

RAPORT ȘTIINȚIFIC

Proiect nr. 300/01.10.2007, cod CNCISIS ID_837, titlul

CERCETARI PRIVIND ACTIVITATEA UNOR COMPUSI BIOLOGICI CU APLICATII IN PROTECTIA ECOSISTEMELOR AGRICOLE

Etapa Unică 2008

Echipe de cercetare: Irina Grebenișan, Gh. Câmpeanu, Carmen Câmpeanu, Roxana Alexe, Violeta Olteanu Marin,

1. Izolarea microorganismelor din ecosisteme terestre și acvatice

Au fost prelevate zece probe de sol și apă (cinci probe de sol contaminat cu hidrocarburi provenit din zona Ploiești Prahova și cinci probe de apă din Marea Neagră) din care s-au izolat mai multe tulpini bacteriene. În figura 1 a și b sunt prezentate caracteristicile morfologice ale două din aceste bacterii, care sunt bacili Gram pozitivi de dimensiuni mari, izolați și respectiv bacili Gram negativi de dimensiuni mici, izolați.

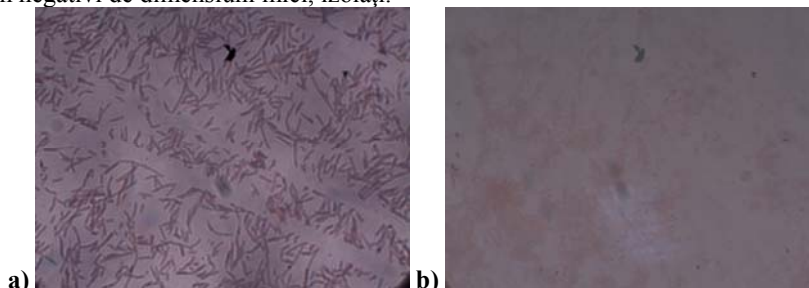


Fig. 1 a) Tulpina 1 bacil Gram + izolat din probe de sol contaminate cu hidrocarburi (imagine obținută cu microscop Micros, colorație Gram, rezoluție 1000x)
b) Tulpina 2 bacil Gram - izolat din probe de apă din Marea Neagră (imagine obținută cu microscop Micros, colorație Gram, rezoluție 1000x)

Pe mediu solid geloză tulpinile Gram pozitive formează colonii de tip R cu aspect rugos, margini neregulate, aspre, plate, de dimensiuni mari, de culoare crem, iar tulpinile Gram negative formează colonii de tip S cu aspect lucios, margini regulate, bombate, de dimensiuni mici, de culoare crem.

2. Cuantificarea microorganismelor

2.1. Determinarea încărcăturii microbiene a unei probe

Unul din scopurile determinării încărcăturii microbiene a unei probe este aprecierea nivelului activității unei populații microbiene (pentru întocmirea curbei de creștere).

Determinarea numărului total de microorganisme (celule moarte + celule vii) se realizează prin procedee optice - microscopie optică. Pentru determinarea numărului de celule vii se folosesc metode biologice, care țin cont de multiplicarea microorganismelor prezente în probă.

Pentru determinarea încărcăturii microbiene la unitatea de volum se utilizează lame speciale pentru microscop, care permit numărarea celulelor dintr-un volum determinat de lichid (suspensie de microorganisme) din proba de analizat. Cele mai utilizate lame pentru numărarea microorganismelor la microscop sunt: Thoma, Goreaeva, Burker.

Lama Thoma are o rețea cu latura de 1 mm și suprafața de 1 mm². Suprafața este subdivizată prin linii triple în 16 pătrate (mari) cu suprafața de 1/25 mm², care sunt și ele subdivizate prin linii simple în 16 pătrate (mici) cu suprafața de 1/400 mm².

Pentru numărare se examinează 5 pătrate mari situate în puncte diferite ale lamei. Din fiecare probă de analizat se fac două preparate, fiecare lamă fiind prevăzută cu câte două grile, iar rezultatul este considerat media dintre cele două determinări. Celulele situate jumătate sau mai mult de jumătate în afara pătratului examinat nu se numără.

