



Microbiologia este o știință fundamentală care studiază morfologia, fiziologia și sistematica microorganismelor, originea și evoluția lor, fenomenele de ereditate și variabilitate microbiană. Etimologia cuvântului provine din limba greacă: micros = mic; bios = viață; logos = știință. **Biotehnologia** reprezintă un domeniu multidisciplinar al științei, tehnicii, tehnologiei și al producției industriale ce se bazează pe potențialul microorganismelor rezultate prin tehnici de inginerie genetică și a enzimelor microbiene, în scopul obținerii de bunuri industriale, energetice, agricole, farmaceutice, alimentare și protecția mediului. **Microbiologia produselor alimentare** are drept obiect de studiu cunoașterea naturii și activității metabolice a microorganismelor care pot contamina întregul lanț alimentar, de la materiile prime la produsele finite, în scopul prevenirii alterării lor și pierderea valorii alimentare sau a îmbolnăvirii prin consum de alimente, contaminate cu microorganisme patogene-toxicogene. **Microbiologia industrială** (tehnică) reprezintă știința de investigare și control al fermentațiilor, respectiv de folosire a microorganismelor în calitate de reactivi, în scopul obținerii industriale a unor produse cu valoare economică. Prin dezvoltarea microbiologiei industriale, cu ajutorul microorganismelor se obțin avantajos aproximativ 200 de produse, printre care: alcoolul etilic și butanolul, acetona, acidul citric, acidul lactic, aminoacizi, enzime, proteine, vitamine, insecticide biologice, produse de biosinteză ce se obțin pe plan mondial în cantități mari (milioane tone per an) sau vaccinuri, vitamine și **enzime** purificate, hormoni de creștere, interferonul, antibiotice, în cantități mici.

Microorganismele sunt sisteme cu organizare complexă, monocelulare sau pluricelulare, cu metabolism propriu și continuitate genetică, cu o infinită diversitate a caracterelor morfologice și fiziologice. În sensul acestei definiții din grupul microorganismelor fac parte: fungii (Levuri – levuri și mucegaiuri – fungi filamentoși), bacterii, alge microscopice, protozoare etc. În contrast cu dimensiunile atât de mici ale microorganismelor, rolul lor în natură este imens. Implicate direct în uriașele transformări ale materiei organice nevii, prin procese de putrefacție-putrezire, fermentații etc., microorganismele asigură în natură un circuit al principalelor elemente universale ce intră în structura organismelor vii și au rol vital în menținerea ecosistemelor, deoarece fără activitatea lor „pământul s-ar transforma într-un uriaș cimitir”.

În procesele microbiologice industriale microorganismele sunt utilizate pentru următoarele scopuri:

- multiplicarea celulelor în scopul obținerii de culturi starter sau biomasă;

- supersinteza intra/extracelulară a metaboliților primari, metaboliților secundari, poliglucide capsulare și a enzimelor microbiene cu importanță practică deosebită;

- procese de bioconversie (biotransformarea substraturilor specifice) cu aplicații industriale diverse și depoluarea mediului ambiant.

Utilizarea microorganismelor în bioprocesele industriale este avantajoasă datorită proprietăților lor biologice particulare și anume:

- viteza deosebit de mare a reacțiilor metabolice specifice microorganismelor face ca procesele de biosinteză să aibă loc extrem de rapid comparativ cu procesele similare la plante sau animale;

- se dezvoltă rapid pe diverse medii producând degradări, modificări și substituiri ale componentelor diferitelor substraturi pe care se dezvoltă și realizează cu ușurință transformări a căror realizare prin procedee chimice ar necesita un număr mare de operații laborioase și o tehnicitate ridicată;

- datorită capacității de adaptare la medii cu compoziții chimice foarte diferite, microorganismele pot utiliza o gamă extinsă de materii prime, uneori lipsite de valoare economică, ceea ce permite utilizarea unor substraturi ieftine pentru obținerea pe cale biologică a unei game largi de produse utile;

- posibilitatea creșterii randamentului de biosinteză prin metode culturale sau manipulări genetice.

