate plantele acvatice au un epifiton, cu excepția părților tinere care sunt sterile, datorită pH-ului = 5 și eliberării de substanțe antibiotice; regiunile bătrâne ale plantelor au pH 8 și sunt populate de bacterii, ce pot fi utilizate ca hrană de către protozoare și rotifere;
- ✓ numărul bacteriilor saprofite dezvoltate pe algele saprofite variază între 10<sup>4</sup> – 10<sup>9</sup>/cm<sup>2</sup>;

✓ dintre bacterii predomină cele care au structuri de adeziune: *Leucothrix*;

✓ dintre cianobacterii predomină *Oscillatoria* și *Lynghya*.

**g. Pe suprafața rocilor:**

✓ se dezvoltă alge brune (dominante), alge verzi, cianobacterii, eubacterii și diatomee;

✓ aceste comunități se numesc epiliton;

✓ rocile de pe malul stâncos sunt populate de cianobacterii (*Calothrix*, *Gloeocapsa* etc.) și uneori de licheni (*Verrucaria*).

## 9. MICROBIOTA DIN SOL

Microbiota din sol este reprezentată de bacterii (eubacterii, actinomicete, cianobacterii), funghi microscopici, alge și protozoare.

**Bacteriile** reprezintă grupul cel mai numeros și mai activ din sol, predominante fiind bacteriile Gram negative. Bacteriile Gram pozitive sunt și ele prezente fiind mai numeroase decât în mediile acvatice.

**Rolul bacteriilor din sol:**

✓ Sunt implicate în circuitele geobiochimice (carbonului, azotului, fosforului, sulfului, fierului);

✓ Participă la procesele de mineralizare asigurând fertilitatea solului și nutriția plantelor

✓ Participă la solubilizarea compușilor organici și anorganici, insolubili și inaccesibili plantelor;

✓ Sunt organisme care fixează azotul molecular atmosferic, necesar pentru nutriția plantelor;

✓ Participă la agregarea particulelor de sol prin polizaharidele extracelulare;

✓ Participă la formarea și degradarea humusului;

**Exemple:**

✓ *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*;

✓ *Bacillus*, *Brevibacterium*;

✓ *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*;

✓ *Flavobacterium*;

✓ *Micrococcus*, *Mycobacterium*;

✓ *Pseudomonas*;

✓ *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*;

✓ *Xanthomonas*.

**Actinomicetele** sunt un grup de bacterii tranzitoriu sau constant filamentoase, care formează o rețea micelială ramificată.

**Rolul actinomicetelor în sol:**

✓ Participă la mineralizarea unor compuși (chitina) mai rezistenți la acțiunea bacteriilor și fungilor;

✓ Formarea humusului prin producerea unor compuși aromatici, structurarea solului prin agregarea particulelor de sol;

✓ Fixarea azotului molecular (reprezentanții genului *Frankia*);

✓ Formarea simbiozilor de tipul actinorizelor;

✓ Sintetizează diferite antibiotice, care pot regla densitatea bacteriilor sau fungilor în anumite habitate sau îndepărta unii patogeni – streptomycină, cloramfenicol, tetraciline, kanamicină, micostatin;

✓ Actinomicetele termofile sunt predominante în în paiele încălțate, în grămezile de compost și în unele gunoaie de grajd.

**Exemple:**

- ✓ *Actinomyces, Actinoplanes*;
- ✓ *Mycobacterium, Mycoccus, Micromonospora*;
- ✓ *Nocardia*;
- ✓ *Streptomyces, Streptosporangium*;
- ✓ *Thermoactinomyces*
- ✓ *Nocardia cellulans, N. vaccinii* – pot degrada celuloza;
- ✓ *Streptomyces violaceus, S. cellulosa* – pot degrada celuloza;
- ✓ *Nocardia paraffinae* – poate degrada chitina și parafină;
- ✓ *N. opaca și N. rubra* - pot degrada fenoli

**Cianobacteriile** sunt bacterii fototrofe care formează cruste pe suprafața solurilor umede fără vegetație sau se dezvoltă pe stratul superior iluminat al solului.

**Rolul cianobacteriilor:**

- ✓ Se pot dezvolta pe suprafața solurilor aride datorită capacității de a realiza fotosinteza și de a utiliza compuși anorganici simpli;
- ✓ Fixează azot molecular – *Anabaena, Calothrix, Nostoc, Plectonema, Schizothrix*;
- ✓ Legarea particulelor de sol și stabilizarea structurii acestuia

**Exemple:**

- ✓ *Anabaena, Aulosira; Calothrix*;
- ✓ *Microcoleus; Nodularia, Nostoc*;
- ✓ *Oscillatoria; Phormidium, Plectonema*;
- ✓ *Schizothrix, Scytonema; Tolypothrix*.

**Fungii** sunt microorganismele care trăiesc liber sau în asociație cu rădăcinile plantelor, reprezentând o parte semnificativă din biomasa microbială din sol, deși sunt mai puțin numeroși decât bacteriile.

**Levurile** sunt reprezentate de următoarele genuri:

- ✓ *Candida, Cryptococcus*;
- ✓ *Debaromyces*;
- ✓ *Hansenula*;
- ✓ *Kluyveromyces*;
- ✓ *Lipomyces*;
- ✓ *Pichia*;
- ✓ *Rhodotorula*;
- ✓ *Saccharomyces, Schizoblastosporium*;
- ✓ *Torula, Torulopsis, Trichospora*;
- ✓ *Zygosaccharomyces*

**Mucegaiurile** din sol aparțin la peste 600 specii dintre care:

- ✓ 200 din clasa *Phycomycetes* – ordinul *Mucorales* (*Absidia, Cunninghamella, Mucor, Rhizopus*); - ordinul *Peronosporales* (*Phytium*);
- ✓ 32 *Ascomycetes* - *Chaetomium* și *Morchella*;
- ✓ 385 *Fungi Imperfecti* – *Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Botrytis, Cladosporium, Fusarium, Geotrichum, Gliocladium, Penicillium, Phoma, Trichothecium, Verticillium*.

**Rolul fungilor din sol**

- ✓ Pot degrada substanțe organice simple (hexoze, pentoze, acizi organici, aminoacizi, peptide) complexe (proteine, celuloză, lignină);
- ✓ Participă la formarea structurii solului prin efectul de imobilizare mecanică și agregare a particulelor de sol, asigurând stabilitatea acestora;
- ✓ Participă la formarea humusului prin sinteza de substanțe aromatice asemănătoare ligninelor care sunt introduse în rezerva din sol și prin conversii transformate în substanțe humice;
- ✓ Produc substanțe antibiotice;
- ✓ Formează asociații de tip simbiotic cu rădăcinile plantelor, numite micorize;
- ✓ Unele specii acționează ca prădători, participând la menținerea echilibrului biologic din sol.

## **10. BIOSURFACTANȚI**

Cercetările din domeniul biosurfactanților au început să se intensifice în ultimii ani datorită potențialului mare de utilizare a acestora în diferite ramuri ale economiei cum ar fi: agricultura, industriile alimentară, farmaceutică, petrochimică, a țiteiului și hârtiei. Dezvoltarea acestei direcții de cercetare este foarte importantă în principal datorită preocupării actuale pentru protecția mediului înconjurător. Cel mai mare avantaj al surfactanților microbieni față de cei chimici este faptul că sunt biodegradabili și nu sunt toxici pentru mediul natural.