Calcularea numărului de celule dintr-un ml de suspensie se face utilizând următoarea formulă:

$$X = (a \times c \times 4 \times 10^6) / b$$

unde:

X= numărul de celule dintr-un ml de probă

a= numărul total de celule numărate în 5 pătrate mari (media celor două citiri)

b= numărul de pătrățele în care s-a făcut numărarea (5 pătrate mari x 16 pătrățele mici = 80 pătrățele)

c= diluția lichidului de examinat

4x10⁶= coeficient de exprimare a rezultatului la 1 ml probă

Lama și lamela trebuie să fie curate, degresate (se clătesc cu apă distilată, alcool și se șterg cu un tifon curat). În funcție de proveniență și caracteristici, proba de analizat poate fi examinată ca atare sau diluată prin aplicarea tehnicii diluțiilor zecimale. Proba și diluțiile trebuie foarte bine omogenizate înainte de efectuarea preparatului pentru numărătoare, pentru ca rezultatul să exprime cât mai bine realitatea. Înainte de începerea numărătorii lama se lasă în repaus 1-2 minute pentru sedimentarea microorganismelor din preparat.

Examinarea este ușurată dacă se reduce intensitatea luminoasă sau dacă se utilizează microscopul cu fond negru.

Pentru bacterii, atunci când ele se află grupate, se ia în considerare numărul de elemente ce constituie ansamblul (gruparea) și se menționează în caietul de evidență aspectul grupării.

Rezultatele obținute prin citire nu arată dacă microorganismele din suspensie sunt vii. De aceea, determinarea numărului de microorganisme viabile se face prin alte metode. La drojdii se poate realiza o colorare a celulelor din preparat cu o soluție vitală de albastru de metilen, care va produce colorarea doar a celulelor moarte în albastru. Celulele vii metabolizează colorantul, de aceea celulele vii vor apărea necolorate sau foarte slab colorate.

În cazul în care se analizează germeni mobili, se utilizează apă formolizată (10%), care asigură imobilizarea lor, ușurând astfel numărarea lor corectă.

2.2. Determinarea încărcăturii de germeni viabili dintr-o probă prin însămânțarea pe medii de cultură solide

Această tehnică se bazează pe faptul că fiecare celulă viabilă determină formarea unei colonii atunci când suspensia din materialul de analizat este etalată pe suprafața unui mediu solid specific. Celulele care determină formarea de colonii se numesc **unități formatoare de colonii (U.F.C.)** și numărul lor este aproximativ egal cu numărul de celule microbiene din produs.

Calculul numărului de unități formatoare de colonii (U.F.C.) - pentru aflarea numărului de germeni viabili existenți în materialul de examinat se utilizează formula de calcul:

$$\text{UFC /ml} = \text{numărul de colonii} \times \text{inversul diluției} \times 10$$

3. Tehnici de evidențiere, identificare și caracterizare a microorganismelor producătoare de biosurfactanți

3.1. Sisteme de identificare a microorganismelor

3.1.1. Sistemul BIOLOG – MicroLog pentru identificarea microorganismelor

Microplăcile Biolog GP2 (tabelul 1) și GN2 (tabelul 2) sunt destinate identificării și caracterizării unui număr mare de bacterii aerobe Gram pozitive și respectiv Gram negative. Microplăcile Biolog și baza de date au fost introduse în 1989, fiind un nou patent care implica reacții biochimice de oxidoreducere – redox. Acest sistem de identificare se bazează pe reducerea tetrazoliului ca urmare a reacțiilor chimice metabolice și nu pe identificarea unor compuși secundari de metabolism (de exemplu producerea de acizi). Cu ajutorul microplăcilor Biolog GP2 pot fi identificate toate tipurile de microorganisme Gram pozitive: coci, bacili (inclusiv bacili care sporulează). Cu ajutorul microplăcilor Biolog GN2 pot fi identificate toate tipurile de microorganisme Gram negative: fermentative, nefermentative și pretențioase. Baza de date pentru microplăcile Biolog GP2 cuprinde peste 310 specii, iar cea pentru microplăcile Biolog GN2 cuprinde peste 500 specii fiind una dintre cele mai mari baze de date disponibile în prezent.