Enzimele numite și fermenți, sunt substanțe naturale produse doar de către celulele vii. Ele intervin în numeroase reacții biochimice, îndeplinind rolul de biocatalizatori. Activitatea enzimatică este una dintre însușirile esențiale ale materiei vii. Enzimele proprii țesuturilor vegetale și animale sunt esențiale în transformările pe care materiile prime folosite în industria alimentară le parcurg până la produsul finit (ex: maturarea fructelor și legumelor, germinarea semințelor folosite ca materii prime în industria panificației sau a berii, maturarea brânzeturilor și a preparatelor din carne, maturarea vinurilor și a băuturilor distilate aromate).

Enzimele pot avea și un rol deteriorativ cu implicații în modificarea caracterelor senzoriale și implicit cu pierderea valorii nutritive și tehnologice a materiilor prime agroalimentare.

Materiile prime agroalimentare sunt produse biologice și implicit conservarea lor până la procesare sau până la consum implică controlul și monitorizarea riguroasă a activității enzimelor proprii țesuturilor vegetale și animale, sau a activității enzimelor elaborate de microflora specifică. În ultima perioadă, rolul biotehnologiilor a fost foarte bine conturat de tendințe moderne aplicate sub **formă de preparate enzimatic mixte ca adaosuri exogene în industria brânzeturilor, preparatelor din carne, etc.**

PREPARAREA ȘI STERILIZAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

Un mediu de cultură reprezintă un substrat nutritiv complex, steril, care trebuie să asigure microorganismelor cantitatea necesară de apă, sursa de carbon, de azot, săruri minerale, factori de creștere, deci care să le furnizeze substanțele și energia necesare în procesele de creștere, reproducere și întreținerea funcțiilor vitale.

Mediul de cultură trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să corespundă din punct de vedere nutritiv,
- să aibă o concentrație a substanțelor dizolvate care să nu influențeze negativ schimburile osmotice ale celulei
- să nu conțină substanțe toxice,
- să aibă un anumit pH
- să fie steril (lipsit de microorganisme vii), astfel încât să se dezvolte numai celulele introduse prin inocul.

Mediile de cultură se folosesc în practica de laborator sau în practica industrială și sunt foarte diferențiate în funcție de scopul urmărit. În tehnica de laborator mediile se folosesc pentru izolarea din mediul natural a diferitelor microorganisme, pentru obținerea de culturi pure, pentru întreținerea culturilor selecționate. În scopuri industriale, mediile de cultură sunt utilizate pentru obținere de biomasă sau a unor compuși de natură microbiană.

După scopul utilizării lor, mediile de cultură se împart în:

- medii de cultura de laborator
 - medii de cultură **simple (generale)** care asigură dezvoltarea unui mare număr de specii
 - medii de cultura **complexe** care sunt utilizate la izolari de microorganisme, pentru cresterea si pastrarea lor
 - medii de cultură **speciale**:
 - **selective** care permit dezvoltarea unui număr restrâns de microorganisme

- **de diferențiere** care permit separarea speciilor în funcție de anumite caractere biochimice
- **de îmbogățire** destinate separării și cultivării unor microorganisme pretențioase din punct de vedere nutritiv sau care se află în număr redus
- **de conservare** destinate menținerii în viață și păstrarea proprietăților fiziologice și biochimice ale microorganismelor

➤ medii de cultură **industriale**

Din punct de vedere al compoziției chimice, mediile de cultură se împart în 3 categorii:

- medii **naturale** de origine animală sau vegetală, cu o compoziție chimică nedefinită în mod exact;
- medii **sintetice**: acestea sunt soluții de substanțe chimice pure în apă distilată, cu o compoziție perfect determinată;
- medii **semi-sintetice**: sunt constituite din produse chimice bine definite, dar și din produse de origine naturală (cu compoziție cunoscută).

Constituenții principali ai mediilor de cultură sunt:

1. Extracte de carne și macerate

Aceste produse, comercializate în formă concentrată sub denumirea de “extracte de carne”, conțin în principal proteine puțin hidrolizate, glucide, săruri minerale, vitamine hidrosolubile. Compoziția lor variază în funcție de carnea utilizată pentru preparare.