Biosurfactanții au devenit un produs biotehnologic important cu aplicații în industrie și medicină. Motivul popularității lor ca produși microbieni foarte valoroși constă în activitatea lor specifică, toxicitatea scăzută, relativ ușor de obținut și domeniile variate de aplicabilitate. Pot fi utilizați ca emulsifianți, de-emulsifianți, agenți de înmuiere, agenți de dispersare, agenți de spumare, ingrediente alimentari activi și detergenți în diferite sectoare industriale cum ar fi: petrol și petrochimie, chimie organică, alimentară și a băuturilor, cosmetică și farmaceutică, minieră și metalurgică, agrochimie și fertilizanți, protecția și managementul mediului, etc. Numeroase specii de bacterii, levuri și fungi filamentoși produc macromolecule care au proprietăți tensioactive, "surface-active". Biosurfactanții produși de aceste microorganisme au un potențial comercial mare, putând fi utilizați în numeroase aplicații alimentare și nonalimentare, precum: bioremediere, recuperarea țiteiului, formularea erbicidelor și pesticidelor, produse cosmetice (ex. detergenți și cosmetice), formularea lubrifianților și inhibitori ai creșterii microorganismelor. Soforolipidele, substanțe de natură glicolipidică sintetizate de mai multe specii de *Candida* sau alte specii de levuri înrudite, conțin diglucide legate de acizi grași hidroxilați prin legături glicozidice. Soforolipidele sunt un grup de biosurfactanți cu aplicații potențiale și produse noi (Solaiman, 2004).

### **10.1. UTILIZAREA MICROORGANISMELOR ÎN RECUPERAREA ȚITEIULUI**

Un domeniu cu considerabile potențiale aplicații ale biosurfactanților este recuperarea țiteiului – "microbial enhanced oil recovery" (MEOR). Microorganismele din rezervoare sunt stimulate să producă polimeri și surfactanți care ajută prin scăderea tensiunii superficiale la interfața dintre țitei și rocă. Pentru a produce biosurfactanți *in situ*, microorganismelor din rezervoare li se furnizează substraturi ieftine, precum melasa sau substanțe anorganice, pentru stimularea creșterii și producerea biosurfactanților. Pentru a putea fi utile în recuperarea țiteiului *in situ*, bacteriile trebuie să fie capabile să crească în condițiile extreme din rezervoarele de țitei: temperatura ridicată, presiune, salinitate și un nivel scăzut de oxigen. Au fost izolate câteva bacterii aerobe și anaerobe termofile tolerante la presiune și salinitate moderată, care sunt capabile să mobilizeze țitei nerafinat în experimente de laborator. Clark și colab. au estimat ca 27% din rezervoarele de țitei din USA sunt influențate de creșterea

microorganismelor și pot fi folosite în recuperarea țițeiului. Eficacitatea acestei tehnici a fost raportată în studii în câmp care s-au realizat în USA, Cehia, Slovacia, România, Ungaria, Polonia și Olanda.

### **10.2. DEGRADAREA HIDROCARBURILOR ÎN SOL**

Degradarea depinde de prezența în sol a speciilor de microorganisme care degradează hidrocarburi, de compoziția hidrocarburilor, disponibilitatea oxigenului, apa, temperatura, pH-ul și substanțele anorganice. Natura fizică a hidrocarburilor poate de asemenea influența biodegradarea. Adăugarea surfactanților sintetici sau biosurfactanților duce la creșterea mobilității și solubilității hidrocarburilor, fapt foarte important pentru o degradare microbiană eficientă. Utilizarea biosurfactanților în degradarea hidrocarburilor a dat rezultate diferite. Lindley și Heydeman au utilizat tulpina fungică *Cladosporium resinae* care crește pe un amestec de alcani și a produs acizi grași extracelulari și fosfolipide, în principal acid dodecanoic și fosfatidilcolina. Suplimentarea mediului de cultură cu fosfatidilcolina a îmbunătățit degradarea alcanilor cu 30%. Foght și colab. au raportat că emulsifiantul Emulsan stimulează mineralizarea compușilor aromatici de o cultură pură bacteriană, dar inhibă procesul de degradare când este utilizată o cultură mixtă de bacterii. Oberbremer și Muller-Harting au utilizat populații mixte de microorganisme din sol pentru testarea degradării hidrocarburilor conținute de țiței. În prima fază a degradării hidrocarburilor a fost folosit naftalenul; în timpul celei de-a doua faze au fost degradate alte componente ale țițeiului, după producerea biosurfactanților de anumite microorganisme care au scăzut tensiunea interfacială. O metodă de îndepărtare a contaminanților cu hidrocarburi din sol este adăugarea biosurfactanților în solul contaminat pentru a crește astfel mobilitatea acestora. Hidrocarburi astfel emulsionate pot fi apoi recuperate cu o sondă și apoi biodegradate. A fost studiată spălarea solului *in situ* cu doi surfactanți sintetici Adsee 799 și Hyonic NP-90. Îndepărtarea hidrocarburilor din sol prin adăugarea surfactanților la apa de spălare a avut un oarecare succes. Mai multe tulpini de bacterii anaerobe produc biosurfactanți care reduc tensiunea superficială de la 27 la 50 mN/m ceea ce permite "solubilizarea" hidrocarburilor. Biosurfactanții au fost utilizați și pentru recuperarea substanțelor xenobiotice. Astfel, Berg și colab. au utilizat surfactanți produși de o tulpină de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, care au crescut solubilitatea hexaclorobifenilului adăugat unei probe de șlam permițând recuperarea acestuia în proporție de 30% în faza apoasă. Comparativ cu utilizarea unui surfactant chimic - ligninsulfonat de sodiu, acest procent a fost de 3 ori mai mare (9,3%). Adăugarea simultană a surfactantului biologic și a celui chimic a avut un efect sinergic, solubilizarea hexaclorobifenilului fiind de 41,5%. Un alt exemplu este tulpina *Pseudomonas ceparia* AC1100 care produce un emulsifiant ce formează o suspensie stabilă cu 2,4,5-T și de asemenea prezintă o activitate de emulsifiere față de clorofenoli, putând fi folosit în degradarea bacteriană a compușilor organoclorurați.

### **10.3. DEGRADAREA HIDROCARBURILOR ÎN MEDIUL ACVATIC**

Atunci când este deversat petrol în mediul acvatic hidrocarburi ușoare se volatilizează, iar hidrocarburi polare se dizolvă în apă. Totuși din cauza solubilității scăzute a petrolului < 1ppm, majoritatea componentelor acestuia rămân la suprafața apei. Îndepărtarea acestora se poate face prin procese de fotooxidare, evaporare și degradare microbiană. Deoarece microorganismele care degradează hidrocarburi sunt prezente în apa de mare, biodegradarea poate fi una dintre cele mai eficiente metode de îndepărtare a poluanților. Surfactanții amplifică procesul de degradare prin disperarea și emulsionarea hidrocarburilor. Microorganisme care sunt capabile să degradeze compuși  $C_xH_y$  au fost izolate din mediul acvatic. Aceste microorganisme care manifestă activitate de emulsionare ca și microorganismele din sol produc surfactanți care pot fi utili în mediul acvatic. Chakrabarty a raportat că un emulsifiant produs de tulpina *Pseudomonas aeruginosa* SB30 este capabil să disperseze petrolul în picături foarte fine, putând fi util în curățarea tancurilor cu petrol. Astfel, un compartiment al unui tanc



petrolier ce conținea balast de apă uleioasă a fost suplimentat cu uree,  $K_2HPO_4$  și aerat timp de 4 zile. S-a constatat că tancul nu mai prezenta stratul fin de reziduuri care au fost îndepărtate, datorită acțiunii surfactanților care au fost produși de bacterii în urma suplimentării cu substanțe nutritive și oxigen. Surfactanții au fost studiați pentru utilizarea în reducerea viscozității titeiului, pentru a facilita recuperarea și transportul lui. Emulsan, un lipopolizaharid produs de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 a fost propus pentru utilizarea în industria petrolieră pentru: curățarea petrolului și nămolului din barje și tancuri, reducerea viscozității țiteiului, recuperarea țiteiului și stabilizarea emulsiei apă-petrol în combustibili. Solubilizarea specifică a unor compuși  $C_xH_y$  în timpul creșterii organismelor procariote a fost observată de Reddy și colab. Solubilizarea compușilor  $C_xH_y$  a fost puternic inhibată de EDTA care a fost depășită de ionii de  $Ca^{2+}$  în exces, ceea ce a dus la concluzia că solubilizarea specifică a compușilor  $C_xH_y$  este un mecanism important în înțelegerea modului de degradare a acestora.