Cu ajutorul microplăcilor Biolog GP2 se pot realiza 95 de teste biochimice simultan, obținându-se astfel un profil caracteristic numit **amprentă metabolică**. Profilul metabolic este comparat și identificat cu ajutorul softului bazei de date Microlog™. Microplăcile Biolog GP2 sunt destinate unei game mai mari de utilizatori, inclusiv laboratoarelor de mediu, laboratoarelor de patologia plantelor (fitopatologie) și animalelor.

Procesul de identificare a microorganismelor cu ajutorul sistemului Biolog GP2 și Biolog GN2 este superior altor metode de identificare deoarece:

- sistemul Microlog se bazează pe un număr mai mare de teste biochimice, putându-se obține un număr de 4×10^{28} profiluri posibile de la o singură microplacă;
- sistemul MicroLog cuprinde un număr mai mare de specii;
- celelalte metode de identificare mai vechi au fost dezvoltate pentru a detecta microorganisme patogene de interes medical, neputând să identifice în mod adecvat și alte microorganisme Gram pozitive importante precum specii de *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* și *Streptococcus* sau Gram negative precum specii de *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bordetella*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Vibrio* și *Yersinia*.

Modul de lucru

1. O cultură pură microbiană Gram pozitivă se cultivă pe o placă Petri ce conține mediu universal de creștere BUG (Biolog Universal Growth). Pentru speciile de *Bacillus* mediul se suplimentează cu 0,25% maltoză; O cultură pură microbiană Gram negativă se cultivă pe o placă Petri ce conține mediu universal de creștere BUG (Biolog Universal Growth) suplimentat cu 5% Sheep Blood
2. Celulele bacteriene se raclează de pe suprafața mediului de cultură solid și se suspendă în fluidul de inoculare GN/GP până se obține o anumită densitate specifică, care se apreciază cu ajutorul turbidimetrului și a etaloanelor stas;
3. În fiecare godeu al microplăcii Biolog GP2 sau GN2 se pipetează câte 150 μl de suspensie bacteriană;
4. Microplăcile Biolog GP2 sau GN2 se incubează la 30°C sau 35°C, în funcție de natura microorganismului, pentru 4 până la 24 ore;

5. Microplăcile Biolog GP2 sau GN2 se citesc fie vizual, fie cu ajutorul Biolog MicroStation™ sau Omnilog™ și se compară cu baza de date pentru Gram pozitive sau Gram negative, obținându-se astfel pe baza profilului fiziologic identificarea microorganismului studiat.

4. Sistem de identificare pentru bacili Gram negativi non-enterici nepretențioși cu galeriile API 20 NE

API 20 NE este un sistem standardizat pentru identificarea bacililor Gram negativi nepretențioși non-enterobacterii (de ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.), care utilizează 8 teste convenționale și 12 teste de asimilație miniaturizate precum și o bază de date. Organismele pretențioase, care necesită condiții speciale de creștere și testare (de ex. *Brucella* și *Francisella*) nu sunt cuprinse în baza de date API 20 NE. Pentru excluderea sau confirmarea prezenței lor sunt necesare metode alternative.

Principiu

Galeria API 20 NE este constituită din 20 microtuburi care conțin diverse substraturi sub formă deshidratată. Testele convenționale se inoculează cu o suspensie salină bacteriană, realizată din colonia studiată, pentru reconstituirea mediului. Reacțiile produse în timpul perioadei de incubare se traduc prin viraje de culoare spontane sau obținute prin adăugarea de reactivi suplimentari. Testele de asimilație se inoculează cu un mediu minimal iar bacteriile cresc dacă sunt capabile să utilizeze substratul respectiv.

Citirea acestor reacții se face cu ajutorul tabelului de citire, iar identificarea este obținută cu ajutorul catalogului de interpretare (Analytical Profile Index) sau a programului soft dedicat identificării cu truse API (APILAB PLUS).

Modul de lucru

1. Pregătirea galeriei

- ✓ Pregătiți o cutie de incubare (reuniți tăvița și capacul) și repartizați aproximativ 5 ml apă distilată sau demineralizată în godeurile tăviței pentru crearea unei atmosfere umede (se poate folosi orice fel de apă fără aditivi chimici care pot duce la eliberarea de gaze, cum ar fi Cl₂, CO₂, etc.);
- ✓ Inscribeți referința tulpinii de studiat pe marginea laterală a cutiei;
- ✓ Desfaceți ambalajul galeriei;
- ✓ Puneți galeria în tăviță.