2. Extracte de levură

Aceste extracte, comercializate sub formă deshidratată, sunt preparate din drojdia de bere, fiind utilizate ca sursă de aminoacizi și de vitamine hidrosolubile (vitamine din complexul B).

3. Peptone și hidrolizate

Peptonele reprezintă un amestec de compuși solubili în apă care provin în urma acțiunii enzimelor asupra materialului proteic. Pot fi: peptonă pepsică din carne, peptonă tripsică din cazeină (cu conținut

crescut în triptofan), peptonă pancreatică de cazeină, peptonă tripsică de carne, peptonă papainică de soia, peptone compuse.

Hidrolizatele sunt peptone obținute în urma acțiunii compușilor anorganici asupra proteinelor (acid clorhidric de ex.). Cel mai des întrebuițat este hidrolizatul acid de cazeină, conținând aminoacizii constitutivi ai cazeinei din lapte.

4. Agar-agarul sau geloza

Agar-agarul denumit și geloză este un extract de alge roșii (*Rhodophyceae*) din genul *Gelidium* și *Gracilaria*, recoltate în mările Japoniei sau ale Noii Zeelande. Se dizolvă în apă la o temperatură în jur de 90°C și se solidifică sub 45°C, fiind utilizat pentru solidificarea mediilor de cultură. Nu este degradat de microorganismele obișnuite. Este comercializat în forma sa inițială deshidratată, numit “agar fibre” (foarte impur), sub formă de paiete (mai puțin impur) sau sub formă de pulbere.

Numeroase firme sunt specializate în producerea și comercializarea mediilor de cultură de laborator (firma Difco, Merck, Biokar, Oxoid).

Mediile fermentative sunt medii de cultură industriale destinate producerii unor cantități mari de celule sau produși de metabolism. În compoziția acestor medii intră ca surse de carbon: melasa, produs secundar rezultat la fabricarea zahărului și care conține 45 - 55% zaharoză, diferite tipuri de făinuri, cereale boabe, zer bogat în lactoză, tărâțe etc. Dintre sursele de azot cel mai des folosite sunt: făinurile proteice de soia, sulfatul de amoniu, ureea, îngrășământul complex. Ca săruri minerale se adaugă fosfați, sulfați, cloruri etc. Pentru cultivarea microorganismelor care necesită factori de creștere, se adaugă extract de porumb (obținut prin concentrarea apelor rezultate la înmuierea porumbului, bogat în aminoacizi, vitamine, acid lactic, microelemente), extract de levură, extract din radicele de malț și germeni de grâu și porumb.

PREPARAREA MEDIILOR DE CULTURĂ PENTRU ÎNTRETINEREA BACTERIILOR, LEVURILOR ȘI MUCEGAIURILOR

Materiale utilizate:

- balanță cu precizie de 0,1 g;
- pahare Berzelius;
- sită azbest;
- agar nutritiv pulbere (un extract de alge care asigură consistența solidă, nu are proprietăți nutritive);
- mediu de cultură extract de malț - agar pulbere;
- mediu extract de cartof-dextroză-agar pulbere;
- eprubete cu dop, sterile;
- pipete de 10 ml;
- flacoane Erlenmayer;
- bec de gaz;
- autoclav.

Mod de lucru:

Conform indicațiilor de pe flacoanele conținând mediile de cultură pulverulente, se vor cântări cantitățile necesare pentru a obține câte 1 litru din fiecare tip de mediu de cultură pentru eprubete și câte 300 ml mediu pentru baloanele Erlenmayer. În cazul în care nu există medii deshidratate, procurate de la firme specializate, mediile se vor prepara prin cântărirea componentelor pentru volumul final dorit.