#### 10.4. DEGRADAREA PESTICIDELOR

Datorită proprietăților biodegradative a biosurfactanților aceștia pot fi utilizați în aplicații de bioremediere pentru protecția mediului, în special pentru îndepărtarea pesticidelor. Studiind literatura de specialitate se poate remarca faptul că aplicarea biosurfactanților în domeniul degradării pesticidelor este încă la început comparativ cu domeniul degradării hidrocarburilor. În India câteva laboratoare au inițiat studii în acest sens, remarcându-se lucrările cercetătorilor: Banarjee și colab. pe 2,4,5-acid tricloroacetic, Patel și Gopinath pe Fenthion, Anu Appaiah și Karanth pe  $\alpha$  HCH, care au fost susținute la diferite simpozioane. Hexaclorociclohexanul HCH este un pesticid încă foarte mult utilizat în numeroase țări. Dintre cei opt izomeri cunoscuți ai HCH, forma  $\alpha$  constituie mai mult de 70% din produsul tehnic, care nu are efect insecticid și se presupune că este carcinogenic. În India utilizarea HCH, care este un amestec izomeric, continuă datorită prețului mai scăzut cu de 10 până la 12 ori față de Lindan care conține  $\gamma$  HCH pur. Trebuie subliniat faptul că poluarea mediului cu HCH amenință toate formele de viață. Solubilitatea mică a acestuia este unul dintre factorii limitativi în degradarea microbiană a  $\alpha$  HCH. Prezența celor 6 ioni de clor în molecula HCH este un alt factor care face ca acesta să fie persistent în biosferă. Deși există câteva cercetări în legătură cu biodegradarea izomerilor specifici ai HCH în animale, plante, sol și sisteme microbiene, datele referitoare la metabolizarea  $\alpha$  HCH de către microorganisme este limitată. Mai mult, mecanismul exact al translocării HCH-lui la locul descompunerii și degradării  $\alpha$  HCH în bacterii nu este foarte bine înțeles. În cursul experimentelor realizate de cercetători din India care au avut ca scop degradarea bacteriană a HCH au fost izolate mai multe tulpini bacteriene capabile să degradeze HCH. Una dintre tulpini care este eficientă în degradarea HCH a fost identificată ca aparținând genului *Pseudomonas* Ptm<sup>+</sup>. Aceste tulpini produc biosurfactanți extracelulari în mediu mineral ce conține HCH. Biosurfactanții obținuți emulsionează organoclorura HCH solidă într-o măsură mai mare decât alte substanțe organoclorurate ca DDT și ciclodienele, sugerând astfel specificitatea surfactanților în dispersarea HCH. De asemenea, a fost demonstrat faptul că cea mai mare cantitate de emulsifianti se sintetizează înainte de începerea degradării HCH de către tulpina de *Pseudomonas* crescută în mediu lichid. Rolul biosurfactanților în degradarea HCH a fost descoperit utilizând biosurfactanți parțial purificați. Biosurfactanții extracelulari sunt substanțe macromoleculare de natură lipoglicoproteică. Componenta glucidică a fost identificată prin diferite metode analitice ca fiind ramnoza. Această componentă este stabilă și este necesară activității surfactantului. Cercetări minuțioase au relevat faptul că fracția proteică reprezintă enzime din metabolismul HCH. În prezența biosurfactanților HCH este convertit prin acțiunea isomerazei și declorinazei la tetraclorohexan și apoi la clorofenol. Producția biosurfactanților pe Fenthion un insecticid lichid a stârnit de asemenea interesul cercetătorilor. *Bacillus subtilis* secretă biosurfactanți atât în timpul fermentației în mediu lichid cât și pe mediu solid. Surfactanții microbieni produși de aceste două tulpini prezintă proprietăți de agenți de curățare pentru îndepărtarea pesticidelor din containerele utilizate, tancurile de amestecare și de păstrare. S-au făcut testări pentru standardizarea parametrilor producției biosurfactanților în ambele sisteme de fermentație lichid și solid. Un alt

sudiu a relevat faptul că biosurfactanții produși de tulpina *Pseudomonas Ptm*<sup>+</sup> au permis mărirea gradului de dispersare a HCH în apă de 250 de ori. Adăugarea fie a microorganismelor fie a biosurfactanților produși de acestea pe fructe, legume și semințe a îndepărtat reziduurile de HCH foarte bine. Studii de laborator au arătat că biosurfactanții sunt foarte eficienți în curățarea containerelor în care reziduurile de HCH sunt aderate de perete. Au fost realizate studii pentru producerea la scară industrială a biosurfactanților produși de tulpina *Pseudomonas Ptm*<sup>+</sup> și se preconizează bioformularea acestora pentru utilizarea în îndepărtarea HCH din soluri contaminate.

### **10.5. IMPORTANȚA BIOSURFACTANȚILOR PENTRU ARHITECTURA CELULARĂ**

Recent a fost raportată importanța biosurfactanților pentru arhitectura celulară bacteriană. Aceasta include rolul surfactinului în formarea sporilor la *Bacillus subtilis*, rolul ramnolipidului în formarea biofilmelor la *Pseudomonas aeruginosa* și rolul streptofactinului în formarea miceliilor aeriene la *Streptomyces tendae*. Din punct de vedere structural biosurfactanții sunt molecule amfifile, conțin părți polare și nonpolare distincte care le conferă capacitatea de a se acumula la suprafață și la interfață.

Biosurfactanții sunt produși de bacterii din diferite genuri. Genele care codifică pentru biosinteza biosurfactanților sunt diferite și ca rezultat structura moleculară asociată fiecărei clase de surfactanți este foarte variată, ceea ce conferă acestora proprietăți fizico-chimice diferite. Grupările nonpolare – ”coada” sunt în general asemănătoare la biosurfactanți, ceea ce îi diferențiază sunt grupările polare – ”capul”, de aceea biosurfactanții sunt clasificați în funcție de capul polar în următoarele clase: glicolipide, fosfolipide, săruri ale acizilor grași și surfactanți polimerici.

### **10.6. UTILIZAREA BIOSURFACTANȚILOR ÎN AGRICULTURĂ**

Extractul lipidic obținut ca bioprodus în timpul producerii drojdiei uscate, este un lichid de culoare brună cu miros caracteristic și activitate interfacială ridicată. Acest produs are aplicații multiple în agrochimie, flotația mineralelor, producerea și prelucrarea bitumului. Produsul poate fi utilizat ca agent de emulsionare și dispersare în timpul formulării erbicidelor, pesticidelor și prepararea reglatorilor de creștere ai plantelor. Includerea fosfolipidelor în formulare facilitează penetrarea substanțelor active în țesuturile plantelor, făcând posibilă aplicarea la o concentrație foarte scăzută a substanțelor. Acizii grași constituenți ai extractului biolipidic au activități antifitovirale și antifungice și pot fi aplicate în combaterea bolilor plantelor. De asemenea, acești acizi grași cresc toleranța la stres a plantelor, ducând la creșterea producției în ciuda secetei.