2. Prepararea inoculului

- ✓ Deschideți o fiolă de mediu NaCl 0.85% (2 ml), în modul indicat în paragraful „Precauții”, sau utilizați un tub ce conține 2 ml ser fiziologic 0.85% steril fără aditiv;
- ✓ Prelevați cu o pipetă Pasteur sau cu o psipeta 1-4 colonii bine individualizate cu morfologie identică izolate de pe mediul gelozat. Se recomandă folosirea unor culturi tinere (18-24 ore);
- ✓ Realizați o suspensie bacteriană cu turbiditatea echivalentă cu 0.5 McFarland omogenizând bine bacteriile în mediu. Această suspensie trebuie folosită imediat după preparare.

Pentru buna funcționare a testelor este foarte important să fie ajustată densitatea inoculului exact la 0.5 McFarland, altfel testele API 20 NE nu pot fi corect realizate. O turbiditate mai mică poate conduce la rezultate fals negative. Nu atingeți cupulele în timpul manipulării galeriei și nu expuneți perioade mari de timp galeria în aer după incubare.

3. Inocularea galeriei

- ✓ Umpleți tuburile (nu și cupulele) testelor NO₃ până la PNPG din galerie cu suspensia bacteriană utilizând psipeta pentru prelevare. Pentru evitarea formării bulelor de aer la baza tuburilor, țineți ârful pipetei în partea superioară a cupulei inclinând ușor spre înainte cutia de incubare.
- ✓ Deschideți fiolele cu mediu API AUX și transferați în el cu o psipeta aproximativ 200μl (6-8 picături) din suspensia salină rămasă. Omogenizați cu psipeta evitând formarea bulelor de aer;
- ✓ Umpleți tuburile și cupulele testelor IGLUI până la IPACI cu suspensie în așa fel încât să obțineți o suprafață orizontală sau ușor convexă, dar niciodată concavă. Cupulele incomplet umplute sau foarte pline pot conduce la rezultate incorecte;
- ✓ Creați anaerobioza în testele GLU, ADH, URE, umplând cupulele respective cu ulei de parafină până se formează un menisc convex;
- ✓ Inchideți cutia de incubare și incubați la 29±2°C timp de 24 ore (±2 ore).

4. Citirea și interpretarea

- ✓ După incubare realizați citirea galeriei cu ajutorul tabelului de citire din acest insert tehnic;
- ✓ Notați pe fișa pentru rezultate toate reacțiile spontane (GLU, ADH, URE, ESC, GEL și PNPG);
- ✓ Citirea testelor NO₃ și TRP trebuie realizată protejând testele de asimilație împotriva contaminării cu aer. Pentru aceasta acoperiți testele de asimilație cu capacul cutiei de incubare în timpul citirii testelor NO₃ și TRP;
- ✓ **Test NO₃:**
 - Adăugați o picătură de reactiv NIT 1 și NIT 2 în cupula NO₃.
 - După 5 minute, dacă reacția este pozitivă, apare o culoare roșie care va fi notată pe fișa pentru rezultate.
 - O reacție negativă se poate datora producției de azot (eventual semnalată prin prezența de microbule); adăugați 2-3 mg de reactiv Zn în cupula NO₃.
 - După 5 min., dacă godeul rămâne incolor indică o reacție pozitivă și se notează pe fișa de rezultate. Dacă devine roz-roșu, reacția este negativă, nitrații încă prezenți în tub au fost reduși la nitriți de către Zinc.

Reacția folosită pentru identificarea bacteriilor este reducerea nitraților: este pozitivă dacă una sau alta din cele două reacții precedente (producerea de NO₂ sau N₂) este pozitivă. Producerea de N₂ poate totuși să fie folosită singură ca test adițional fiind trecută în catalogul de interpretare.

✓ **Test TRP:**

Adăugați o picătură de reactiv JAMES. Reacția are loc imediat: culoarea roz care apare în întreaga cupulă indică o reacție pozitivă care va fi notată pe fișa pentru rezultate.