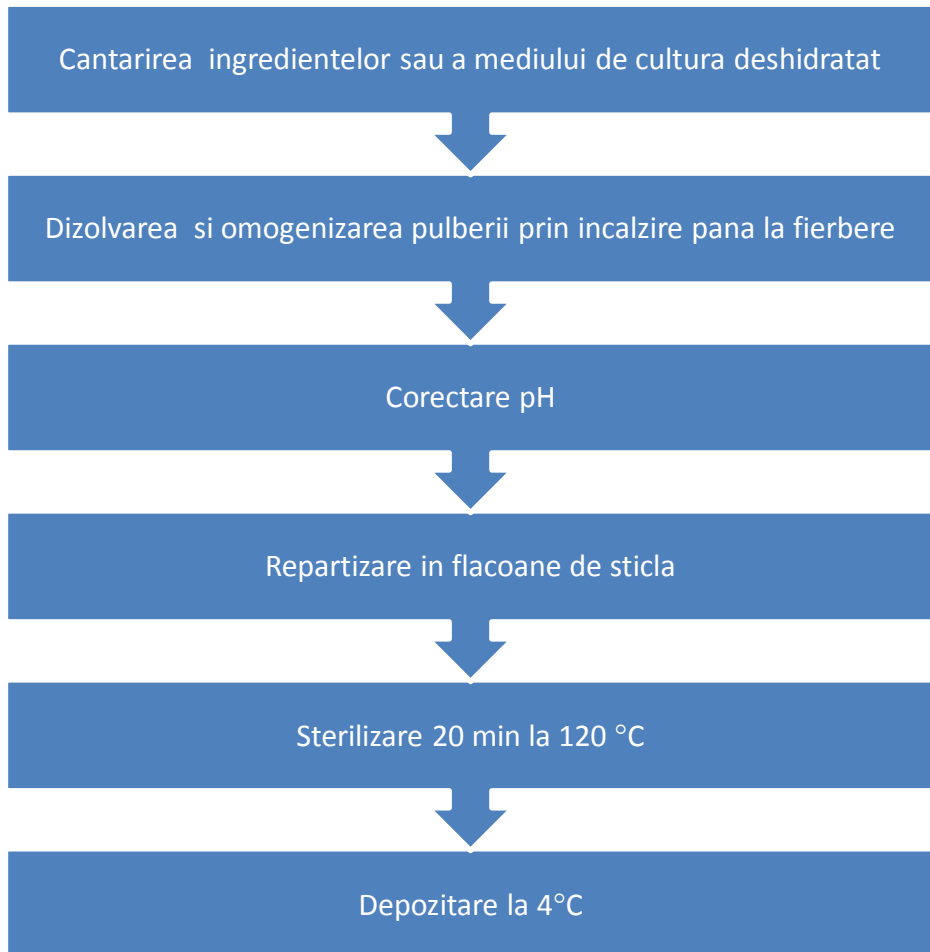
Mediul de cultură se aduce la fierbere în paharele Berzelius de 1 l, până la completa dizolvare a agarului, apoi se repartizează câte 10 ml în eprubete sterile, prevăzute cu dop de vată, care se așează în coșuri de sârmă și se acoperă cu hârtie. În mediu se determină pH-ul și, dacă este necesar, se ajustează la valoarea dorită. Mediile cu agar nu trebuie să fie aduse la un pH mai mic de 6, deoarece agarul este parțial hidrolizat în timpul sterilizării la pH acid și nu se mai solidifică la răcire. Când sunt necesare astfel de medii, pH-ul trebuie ajustat după sterilizare.

Baloanele Erlenmayer se astupă cu dop de vată învelit în tifon, se leagă la gură cu hârtie și sfoară. Coșurile și baloanele Erlenmayer se introduc în autoclav și se sterilizează.

În general, mediile de cultură trebuie să ofere o suprafață de dezvoltare suficientă pentru microorganisme. De aceea, după sterilizare tuburile cu mediu se înclină pentru ca să rămână cu o suprafață mare de creștere. Înclinarea se face prin sprijinirea eprubetelor pe o baghetă suficient de groasă, ținând seama ca mediul negelificat să nu ude dopul de vată, ci să se oprească la 2 - 3 cm de acesta. Prin răcire, vaporii ce ies din mediul cald, se condensează pe pereții mai reci ai eprubetelor și cad sub formă de picături pe mediu, adunându-se pe fundul eprubetei. Din această cauză, eprubetele cu mediul răcit nu se așează în poziție orizontală, ci verticală, în coșuri de sârmă. Acestea se acoperă apoi cu o hârtie și se leagă cu sfoară.