### **10.7 PRODUCEREA MICROBIANĂ A BIOSURFACTANȚILOR**

Numeroase microorganisme produc substanțe tensioactive, biosurfactanți, care variază în ceea ce privesc proprietățile chimice și dimensiunea moleculei. În general surfactanții cu masă moleculară mică sunt de natură glicopilidică, iar cei cu masă moleculară mare sunt fie heteropoliglucide polianionice care conțin o parte hidrofobă legată prin legături covalente sau complexe constituite din poliglucide și proteine. Producția de biosurfactanți depinde foarte mult de mediul de creștere al microorganismelor. Marea diversitate a biosurfactanților face din ei un grup interesant de substanțe cu aplicații în multe domenii cum ar fi agricultura, sănătatea, industria alimentară, combaterea poluării mediului (de ex. în degradarea hidrocarburilor prezente în sol). Biosurfactanții sunt compuși amfifili produși la suprafața celulelor microbiene sau secretați în mediu fiind formați dintr-o parte hidrofilă și una hidrofobă, care reduc tensiunea superficială și interfacială dintre două molecule diferite la suprafață și respectiv interfață. Deoarece biosurfactanții și bioemulsifiantii manifestă proprietăți de

emulsionare, bioemulsifiantii sunt adesea categorisiți ca biosurfactanți, deși aceștia pot să nu scadă tensiunea superficială. Un biosurfactant poate avea una dintre următoarele structuri: acid micolic, glicolipide, complex lipopolizaharidic, lipoproteine sau lipopeptide, fosfolipide sau suprafața celulară în sine. O atenție considerabilă s-a acordat producerii moleculelor active de origine biologică datorită utilizării potențiale în prelucrarea alimentelor, farmacologie și industria petrolului. Deși tipul și cantitatea de surfactanți microbieni produsă depinde în primul rând de organismul producător, factori precum sursa de carbon, azot, microelementele, temperatura, gradul de aerare afectează de asemenea producția organismului. Poluanții hidrofobi prezenți în hidrocarburile din petrol, sol și mediu acvatic necesită o solubilizare înainte de a fi degradate de microorganisme. Mineralizarea este guvernată de desorbția hidrocarburilor din petrol. Surfactanții pot mări suprafața materialelor hidrofobe, cum ar fi pesticidele din sol și mediul acvatic, astfel crescându-le solubilitatea în apă. Astfel, prezența surfactanților poate crește gradul de degradare de către microorganismele al poluanților.

### **10.8. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE BIOSURFACTANȚI**

Microorganismele utilizează o varietate mare de compuși organici ca sursă de carbon și energie pentru creșterea lor. Atunci când sursa de carbon este un substrat insolubil de ex. o hidrocarbură ( $C_xH_y$ ), microorganismele facilitează difuzia acestui compus în celulă prin producerea biosurfactanților. Unele bacterii și levuri secretă surfactanți ionici care emulsionează substratul – hidrocarbura în mediul de cultură. Câteva exemple de biosurfactanți din această categorie sunt ramnolipidele care sunt produse de diferite specii de *Pseudomonas* sau soforolipidele care sunt produse de mai multe de specii de *Torulopsis*. Alte microorganisme sunt capabile să-și modifice structura peretelui celular, care se traduce prin sintetizarea lipopolizaharidelor sau surfactanților anionici în peretele celular. Ca exemple de microorganisme din această categorie pot fi enumerate: *Candida lipolytica* și *C. tropicalis* care produc lipopolizaharide legate de peretele celular atunci când sunt crescute pe n-alcani; *Rhodococcus erythropolis* și multe specii ale genului *Mycobacterium*; *Arthrobacter* sp. care sintetizează corinomicolat trehaloza anionică. Există lipopolizaharide cum este Emulsanul sintetizat de *Acinetobacter* sp., lipoproteine sau lipopeptide cum sunt Surfactinul și Subtilinul produse de *Bacillus subtilis*. Alți biosurfactanți sunt: Micolatul și Corinomicolatul produse de *Rhodococcus* sp., *Corynebacteria* sp., *Mycobacteria* sp., *Nocardia* sp. și ornitinlipide care sunt produse de *Pseudomonas rubescens*, *Gluconobacter cerinus* și *Thiobacillus ferrooxidans*.

### **10.9. CLASIFICAREA ȘI NATURA CHIMICĂ A BIOSURFACTANȚILOR**

Surfactanții microbieni sunt molecule complexe cu structură foarte variată care includ peptide, acizi grași, fosfolipide, glicolipide, antibiotice, lipopeptide, etc. Microorganismele produc de asemenea surfactanți care pot fi combinații de mai multe substanțe, aceștia fiind numiți surfactanți microbieni polimerici (PMS). Mulți dintre biosurfactanți au fost purificați și a fost elucidată structura chimică. Biosurfactanții cu masă moleculară mare sunt în general heteropolizaharide polianionice ce conțin atât polizaharide cât și proteine, iar biosurfactanții cu masă moleculară mică sunt în general glicolipide. Cantitatea de biosurfactanți produsă de microorganisme variază în funcție de condițiile de mediu. Celulele microbiene intacte care au o suprafață puternic hidrofobă pot fi ele însele biosurfactanți. În unele cazuri, surfactanții pot avea un rol important în creșterea microorganismelor pe substraturi insolubile precum hidrocarburile și sulfurile. Surfactanții extracelulari au rol în aderența, emulsifierea, dispersia, flocația, agregarea celulelor și în fenomenul de desorbție. În continuare vor fi descrise pe scurt tipurile de biosurfactanți în funcție de natura lor chimică:

**1. Glicolipidele** - sunt cele mai obișnuite tipuri de biosurfactanți. Conținutul mono-, di-, tri- și tetraglucidi includ glucoza, manoza, galactoza, acidul glucuronic, ramnoza și sulfatul de galactoză. Componenta lipidică este constituită din acizi grași asemănători fosfolipidelor. Glicolipidele pot fi clasificate astfel:

**a) Trehalozolipide** - creșterea în formă de serpentină observată la diferite specii ale genului *Mycobacterium* se datorează prezenței esterilor de trehaloză situați pe suprafața celulară. Factorii de legătură de la diferite specii de *Mycobacteria*, *Corynebacteria*, *Nocardia* și *Brevibacteria* diferă în dimensiunea și structura esterilor acidului micolic.

**b) Soforolipidele** - sunt produse de diferite tulpini de levuri din genul *Torulopsis*. Unitatea glucidică este diglucidul soforoză, care este constituit din două unități  $\beta$ -1,2-glucoză. Grupările hidroxi sunt în general acetilate. Soforolipidele reduc tensiunea superficială dintre două molecule diferite la suprafață, deși sunt agenți de emulsionare. Soforolipidele produse de *Torulopsis* au proprietăți de stimulare, inhibare și nu au efect asupra creșterii levurilor pe substraturi insolubile în apă.