✓ **Teste de asimilație:**

Observați creșterea bacteriană. O cupulă opacă indică o reacție pozitivă. Ocazional, în cupulă creșterea bacteriană poate să fie slabă. În acest caz, rezultatul va fi notat ca +- sau +- prin comparație cu intensitatea obținută în cazul altor teste din galerie. După realizarea tuturor acestor citiri, identificarea este posibilă și va fi făcută în modul indicat în paragraful „Interpretare”. Totuși în cazurile următoare, galeria trebuie să fie reincubată:

✓ dacă în catalogul de identificare nu poate fi găsit codul numeric respectiv;

✓ dacă următorul mesaj este trecut în cazul codului numeric găsit: Identificare nevalidată înainte de 48 ore de incubare

Eliminați reactivii NIT 1, NIT 2 și JAMES prin aspirare, acoperiți imediat testele NO₃ și TRP cu ulei de parafină până la formarea unui menisc convex, incubați suplimentar 24 ore (la 29±2 °C) și citiți toate testele din nou cu excepția primelor 3 teste NO₃, TRP, GLU care trebuie să fie citite numai la 24 ore.

Interpretarea

Identificarea se poate realiza cu ajutorul profilului numeric.

✓ Determinarea profilului numeric: pe fișa de rezultate testele sunt separate în grupe de trei și o valoare 1, 2 sau 4 este indicată pentru fiecare test. adunând în interiorul fiecărei grupe de câte 3 teste numerele corespunzătoare reacțiilor pozitive, se obțin 7 cifre pentru cele 20 de teste ale galeriei API 20 NE. Reacția oxidazei, care constituie al 21-lea test, are valoarea 4 când este pozitivă;

✓ Identificarea prin intermediul bazei de date (v6.0): cu ajutorul catalogului de interpretare: după obținerea profilului numeric, în catalog se găsesc informațiile corespunzătoare acestuia. Cu ajutorul softului de identificare APILAB Plus, prin introducerea manuală a codului numeric (alcătuit din 7 cifre) rezultat la citire.

5. Tehnica FISH - metodă de identificare rapidă a microorganismelor

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 detecției 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 ultraviolet, are o intensitate foarte mică acestea nu pot fi detectate.

Introducerea unor pretratamente enzimatic 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.

5.1. Metode de fixare pentru procariote

Fixarea celulelor este necesară deoarece permeabilizează peretele celular pentru probele de oligo sau polinucleotide. În plus, ajută la “conservarea” celulei prin denaturarea proteinelor și enzimelor și previne denaturarea ARN-ului sau ADN-ului țintă. În protocolul standard pentru fixare se utilizează o soluție de paraformaldehidă 4% (PFA). Pentru

bacterii Gram pozitive și alte organisme cum sunt eucariotele (protozoare, funghi) sunt necesari alți fixatori și /sau tratamente suplimentare pre /postfixare.

Dacă se cunosc proprietățile Gram ale celulelor sau probelor din mediu, atunci se alege protocolul de fixare corespunzător (I sau II). Trebuie menționat faptul că unele bacterii Gram negative pot fi fixate utilizând protocolul pentru bacterii Gram pozitive sau unele bacterii Gram pozitive pot fi fixate utilizând protocolul pentru bacterii Gram negative. Unele bacterii Gram negative se pot “dizolva” când sunt fixate utilizând protocolul II (pentru bacterii Gram pozitive), iar unele bacterii Gram pozitive nu pot fi fixate cu protocolul I, ele având nevoie de un tratament relativ complicat, ca de exemplu după protocolul II să se realizeze diferite tratamente enzimaticice.

Dacă nu se cunosc proprietățile Gram ale biomasei, cum este cazul probelor din mediu, atunci ar trebui, să se realizeze cel puțin două metode standard de fixare diferite. Atunci când se investighează habitate noi se recomandă optimizarea metodelor de fixare în funcție de probele de analizat.

În cazul în care concentrația probei este scăzută trebuie urmată una dintre metode:

- fie proba este concentrată prin centrifugare în tuburi Eppendorf de 2 ml sau tuburi Falcon de 50 ml (în funcție de volumul probei) până ce sedimentul devine vizibil;
- fie proba este concentrată prin filtrarea printr-un filtru de membrană de 2 μm, care se introduce într-un volum de tampon PBS, se adaugă 3 volume de fixativ PFA, apoi se procedează cum s-a menționat anterior. Etapele de spălare prin centrifugare nu sunt necesare, ci doar transferarea filtrului de la o soluție la alta.