Pentru a nu prepara în fiecare zi medii, sau, dacă este nevoie de mai multe feluri de medii în același timp, acestea se pregătesc o dată și apoi se depozitează pentru păstrare. Sticlele cu medii se etichetează, notându-se tipul mediului și data preparării. Pentru evitarea uscării se recomandă păstrarea mediilor nutritive în frigider.

Schema de lucru:



METODE DE STERILIZARE

Microorganismele sunt raspândite pretutindeni în natură: aer, apă, sol și pe suprafața corpului viețuitoarelor, pe toate obiectele pe care le manipulăm. În cercetările de microbiologie, este necesar să se asigure sterilitatea mediului de laborator și a aparaturii cu care se lucrează. Prin steril în microbiologie se înțelege lipsa totală a oricăror microorganisme de pe suprafața și din interiorul obiectelor, dintr-un spațiu sau de pe o suprafață. Această condiție este asigurată prin operațiunea numită **sterilizare**.

Prin sterilizare se înțelege **distrugerea sau îndepărtarea tuturor microorganismelor**, atât în formă vegetativă, cât și sub formă de spori, din medii sau de pe obiectele supuse sterilizării.

Sterilizarea se poate realiza cu ajutorul agenților fizici și chimici.

A. STERILIZAREA PRIN AGENȚI FIZICI

Dintre agenții fizici cu acțiune sterilizantă cei mai importanți sunt:

1. sterilizare prin caldură uscată:

- sterilizare prin flambare;
- sterilizare prin încălzire la roșu;
- sterilizare prin aer cald.

2. sterilizare prin caldură umedă:

- sterilizare prin fierbere;
- sterilizare prin vapori de apă sub presiune;
- sterilizare prin pasteurizare;
- sterilizare prin tindalizare.

3. sterilizare cu razele ultraviolete;

4. sterilizare cu ultrasunete.

1. Sterilizarea prin caldură uscată.

Caldura uscată acționează distrugător asupra microorganismelor, producându-se coagularea proteinelor sau carbonizarea

microorganismelor. Sterilizarea prin caldura uscată poate fi realizată prin mai multe procedee:

a. Sterilizare prin flambare.

Constă în trecerea obiectului de sterilizat prin flacara unui bec de gaz sau a unei lampi cu alcool, odată sau de mai multe ori timp de câteva secunde. Prin acest procedeu se sterilizeaza pipetele Pasteur și pipetele gradate (numai suprafața exterioară) în momentul folosirii, gura baloanelor și a eprubetelor înainte și după întrebuințare.

b. Sterilizare prin încălzire la roșu.

Se sterilizează prin acest procedeu obiectele metalice folosite în tehnicile microbiologice (ansele de însamânțare, acele spatulate). Acestea se țin în flacăra până la înroșirea lor.

c. **Sterilizarea prin aer cald.**

Aerul încălzit la 160-180 °C în decurs de o oră distruge toate microorganismele. Acest mod de sterilizare se realizeaza în etuve (cuptor Pasteur, Poupinel). Etuva este o cutie metalica cu peretii dubli, separați printr-o patură de aer care se încălzește în momentul funcționării. La exterior aparatul este izolat cu placi de azbest pentru a împiedica pierderile de caldura. În partea superioară se gasește un orificiu în care se introduce un termometru. Aparatul se încălzește electric și reglarea temperaturii se face cu ajutorul unor termoreglatoare. Se sterilizează prin aer încălzit toată sticlaria de laborator: baloane, eprubete, pipete gradate, pipete Pasteur, cutii Petri, pâlnii, fiole, capsule, mojar etc.

2. **Sterilizarea prin caldura umedă.**

Caldura umedă, în comparație cu cea uscată, are o putere de penetrație mai mare, distrugând microorganismele hidratate, într-un timp mai scurt și la o temperatură mai joasă.

a. Sterilizarea prin fierbere.