**c) Ramnolipidele** - unele tulpini de *Pseudomonas* sp. produc cantități mari de glicolipide constituite din două molecule de ramnoza și două molecule de acid  $\beta$  hidroxicanoic. Una din grupările OH ale unuia dintre acizi este implicată în legătura glicozidică cu capătul reducător al ramnozei, iar altă grupare OH a celui de-al doilea acid este implicată în formarea esterului. Deoarece unul dintre acizii carboxilici este liber ramnolipidele au caracter acid pH=4. Ramnolipidele scad tensiunea superficială, emulsifică hidrocarburile și stimulează creșterea celulelor de *Pseudomonas* pe mediu ce conține n-hexadecan. Sinteza ramnolipidelor este influențată în mare măsură de limitarea sursei de azot. Ramnolipidele purificate scad tensiunea superficială față de n-hexadecan în apă cu 1 mN/m și au o concentrație micelară critică (cmc) de 10 până la 30 mg/l în funcție de pH și salinitate.

**2. Acizii grași** - sunt produși din alcani de către microorganisme pe cale oxidativă. Pe lângă lanțul de acizi, microorganismele produc un complex de acizi grași care conțin grupări OH și ramificări alchil. Unii dintre acești acizi sunt de exemplu, acizii corinomucolici, care sunt surfactanți.

**3. Fosfolipidele** - sunt o componentă importantă a membranelor microbiene. Când anumite bacterii care degradează hidrocarburi sau levuri sunt crescute pe substrat de alcani, nivelul fosfolipidelor crește foarte mult. Fosfolipidele secretate de o tulpină de *Acinetobacter* cultivată pe substrat cu hexadecan prezintă proprietăți de potențiali surfactanți. Fosfolipidele produse de *Thiobacillus thiooxidans* sunt responsabile de solubilizarea sulfului necesar creșterii.

#### **4. Antibiotice**

**a) Gramicidin S** - multe bacterii produc un antibiotic decapeptid, gramicidin S. Un preparat obținut din spori de la *Brevibacterium brevis* conține o cantitate foarte mare de gramicidin S puternic legat de suprafața externă a sporilor. Mutantele cărora le lipsește gramicidinul S germinează rapid și nu au o suprafață lipofilică. Activitatea antibacteriană a gramicidin S se datorează activității de suprafață mari.

**b) Polimixinele** - acest grup de antibiotice produs de *Brevibacterium polymyxa* și alți bacili înrudiți. Polimixin B este un decapeptid în care aminoacidul din poziția 3 până la cel din poziția 10 formează o octapeptidă ciclică. Un lanț ramificat de acizi grași este legat la acidul terminal 2,4-diaminobutiric. Polimixinele sunt capabile să solubilizeze (degradeze) anumite enzime din membrana celulară.

**c) Surfactinul (subtilisinul)** – unul dintre cei mai activi biosurfactanți produși de *Bacillus subtilis* este un lipopetid ciclic numit surfactin. Cantitatea de surfactin produsă de *B. subtilis* poate fi îmbunătățită până la 0,8 g/l prin îndepărtarea continuă a surfactinului prin fracționarea spumei și adăugarea unor săruri cu fier sau magneziu la mediul de cultură.

**d) Antibioticul TA** – *Myxococcus xanthus* produce antibioticul TA care inhibă sinteza peptidoglicanului prin interferarea cu polimerizarea pentapeptidelor lipodizaharidice. Acest antibiotic este folosit în aplicații chemoterapeutice.

**5. Surfactanții microbieni polimerici** – mulți dintre aceștia sunt heterogluclide polimerice ce conțin proteine.

**a) Emulsanul** – *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (ATTC 31012) a fost izolată în timpul investigării unui factor care limita degradarea petrolului în apa marină. Această bacterie emulsifia eficient hidrocarburile în apă și a fost folosită mai târziu cu succes pentru curățarea compartimentelor cargourilor unui tanc petrolier. Acest fenomen s-a datorat producerii extracelulare a unui factor emulsifiant cu greutate moleculară mare, emulsanul.

**b) Complexul poliglucid proteic** – o mutantă a tulpinii *A. calcoaceticus* BD413, secretă cantități mari de poliglucide împreună cu proteine. Activitatea de emulsifiere necesită ambele substanțe atât poliglucidele cât și proteinele.

**c) Alți emulsifianți produși de *Acinetobacter*** – producerea de emulsifianți extracelulari este larg răspândită printre speciile genului *Acinetobacter*. În urma unui screening 8 din 16 tulpini de *A. calcoaceticus* produceau cantități mari de emulsifianți după creșterea pe mediu cu etanol. Această fracțiune extracelulară a fost foarte activă în deemulsifierea unei emulsii formată din cherosen și apă stabilizată cu o mixtură de Tween 60 și Span 60.

**d) Complexe poliglucide-lipide produse de levuri** – un emulsifiant, liposan, parțial purificat ce conține 95% glucide și 5% proteine este produs de specia *Endomycopsis lypolitica* YM pe mediu cu  $C_xH_y$ . *Torulopsis petrophilum* produce diferite tipuri de surfactanți în funcție de mediul de cultură. Pe substraturi insolubile această levură produce glicolipide care sunt incapabile să stabilizeze emulsii, dar dacă este folosită glucoza ca substrat levura sintetizează un potențial emulsifiant.

**e) Proteine emulsifiante** – bacteria *Pseudomonas aeruginosa* produce proteine emulsifiante. Această proteină PA este produsă pe substraturi ce conțin n-alcani cu catena mare, 1-hexadecan și alcool acetic, dar nu și substraturi precum glucoza, glicerolul sau acidul palmitic. Proteina are masa moleculară de 14.000 Da și conține mulți aminoacizi serină și treonină.

**f) Surfactanți produși de *Pseudomonas* PG-1** – *Pseudomonas* PG-1 este o bacterie care produce surfactanți foarte eficienți, ea utilizează diferite hidrocarburi inclusiv alcani, alchene și benzen-alchil sub forma gazoasă și lichidă.

**g) Biofloculanți produși de *Cyanobacterium phormidium* J-1** – modificările stării hidrofobe a suprafețelor celulare ale cianobacteriei *Cyanobacterium phormidium* au fost corelate cu producerea unui agent emulsifiant numit emulcian. Emulcianul parțial purificat are o greutate moleculară mai mare de 10.000 Da și conține glucide, proteine și esteri ai acizilor grași. Adăugarea emulcianului la celulele hidrofobe modifică această stare făcându-le hidrofile și permite detașarea de picăturile de hexadecan sau bilele de fenil sefaroză.

## 6. Surfactanți particulați

a) **Vezicule extracelulare produse de *Acinetobacter* sp. H01-N** – *Acinetobacter* sp. când crește pe mediu cu hexadecan acumulează vezicule extracelulare cu diametru de 20 până la 50 nm diametru cu o densitate de 1,158 g/cm<sup>3</sup>. Aceste vezicule par a avea rol în utilizarea alcanilor de către *Acinetobacter* sp. H01-N.

b) **Celule microbiene cu suprafața celulară hidrofobă foarte mare** – majoritatea microorganismelor care pot degrada hidrocarburi, multe dintre cele care nu degradează hidrocarburi, unele specii ale genului *Cyanobacteria* și multe microorganisme patogene au o puternică afinitate pentru interfețele hidrocarburi-apă și aer-apă. În aceste cazuri celulele microbiene sunt ele însele surfactanți.