Dacă biomasa este aderentă la material nebiologic cu capacități autofluorescente puternice (de exemplu nisip sau particule de sol), atunci biomasa trebuie separată de materialul nebiologic prin centrifugare. În acest scop au fost dezvoltate mai multe protocoale diferite în funcție de calitatea solului (Caracciolo și colab., 2005). Analiza *in situ* a comunităților microbiene în probe complexe cu o mare încărcătură particulată (Hahn și colab., 1992). Detectarea microorganismelor din sol după hibridizarea *in situ* cu ARNr țină, cu oligonucleotide marcate fluorescent (Mc Donald și colab., 1986). Probe cu microbiotă din sol – dispersia solului prin schimb ionic și extracția microorganismelor specifice din suspensie (Smith și colab., 1994).

5.1.1. Metoda de fixare I pentru bacterii Gram negative

Reactivi

- soluție fosfat tamponat salin 1x (PBS), pH= 7,2

- NaCl 130 mM

- tampon fosfat de sodiu 10 mM

- soluție fosfat tamponat salin 3x (PBS), pH= 7,2

- NaCl 390 mM

- tampon fosfat de sodiu 30 mM

- NaOH 2M

- soluție paraformaldehidă 4 % (PFA) (high grade – Sigma păstrată la frigider, la întuneric, nu mai mult de doi ani). În timpul preparării utilizați mănuși, purtați mască și lucrați la hotă!

Prepararea soluției PBS stoc (fosfat tamponat salin):

A) Na_2HPO_4 200 mM = 35,6 g/l (se face 1 l)

B) NaH_2PO_4 200 mM = 27,6 g/l (se fac 250 ml)

Se ajustează pH-ul la 7,2 - 7,4 al soluției A cu soluția B

PBS 1x:

NaCl 130 mM = 7,6 g/l

Na_xPO_4 10 mM (50 ml/l)

H_2O dist. până la 1000 ml

PBS 3x:

NaCl 390 mM = 22,8 g/l

Na_xPO_4 30 mM = 150 ml/l

H_2O dist. până la 1000 ml

Modul de preparare

1. Se încălzesc 65 ml apă bidistilată la 60 °C;
2. Se adaugă 4 g PFA (nu se utilizează sau nu se diluează soluții comercializate gata preparate);
3. Se adaugă o picătură de soluție NaOH 2M și se amestecă rapid până ce soluția este aproape clarificată (ar trebui să dureze 1-2 minute), dacă soluția nu s-a clarificat se adaugă una sau două picături;
4. Se îndepărtează de sursa de căldură și se adaugă 33 ml PBS 3x. Se verifică dacă pH-ul este neutru;
5. Soluția se filtrează printr-un filtru de 0,2 μm;
6. Soluția se răcește rapid la 4°C dacă se utilizează imediat pentru fixare, dacă nu se răcesc 5-10 ml (în funcție de necesități) și se păstrează la -20°C înainte de utilizare. Nu este recomandată dezghețarea și reînghețarea PFA.

Modul de lucru

1. Se adaugă 3 volume fixativ PFA la 1 volum de probă și se incubează 1 oră până la 3 ore la 4°C (pe gheață) pentru fixare. Dacă este necesar probele pot fi incubate pentru fixare mai mult de 12 ore (peste noapte). Pentru a putea fi comparate diferite probe trebuie să fie fixate aceeași perioadă de timp;
2. Se sedimentează proba prin centrifugare aproximativ 1-2 min la 5000 rpm și se îndepărtează fixativul din supernatant;
3. Se spală celulele cu tampon PBS 1x, apoi se resuspendă într-un volum de tampon PBS 1x;

4. Dacă este necesar se repetă etapele 2 și 3. Reziduurile de PFA pot produce particule autofluorescente, deci este important să fie îndepărtată toată soluția fixatoare;
5. Se adaugă un volum (față de volumul de soluție utilizat pentru resuspendare) de alcool etilic 100% răcit pe gheață (păstrat la congelator) și se amestecă (concentrația finală a etanolului ar trebui să fie 50%);
6. Proba se păstrează la congelator -20°C înainte de utilizare.