Prin fierbere nu se realizează o sterilizare perfectă (completă) deoarece se distruge numai celulele vegetative, nu și spori. Prin acest

procedeu se sterilizează instrumentele metalice (pense, foarfeci, bisturie), precum și seringile. Se recomandă folosirea apei distilate. Durata fierberii este de 30 de minute. Pentru a împiedica ruginirea obiectelor sterilizate, în apă se adaugă borax. Boraxul și carbonatul de sodiu ridică punctul de fierbere al apei la 105 °C. Obiectele sterilizate prin fierbere se întrebuințează imediat.

b. Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune (autoclavarea).

Este procedeu cel mai eficace. Duce la obținerea unei sterilizări perfecte (complete). Aparatul folosit pentru acest tip de sterilizare este autoclavul. Autoclavul este un vas metalic cu pereți groși care rezistă la o presiune de cel puțin 3 atmosfere. Autoclavele mici se încălzesc direct și aburul se formează direct în interiorul vasului. Acesta este prevăzut cu un capac metalic greu cu o garnitură de cauciuc sau azbest, care se închide etanș și un manometru care indică presiunea vaporilor din interior, un robinet pentru vapori și o supapă de siguranță.

Prin autoclavare se sterilizează majoritatea mediilor de cultură, aparatele din sticlă cu garnituri de cauciuc, halatele, vata, serul fiziologic, recipientele contaminate care au servit la cultivarea sau manipularea microorganismelor. Baloanele cu medii nutritive se închid cu dopuri de vată și apoi se leagă cu hârtie pentru a evita patrunderea vaporilor prin vată, care în timpul sterilizării sunt sub presiune. Materialele de sterilizat se așază în cutii de tablă cu pereții gauriți (mediile nutritive), iar vasele mari direct pe suport.



c. Pasteurizarea.

Este o metoda incompletă de sterilizare, prin care se distrug numai celulele vegetative, nu și sporii.

- Pasteurizarea se poate face prin încălzire la temperatura de 60-65°C, timp de 30 minute (pasteurizare joasă), urmată de o răcire bruscă și menținerea materialului sterilizat la rece (4 °C).

- Când se folosește temperatura de 70-75 °C, timp de 10-20 minute se realizează o pasteurizare medie.

- Dacă lichidele sunt într-un strat subțire în contact cu suprafețe încălzite la 85-90 °C timp de câteva secunde, se realizează o pasteurizare înaltă.

Încălzirea are drept scop distrugerea celulelor vegetative, iar racirea bruscă și menținerea la rece împiedică germinarea sporilor.

Se aplică lichidelor supuse unei alterari rapide și se folosește în mod curent în industria laptelui.

d. Tindalizarea.

Este o metoda de sterilizare fracționată, care se folosește pentru substanțele care se denaturează la temperaturi ridicate. Constă în încălzirea discontinua, timp de 30-60 min., la intervale de 24 ore în trei zile consecutive. Tindalizarea se realizează la temperatura suportată de materialele respective. Astfel, mediile cu ou, precum și serul coagulat se tindalizează la 70-80°C, iar mediile cu zaharuri la 100°C.

Prin încălzirea din prima zi se distrug formele vegetative, sporii rămânând viabili. După 24 ore de păstrare a mediilor la temperatura camerei, sporii având condiții prielnice vor germina, rezultând celule vegetative. Prin aplicarea tindalizării din ziua a II-a și a III-a se vor distruge și celelalte celule vegetative.

3. Sterilizarea prin raze ultraviolete.

Razele ultraviolete (UV) distrug celulele vegetative, dar au o acțiune mai redusă asupra sporilor. Ca surse artificiale de UV se folosesc lampi cu vapori de mercur.

Se sterilizează, prin acest procedeu, aerul din laboratoarele de microbiologie, interiorul boxelor sterile, camerele de însemănțare.