### 10.10 FACTORII CARE AFECTEAZĂ PRODUCEREA BIOSURFACTANȚILOR

Deși biosurfactanții au structuri diferite, așa cum a fost evidențiat în paragraful anterior, există câteva caracteristici asemănătoare în ceea ce privește sinteza lor. De exemplu, producția biosurfactanților poate fi indusă de glucide sau alte substraturi insolubile. Acest efect descris de diferiți cercetători se referă la mulți compuși tensioactivi. Un alt fenomen este represia catabolică a sintezei biosurfactanților de către glucoză sau alți metaboliți primari. De exemplu, în cazul speciei *Arthrobacter paraffineus* nu a putut fi izolat nici un biosurfactant din mediu atunci când a fost utilizată glucoza ca sursă de carbon în locul hexadecanului. În mod similar tulpina *Pseudomonas aeruginosa* S7B1 a sintetizat o proteină activator pentru oxidarea n-alcanilor atunci când a fost cultivată pe substrat cu hidrocarburi, dar nu a sintetizat nimic pe mediu cu glucoză, glicerol sau acid palmitic. *Torulopsis petrophilum* nu a produs nici un glicolipid atunci când a fost crescută pe un mediu care conținea doar o sursă de carbon solubilă. Atunci când a fost utilizat glicerolul ca substrat producerea ramnolipidului de către *P. aeruginosa* a fost redusă prin adăugarea glucozei, acetatului, succinatului sau citratului în mediu. Tipul, calitatea și cantitatea producerii biosurfactanților sunt influențate de natura sursei de carbon, de concentrația ionilor de azot, fosfor, magneziu, fier și mangan din mediu, de condițiile de cultură, cum sunt pH-ul, temperatura, agitarea și rata diluției în cultura continuă. Producerea biosurfactanților de către tulpinile de *Pseudomonas* MEOR171 și MEOR171 nu este afectată de temperatură, pH, Ca, Mg fiind îmbunătățită de salinitatea crescută. Sursa de azot poate fi o cheie importantă în reglarea sintezei biosurfactanților. Tulpina *Arthrobacter paraffineus* ATTC 19558 preferă amoniul în locul nitratului ca sursa de azot anorganică pentru producerea de biosurfactanți. De asemenea, utilizarea ureei poate mări producția de biosurfactanți. O modificare a ratei de creștere a anumitor microorganisme este adesea suficientă pentru mărirea producției biosurfactanților. În unele cazuri adăugarea cationilor multivalenți la mediul de cultură poate avea un efect benefic în producerea biosurfactanților. În afară de substanțele enumerate anterior implicate în reglarea producerii biosurfactanților, și alți compuși cum ar fi etanbutolul, penicilina, cloramfenicolul și EDTA influențează sinteza biosurfactanților. Reglarea producerii biosurfactanților prin acești compuși se face fie prin efectul lor de solubilizare a substraturilor nepolare glucidice fie prin mărirea producției pe substraturi solubile (polare). În unele cazuri sinteza biosurfactanților este reglată de pH și temperatură. De exemplu în producerea ramnolipidului de *Pseudomonas* sp., în formarea celobiozolidului de către *Ustilago maydis* și în formarea soforolipidului de către *Torulopsis bombicola*, pH-ul joacă un rol important, iar în cazul tulpinilor *Arthrobacter paraffineus* ATTC 19558, *Rhodococcus erythropolis* și *Pseudomonas* sp. DSM 2874 temperatura este importantă. În toate aceste cazuri totuși producția biosurfactanților a fost dependentă de temperatură.

## **11. TEHNICI MOLECULARE PENTRU IDENTIFICAREA RAPIDĂ A MICROORGANISMELOR DIN ECOSISTEME ACVATICE ȘI TERESTRE POLUATE**

### **11.1. PRINCIPII GENERALE DE IZOLARE ȘI CARACTERIZARE A ACIZILOR NUCLEICI**

Acizii nucleici sunt substanțe macromoleculare alcătuite din nucleotide. Nucleotidele sunt formate dintr-o bază azotată, o pentoză și un radical fosfat. Bazele azotate sunt de două tipuri: purinice – adenina și guanina, respectiv pirimidinice – timina, citozina și uracilul. În structura ADN intră dezoxiriboza, adenina, guanina, timina, citozina și radicalul fosfat. În structura ARN intră riboza, adenina, guanina, uracilul, citozina și radicalul fosfat. O bază azotată și o pentoză sunt legate prin legături  $\beta$ -N-glicozidice formând o nucleozidă. Adăugarea radicalului fosfat la nucleozidă duce la formarea unei nucleotide. Nucleotidele sunt legate între ele prin legături fosfodiesterice.

ADN este materialul genetic al majorității organismelor cu excepția viroizilor și a ribovirusurilor.

În vederea izolării și purificării acizilor nucleici trebuie parcurse mai multe etape:

1. Alegerea materialului biologic de la care se izolează acizii nucleici.
  - ✓ Virusuri – se folosesc suspensii ce conțin particule virale (obținute în urma lizei celulare a bacteriilor sensibile);
  - ✓ Bacterii – se folosesc suspensii bacteriene obținute dintr-o cultură proaspătă de 18h;
  - ✓ Drojdii – se folosesc suspensii de drojdii obținute dintr-o cultură proaspătă de 18 h;
  - ✓ Fungi filamentoși – se folosește miceliu obținut în mediu lichid de 24-48 h;
  - ✓ Organisme animale – se aleg organe, țesuturi moi, culturi de celule;
  - ✓ Plante – se alege țesut foliar tânăr, calus, embrioni.
2. Distrugerea peretelui celular.
  - ✓ Virusuri – distrugerea proteinelor capsidale se realizează cu fenol. ADN-ul și ARN-ul celulei gazdă sunt degradate prin tratament enzimatic cu DN-ază și RN-ază;
  - ✓ Bacterii – prin îngheț-dezgeț se fragmentează peretele celular și se obțin protoplaști, care fiind sensibili la presiunea osmotică se lizează;
    - tratament enzimatic cu lizozim, lizostafin; pentru bacterii Gram-pozitive concentrația de lizozim trebuie să fie mai mare (15-30 mg/ml) decât la bacteriile Gram-negative (5-15 mg/ml). Lizozimul este un complex enzimatic extras din albuș de ou activ la pH alcalin (minim pH=8). Lizozimul degradează legăturile  $\beta$ -1,4- dintre acidul N-acetilmuramic și N-acetilglucozamina componente ale peptidoglicanului. La bacteriile Gram-pozitive din genul *Staphylococcus* se utilizează lizostafin – un complex enzimatic sintetizat de anumite tulpini de stafilococi, lizozimul fiind ineficient;
    - utilizarea antibioticelor din gama  $\beta$ -lactamilor (penicilină, tetraciclină), care au rol în inhibarea formării peretelui celular;
    - ultrasonicarea – ultrasunetele provoacă ruperea pereților celulari. Ele sunt generate prin trecerea unui curent alternativ printr-un cristal de cuarț;
  - ✓ Drojdii și fungi filamentoși
    - mojarare cu nisip de cuarț sau bile de sticlă urmat de vortexare;
    - tratament enzimatic cu “suc de melc” (complex enzimatic extras din suc gastric al *Helix pomatia*), care conține chitinază, celulază, protează, amilază, etc;
    - ultrasonicarea;
  - ✓ Plante

-îngheț-dezghet și mojarare cu nisip de cuarț;