5.1.2. Metoda de fixare II pentru bacterii Gram pozitive

5.1.2.1. Fixarea celulelor cu formaldehidă/ acid acetic

1. Biomasa celulară se centrifughează 5-10 minute la 5000 rpm (dacă se utilizează o cultură pură trebuie să în faza exponențială de creștere D.O. 600 nm = 0,4 - 0,8);
2. Sedimentul celular se resuspendă în 1-2 ml formaldehidă 20%/ acid acetic 50%;
3. Se incubează la temperatura camerei timp de 15 minute;
4. Se centrifughează 10 minute la 5000 rpm;
5. Se spală cu 5 ml tampon PBS și se recentrifughează;
6. Sedimentul se resuspendă în 1 ml tampon PBS;
7. Se adaugă 1 ml etanol absolut, apoi proba se păstrează la -20°C (nu la -80°C) înainte de utilizare.

5.2. Metodă generală pentru oligonucleotide FISH pentru procariote

Odată ce celulele au fost fixate pot fi utilizate pentru tehnica FISH. Procedura se derulează după un protocol care poate fi sumarizat astfel: proba se pipetează pe o lamă de microscop simplă sau acoperită cu teflon și se lasă să se usuce. Celulele se deshidratează într-o serie de soluții de etanol cu diferite concentrații. Se prepară soluția pentru hibridizare ce conține sondele de acizi nucleici și se aplică peste celulele de pe lamă. Se hibridizează la temperatură (de obicei la 46°C pentru 90 minute). Se spală lama pentru a îndepărta sondele nehibridizate (la 48°C pentru 10-20 minute). Probele se examinează la microscop imediat sau se păstrează la frigider la întuneric până pot fi examinate.

Modul de lucru

1. Se pun 2-15 μl celule fixate din probă în godeurile lamei speciale de microscop acoperită cu teflon și se lasă să se usuce 20 minute la 46°C;
2. Între timp se prepară tamponul de hibridizare și se păstrează la temperatura camerei;
3. Probele se deshidratează (prin imersarea lamei de microscop) într-o serie de soluții de etanol 50%, 80% și 100% câte trei minute în fiecare soluție;
4. Se prepară sondele oligonucleotidice (se diluează la o concentrație de lucru de 30 ng/ μl pentru sondele marcate cu coloranții fluorescenți Cy3 și Cy5 sau 50 ng/ μl pentru sondele marcate cu Fluos). După preparare trebuie protejate de lumină și se mențin pe gheață.
5. Se pipetează 8-10 μl din tamponul de hibridizare în godeurile lamei de microscop ce conține probele (fără a zgâria suprafața de teflon);
6. Se adaugă 1 μl din fiecare sondă (fără a zgâria suprafața de teflon);
7. Se pregătește tubul Falcon de 50 ml pentru hibridizare prin introducerea unei bucăți de hârtie absorbantă și adăugarea restului de tampon de hibridizare peste aceasta;
8. Lama de microscop cu proba deshidratată se introduce în tubul Falcon deasupra hârtiei ce a fost îmbibată cu tamponul de hibridizare, apoi tubul se introduce la incubator la 46°C timp de 1,5 ore pentru hibridizare;
9. Între timp se prepară tamponul de spălare și se incubează la 48°C (pe baie de apă sau la incubator) până se folosește;
10. Lama de microscop se spală cu tamponul de spălare (prin imersare în tubul Falcon) timp de 10-20 minute la 48°C;
11. Tamponul de spălare se îndepărtează cu apă distilată rece, apoi lama se usucă rapid (cu aer comprimat);
12. Înainte de examinarea microscopică lama se acoperă cu Citifluor sau Moviol pentru fixarea lamei. Dacă probele se vor examina mai târziu acestea trebuie protejate de lumină cu folie de aluminiu și păstrate la frigider, iar dacă perioada de păstrare este mai mare (câteva zile) probele se vor păstra la -20°C (nu se acoperă cu Citifluor).