4. Sterilizarea prin ultrasunete.

Ultrasunetele sunt vibrații acustice (cu o frecvență de peste 20 000 Hz) care se obțin în aparate speciale ce permit trecerea unui curent alternativ de înaltă frecvență printr-un cristal de cuarț. Vibrațiile masei cristalului, sub acțiunea impulsurilor electrice, duc la dezintegrarea rapidă a celulelor bacteriene.

B. STERILIZAREA PRIN FILTRARE

Filtrarea constă în trecerea lichidelor printr-o substanță poroasă cu pori de dimensiuni mici care rețin majoritatea microorganismelor. Virusurile trec prin porii acestor filtre. Se sterilizează prin această metodă serul sanguin și alte lichide care se denaturează la cald. De asemenea, filtrarea se mai folosește și pentru separarea exotoxinelor de corpuri microbiene din mediile de cultură.

Filtrarea trebuie considerată un fenomen complex la baza căruia stă nu numai fenomenul mecanic ci și adsorbția particulelor din lichidul filtrat de către pereții capilarelor care formează porii filtrului, în funcție de vâscozitatea, temperatura și pH-ul soluțiilor, de încărcătura electrică a particulelor și a filtrului.

Tipuri de filtre:

- Filtre Chamberland. Sunt confecționate din porțelan, având forma de bujii. Sunt notate cu L în funcție de mărimea porilor
- Filtre Berkefeld, din pământ de infuzorii (kieselgur): W, N, V.
- Filtre Seitz, din azbest: EK, EK1, EK2. EK1 - bacterii; EK2 - virusurile mari.
- Filtre de sticlă - Schott-Jena: G0 - G5. Filtrul G5 cu porii sub 1,7 micrometrii permite obținerea filtratelor sterile.
- Membrane filtrante: coloidul, celuloza, gelatina, mase plastice. Se folosesc în deosebi în virusologie.

C. STERILIZAREA PRIN AGENȚI CHIMICI

Pentru sterilizarea prin agenti chimici este folosit în special termenul de dezinfectie.

Ea are drept scop distrugerea germenilor patogeni în vederea înlăturării posibilitatilor de infectie.

Se folosesc în mod curent urmatorii agenti chimici sterilizanti, de uz curent:

- solutia de sublimat corosiv 0,1%, pentru dezinfectia meselor, mobilierului din sticla si faianta, pentru dezinfectia mai riguroasa a mâinilor;

- solutia de bicromat de potasiu 5%, pentru dezinfectia pipetelor întrebuintate;

- alcool etilic 70%, pentru dezinfectia curenta a mâinilor;

- formol 40%, în concentratie de 5%, se utilizeaza pentru dezinfectia obiectelor din sticla, faianta, metal;

- fenolul în concentratie de 5%, pentru dezinfectia diferitelor obiecte din sticla, portelan, metal;

- apa oxigenata în concentratie de 3%, pentru dezinfectia mâinilor si mucoaselor;

- solutie de hidroxid de sodiu 20%, pentru sterilizarea mobilierului si dusumelelor;

- cloramina 1%, pentru dezinfectia mâinilor, iar în concentratie de 5-6%, pentru dezinfectia meselor de laborator

- clorul pentru dezinfectia apei;

- diferiti detergenti, pentru dezinfectia sticlariei si a rufelor.

Sterilizarea prin agenti chimici este folosita în laboratoarele de microbiologie numai pentru obiectele si materialele întrebuintate. De asemenea, se mai folosesc agenti chimici sterilizanti si pentru conservarea lichidelor organice (ser sanguin, sânge, urina) si a altor materiale biologice (seruri imune si vaccinuri).

Pregătirea și sterilizarea materialului în vederea utilizării în laboratorul de microbiologie este o operație deosebit de importantă deoarece exactitatea rezultatelor precum și reușita desfășurării

proceselor microbiologice depind în mare măsură de rigurozitatea cu care se efectuează.