-tratament enzimatic cu celulază

3. Liza celulară – se realizează cu scopul de-a distruge membrana plasmatică și de-a elibera conținutul celular. Liza se realizează cu detergenți (membrana plasmatică fiind de natură fosfolipidică) de tipul SDS (dodecil sulfat de sodiu), CTAB (cetiltrimetil amoniu brom), sarcozil, deoxicolat de sodiu. În urma lizei celulare se eliberează și endonucleaze, care degradează materialul genetic. Astfel, pentru protejerea ADN de acțiunea endonucleazelor se adaugă în tamponul de liză EDTA (etilendiaminotetraacetat) - agent chelator ce fixează ionii de  $Mg^{2+}$ , care sunt cofactori ai DN-azelor și fără de care nu pot funcționa. pH-ul tamponului de liză trebuie să fie alcalin. Liza celulară este totală atunci când soluția se clarifică și devine vâscoasă (până atunci suspensia are un aspect lăptos).
4. Deproteinizarea se realizează fie cu solvenți organici fenol, amestec de cloroform: alcool izoamilic (24:1 v/v) sau amestec fenol: cloroform: alcool izoamilic (25:24:1 v/v), fie prin tratament enzimatic (pronază E, proteinază K), fie cu soluții saline concentrate (KCl 2,5M). Se obține o emulsie, care după centrifugare se separă astfel: faza apoasă (supernatantul) conține soluția de ADN, stratul proteic (peliculă proteică), faza organică, iar la baza tubului de centrifugă nisip de cuarț, resturi celulare.
5. Precipitarea ADN
  - alcool etilic absolut rece ( $-20^{\circ}C$ ), urmat de incubare peste noapte la congelator;
  - alcool izopropilic, urmat de incubare 10-20 minute la temperatura camerei ( $20^{\circ}C$ );
6. Recuperarea ADN – se realizează prin centrifugare 5-10 minute la 15.000 rpm și reluare într-un volum minim de tampon TE.
7. Purificarea ADN – pentru a putea fi folosit în experimentele ulterioare (transformare genetică, clivare cu enzime de restricție, PCR, RFLP) ADN trebuie să fie pur, necontaminat cu proteine și ARN. Pentru aceasta se repetă deproteinizarea (pelicula proteică va fi mai subțire), apoi se tratează cu RN-ază pentru a degrada ARN-ul contaminant.

## ***11.2. DETERMINAREA CONCENTRAȚIEI ȘI PURITĂȚII ACIZILOR NUCLEICI***

### ***11.2.1. DETERMINAREA PURITĂȚII ȘI DOZAREA ACIZILOR NUCLEICI PRIN METODE SPECTROFOTOMETRICE***

Concentrația de ADN sau ARN se poate determina pe baza absorbției radiațiilor UV la  $\lambda = 260$  nm. Astfel, s-a determinat că la o valoare a absorbanței de 1 la 260 nm concentrația unei probe de ADN dublu catenar este de 50  $\mu g/ml$  și a unei probe de ARN este de 40  $\mu g/ml$ .

Verificarea spectrofotometrică a purității ADN se face prin citirea absorbției la lungimi de undă specifice pentru ADN și pentru contaminanții posibili (polizaharide, EDTA, etanol  $\lambda = 230$  nm; fenol  $\lambda = 270$  nm; proteine  $\lambda = 280$ ) față de tampon TE.

Pentru evaluarea purității ADN trebuie să se țină cont de următoarele criterii:

- ✓ O valoare a raportului  $A_{260}/A_{280}$  între 1,8 și 2 indică o puritate mare a soluției de ADN; dacă raportul este mai mare de 2 atunci proba este contaminată cu ARN, iar dacă raportul este mai mic de 1,8 atunci proba este contaminată cu proteine;
- ✓ O valoare a raportului  $A_{260}/A_{230}$  mai mică de 2 indică o contaminare cu polizaharide;
- ✓ Raportul  $A_{260}/A_{270}$  indică gradul de contaminare cu fenol.



### **11.3. VERIFICAREA ELECTROFORETICĂ A ADN**

Electroforeza reprezintă o metodă fizico-chimică analitică și preparativă, care se bazează pe fenomenul migrării unor particule încărcate electric într-un mediu solid sub acțiunea unui câmp electric extern.

Migrarea moleculelor de acizi nucleici în gel de agaroză în câmp electric este o tehnică folosită în biologia moleculară pentru separarea și identificarea acestora. Principiul general al electroforezei acizilor nucleici constă în faptul că la pH neutru sau alcalin acizi nucleici au sarcină globală negativă și într-un câmp electric vor migra spre electrodul pozitiv (anod).

Moleculele migrează în gel cu viteze diferite, în funcție de dimensiunea lor. Moleculele de dimensiuni mici vor migra cel mai repede, iar moleculele de dimensiuni mari vor migra mai încet. Moleculele de ADN plasmidial pot avea diferite conformații moleculare: circulare închise covalent (CIC), supraîncolăcite circulare deschise (CD) și lineare. Moleculele cu astfel de conformații migrează diferit în gelul de electroforeză: cel mai rapid migrează forma CIC, apoi forma L și ultima forma CD.

Intensitatea curentului electric aplicat gelului trebuie să fie de 5 V/cm. O tensiune mai mare determină distorsionarea benzilor de ADN, acestea apărând curbate. Grosimea gelului trebuie să fie de 3-4,5 mm. Concentrația de agaroză poate varia între 0,3-2% în funcție de dimensiunea moleculelor de ADN ce urmează a fi separate. Pentru gelul de verificare a unor extracte de ADN cromosomal se folosește o concentrație de 0,7-0,9%. Colorarea moleculelor de ADN se realizează cu bromură de etidiu, care este un agent intercalant de tip fluorocrom (se intercalează între bazele azotate ale acizilor nucleici). Bromura de etidiu se prepară ca soluție stoc în apă cu concentrația de 10 mg/ml și se utilizează la o concentrație de 0,5-1 μg/ml. Bromura de etidiu se adăugată fie direct la agaroză când se prepară gelul fie gelul poate fi colorat după electroforeză. Benzile de ADN pot fi vizualizate după migrare la transiluminator UV ( $\lambda=250-310$  nm).

Avantajele electroforezei în gel de agaroză: este o metodă rapidă și simplă; prin această metodă pot fi separate și identificate fragmente de ADN cu dimensiuni variabile; ADN poate fi localizat în gelul de agaroză prin colorare cu bromură de etidiu.

Mobilitatea electroforetică a ADN în gelul de agaroză depinde de: mărimea moleculelor de ADN; concentrația agarozei; conformația moleculară a ADN; curentul aplicat.

### **11.4. TEHNOLOGIA PCR (POLIMERASE CHAIN REACTION) – REACȚIA DE POLIMERIZARE ÎN LANȚ**

Reacția de polimerizare în lanț a unui fragment de ADN a fost elaborată în 1983 de Kary Mullis. În scurt timp tehnologia PCR a devenit una dintre cele mai importante și mai puternice metode în biologia moleculară. Acumularea cunoștințelor despre modul de funcționare al ADN polimerazelor termostabile, pe de o parte și dezvoltarea automatizării aparaturii (termocicler), pe de altă parte, au permis utilizarea tehnologiei PCR pentru cercetare și diagnostic (Sreenivasaprasad și Mills, 1998).

Reacția PCR este o metodă cu foarte multe aplicații în biologia moleculară. Această reacție enzimatică permite amplificarea *in vitro* a unui anumit fragment de ADN dintr-o probă de ADN complex putând genera cantități de ordinul microgramelor din fragmentul țintă. De la apariția metodei în 1985, specificitatea, sensibilitatea și viteza acestei tehnologii au generat dezvoltarea mai multor metode cu aplicativitate în diverse arii de cercetare în domeniul biologiei pentru toate clasele de organisme. Dintre aplicațiile tehnologiei PCR pot fi amintite cele din domeniile micologiei, care includ genetica fungilor și sistematica, ecologiei și microbiologiei solului, fitopatologiei, micologiei medicale, biotehnologiei fungilor, etc. (Edel, 1998).