5.2.1. Pregătirea tamponului de hibridizare

Într-un tub de 2 ml Eppendorf se prepară următorul amestec pentru hibridizarea *in situ* la 46°C:

- ✓ 360 μl NaCl 5 M;
- ✓ 40 μl Tris-HCl pH=8 1M;
- ✓ se adaugă formamidă și apă MQ (apă foarte pură) în funcție de concentrația formamidei conform tabelului următor:

Formamidă % (v/v)	Formamidă (μl)	MQ (μl)
0	0	1600
5	100	1500
10	200	1400
15	300	1300
20	400	1200
25	500	1100
30	600	1000
35	700	900

40	800	800
45	900	700
50	1000	600
60	1100	500
65	1200	400
70	1300	300

- ✓ 4 µl SDS 10% (w/v)

Tamponul de hibridizare trebuie să se utilizeze în ziua în care se prepară. Pentru fiecare experiment în care se aplică tehnica FISH se prepară tampon proaspăt.

5.2.2. Pregătirea tamponului de spălare

Într-un tub de Falcon de 50 ml se prepară următorul amestec pentru spălarea probelor la 48°C după hibridizarea *in situ* la 46°C:

- ✓ 1 ml Tris-HCl 1M pH=8;
- ✓ se adaugă NaCl 5 M și EDTA 0,5 M pH=8 în funcție de concentrația formamidei conform tabelului următor:

Formamidă % (v/v) În tamponul de hibridizare	NaCl (mol/l)	NaCl (µl) De la concentrație de 20% formamidă se adaugă 500µl EDTA 0,5M
0	0,900	9000
5	0,636	6300
10	0,450	4500
15	0,318	3180
20	0,225	2150
25	0,159	1490
30	0,112	1020
35	0,080	700
40	0,056	460
45	0,040	300
50	0,028	180
55	0,020	100
60	0,080	40
70	0,000	0 NaCl, 350 µl EDTA

- ✓ 50 µl SDS 10% (w/v);
- ✓ înainte de utilizare tamponul se încălzește la 48°C.

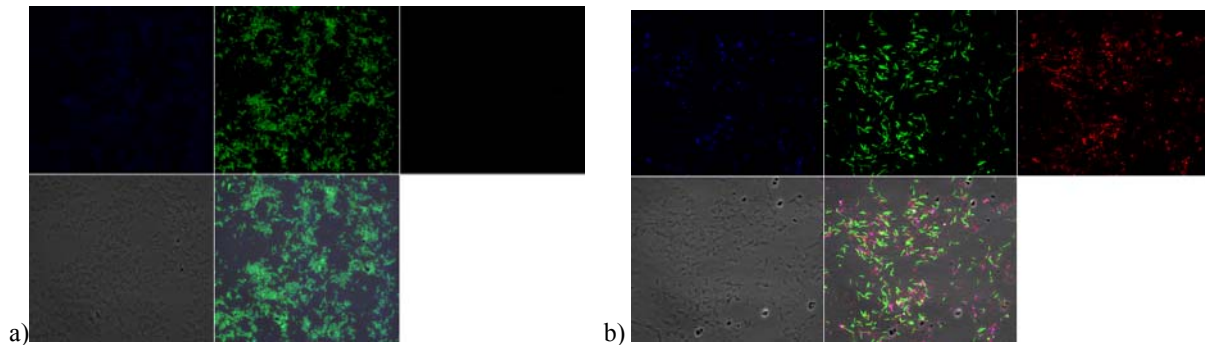


Fig. 2 Examinarea microscopică cu epifluorescență
a tulpinilor bacteriene marcate cu EUB 1 Fluos, EUB2 Cy5, EUB 3 Cy3: a) *Pseudomonas*; b) *Bacillus*

Bibliografie selectivă

1. BENSON, H.J., 1990, Microbiological applications – A laboratory manual in general microbiology, Wm. C. Brown Publishers;
2. COLLINS, C.H., LYNE, P.M., GRANGE, J.M., FALKINHAM, J.O., 2004, Microbiological methods, Arnold – Hodder Headline Group;
3. GREBENISAN, I., 2007, Lucrări practice de microbiologia mediului, Editura Cartea Universitară, 191 pp., ISBN 978-973-731-530-4;
4. WAGNER, M., HORN, M., DAIMS, H., 2003, Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes, Current Opinion in Microbiology, 6: 302-309.