#### 11.4.1. PRINCIPIUL REACȚIEI PCR

Reacția PCR este o metodă de amplificare exponențială enzimatică *in vitro* a unui fragment de ADN, fiind constituită din cicluri succesive de replicare a ADN, utilizând doi primeri oligonucleotidici care flanchează regiunea țintă și care hibridizează cu cele două catene ale matriței de ADN, care conțin regiunea ce va fi amplificată. Amplificarea se bazează pe utilizarea unei enzime, ADN polimeraza termostabilă numită *Taq* polimeraza izolată de la *Thermus aquaticus*.

După ce toate componentele necesare desfășurării reacției PCR au fost amestecate, termociclerul parcurge o succesiune de etape care necesită diferite temperaturi de lucru: denaturarea ADN, legarea primerilor și amplificarea ADN.

Prima etapă presupune incubarea amestecului de reacție la o temperatură mare (90-95°C) care permite denaturarea matriței de ADN dublucatenar. Următoarea etapă constă în răcirea amestecului de reacție la o temperatură în jurul valorii de 55°C (±) pentru hibridizarea primerilor oligonucleotidici la capetele 3' ale celor două catene monocatenare ale matriței de ADN. A treia etapă necesită creșterea temperaturii la 72°C pentru inițierea sintezei noilor catene de ADN. Această secvență de trei etape corespunde unui ciclu al reacției PCR. Timpul necesar desfășurării fiecărei etape este de regulă de 1-2 minute. În ciclul al doilea, catena de ADN nou sintetizată este separată de catena matriță prin denaturare și fiecare catenă servește din nou ca matriță în următoarele etape – legarea primerilor și amplificare. De obicei se realizează 30-40 de cicluri. Teoretic după parcurgerea a  $n$  cicluri în reacția PCR se vor forma  $2^n$  molecule de ADN țintă.

Diferența față de replicarea *in vivo* constă în faptul că în reacția PCR etapa de desfacere a dublului helix de ADN matriță și atașarea primerilor nu sunt realizate enzimatic ci cu ajutorul temperaturii, singura enzimă utilizată fiind o polimerază termostabilă dependentă de ADN cu funcție de replicază.

#### 11.4.2. COMPONENTELE ȘI PARAMETRII REACȚIEI PCR

ADN matriță, primerii oligonucleotidici, ADN polimeraza și deoxiribonucleotidele trifosfat (dNTP) sunt amestecate într-un tampon ce conține ioni de  $Mg^{2+}$  ( $MgCl_2$ ). Volumul de reacție este de regulă cuprins între 25-100  $\mu$ l. Condițiile standard pentru concentrațiile diferitelor componente sunt redată în tabelul 4 și permit amplificarea majorității secvențelor țintă, dar pot fi optimizate pentru fiecare reacție PCR nouă. De exemplu, concentrația de  $MgCl_2$  necesară funcționării *Taq* polimerazei este 1,5 mM. În cazul în care nu se obțin rezultate bune după reacția PCR această concentrație poate fi optimizată: o concentrație mai mare de clorură de magneziu poate crește cantitatea produșilor de amplificare, dar totodată scade specificitatea. O concentrație mai mică de clorură de magneziu crește specificitatea, dar scade cantitatea produșilor de amplificare. În mod similar temperatura și timpul necesare pentru fiecare etapă a reacției, în special în etapa de legare a primerilor, ar trebui optimizate pentru fiecare secvență țintă și pentru fiecare pereche de primeri. Temperatura pentru legarea primerilor este în general optimizată prin tatonări empirice, creșterea făcându-se până se vor obține rezultate bune în ceea ce privește cantitatea produșilor de amplificare și specificitatea de reacție a enzimei.

#### 11.6. TEHNICA ARDRA

Identificarea unor organisme prin amplificarea unor secvențe specifice de ADN prin tehnica PCR a început să devină tot mai frecvent utilizată datorită simplității și a reproductibilității metodei. Prin tehnica ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) – analiza profilurilor electroforetice a unor secvențe de ADN ribosomal amplificate și urmat de un tratament cu enzime de restricție, pot fi diferențiate levurile la nivel de specie. Astfel, analiza profilului electroforetic a unor secvențe intergenice spațiate dintre genele ce codifică pentru ARNr 18S și ARNr 28S a permis diferențierea unor specii ale

genului *Saccharomyces*. În urma clivării acestor secvențe de ADN cu enzima de restricție Hae III s-au obținut rezultate semnificative care au permis diferențierea între speciile *S.cerevisiae* și *S.bayanus* (Guillamon colab., 1998).

Metodologia de lucru pentru identificarea și caracterizarea tulpinilor de drojdii prin tehnica ARDRA cuprinde următoarele etape:

1. izolarea ADN (tehnica descrisă anterior)
2. determinarea concentrației și purității prin măsurarea absorbției la 260 nm și 280 nm
3. amplificarea ADN cu un termocycler

## **12. METODĂ DE IDENTIFICARE RAPIDĂ A MICROORGANISMELOR - TEHNICA FISH**

Tehnica FISH – fluorescence *in situ* hybridization” permite identificarea microorganismelor din orice tip de probe din mediu (probe de apă sau sol). Tehnica presupune trei etape:

- ✓ fixarea celulelor (astfel sunt conservate moleculele de ADN sau ARN);
- ✓ permeabilizarea pentru a facilita accesul sondelor oligo- sau polinucleotidice la situsul țintă;
- ✓ hibridizarea ARN ribozomal cu sondele nucleotidice. Sondele pot fi marcate direct cu fluorocromi sau colorantul este introdus în următoarea etapă de detecție a microorganismelor.

Probele pot fi apoi analizate prin tehnici de microscopie cu epifluorescență, laser scanning (CLSM – Confocal Laser Scanning Microscopy) sau flow cytometry. Tehnica FISH clasică se bazează numai pe utilizarea ARNr (în general 16S) ca țintă pentru sondele nucleotidice, deoarece acesta este prezent în toate celulele într-un număr relativ mare de copii. Deoarece ARNr este utilizat ca marker filogenetic există numeroase baze de date legate de secvențierea acestuia necesare pentru design-ul sondelor.

Pe parcursul celor douăzeci de ani de când a fost pusă la punct această tehnică a devenit o unealtă prețioasă pentru microbiologi. Motivele popularității acestei tehnici sunt evidente:

- ✓ FISH permite detecția și identificarea celulelor microorganismelor fără a fi necesară cultivarea lor, fapt foarte important deoarece doar 0,3% dintre bacteriile din sol și mai puțin de 0,1% dintre bacteriile marine pot fi cultivate în laborator *in vitro* (Amann și colab., 1995);
- ✓ Posibilitatea detectării celulelor *in situ* permite pătrunderea în interiorul structurii comunităților microbiene și poate ajuta la identificarea lor rapidă și sigură.

Tehnica FISH clasică poate prezenta unele limite cum ar fi de exemplu o intensitate foarte mică a semnalului cauzată de permeabilitatea scăzută a membranelor celulare sau de numărul mic de ribosomi din celulă. Permeabilitatea scăzută a peretelui celular împiedică accesul sondelor în celule și ajungerea lor la situsurile țintă.

În cazul în care semnalul emis de substanțele fluorocrome cu care sunt marcate sondele de nucleotide, în urma excitării de către fasciculul laserului sau radiației ultraviolete, are o intensitate foarte mică acestea nu pot fi detectate.

Introducerea unor tratamente enzimatică sau cu diferite substanțe chimice poate mări permeabilitatea pereților celulari. Trebuie avut grijă însă ca aceste tratamente să nu distrugă celulele ducând la liza lor și deci la pierderea lor.

Numărul mic de ribosomi din celulele care cresc greu sau în celulele metabolic inactive din probe prelevate din mediu (apă, sol) este una din cauzele importante a semnalului slab detectat în tehnica FISH clasică în care ținta este ARN ribosomal.