Principalele operații de pregătire a sticlăriei de laborator sunt:

- spălarea
- uscarea
- executarea dopurilor și ambalarea - recipientele pot fi

pregătite cu dop din vată hidrofobă pentru a nu păstra umezeala după autoclavare. Din ce în ce mai folosite sunt dopurile din celuloză comprimată (comercializate), sterilizabile până la 200°C. Pentru înlocuirea eprubetelor cu dop de vată, în scopul păstrării optime a culturilor, se pot utiliza tuburi prevăzute cu capsule care se montează prin înșurubare.

Pentru evitarea contaminării mediilor de cultură utilizate în analiza microbiologică sau în obținerea culturilor microbiologice, sticlăria de laborator trebuie ambalată și sterilizată corespunzător. Sterilizarea se efectuează la etuvă (sau pupinel), iar materialele supuse acestei operații trebuie să fie curate și împachetate în hârtie sau așezate în containere metalice închise. Sterilizarea uscată se poate aplica pentru articole din sticlă (plăci Petri, baloane, pipete, eprubete), obiecte din porțelan, instrumentar metalic, pulberi uscate etc. Aerul fiind slab conducător de căldură, sterilizatorul trebuie să uniformizeze temperatura și să asigure pătrunderea aerului fierbinte în obiectele de sterilizat. În calcularea timpului de sterilizare uscată trebuie avute în vedere următoarele etape:

- perioada de încălzire la temperatura de sterilizare, socotită în general o oră;
- perioada de menținere a temperaturii de sterilizare;
- perioada de răcire în care scăderea temperaturii trebuie realizată treptat pentru evitarea spargerii obiectelor de sticlă prin șoc termic, aprox. 2 ore.

În practică se procedează la alegerea unei temperaturi de sterilizare de 180° C și a unei durate de o oră. Din exces de prudență se practică sterilizări la temperaturi mai ridicate sau de durate mai mari. În

unele cazuri această practică este dăunătoare deoarece, de exemplu, vata ordinară - la durate și temperaturi mari de sterilizare uscată - eliberează gudroane ce pot inhiba creșterea microbiană.

Materiale utilizate:

- pipete;
- plăci Petri;
- eprubete;
- flacoane Erlenmayer;
- vată hidrofobă;
- tifon;
- hârtie ambalaj;
- etuvă.

Mod de lucru:

!!! Obiectele de sterilizat trebuie să fie curate și uscate.

Se execută dopuri de vată hidrofobă pentru eprubete, astfel încât să poată fi extrase ușor în timpul inoculării, iar densitatea materialului să asigure sterilitatea. Eprubetele se introduc în coșul de sârmă și se acoperă cu hârtie.

Pipetele se astupă la partea opusă vârfului, cu un dop subțire de vată care să rețină microorganismele ce ar putea pătrunde în pipetă pe la partea superioară. Pipetele se ambalează într-o fâșie de hârtie care se răsucește în jurul tubului de sticlă, începând de la vârf.

Plăcile Petri se ambalează în hârtie de ambalaj, în funcție de numărul necesar.

Flacoanele Erlenmayer pentru medii de cultură se astupă cu dop de vată înfășurat în tifon. Toată sticlăria se sterilizează 1 oră la 180 °C la etuvă, timp socotit din momentul atingerii temperaturii. După această perioadă etuva se oprește și se așteaptă răcirea materialului.

Baloanele, eprubetele și pipetele se închid cu dopuri de vată și apoi se împachetează în hârtie. Sticlăria astfel pregătită se introduce în etuva. În timpul sterilizării hârtia devine galbenă. Dacă se depășește 180 °C hârtia se brunifică (se carbonizează parțial), devine sfărâmică

si nu mai asigura sterilitatea obiectelor în timpul pastrarii, pâna în momentul folosirii.

Obiectele sterilizate pot fi pastrate timp de 1-2 saptamâni în dulapuri bine închise.

Mediile de cultura preparate in cadrul lucrarii I se vor steriliza în **autoclav**, la 120°C.

Inainte de sterilizare se introduce în autoclav apa distilata, în asa fel ca nivelul ei sa nu atinga platfotma pe care se aseaza materialele. Dupa introducerea obiectelor de sterilizat, autoclavul se închide cu capacul etans. Se porneste apoi autoclavul, iar sistemul de încălzire se regleaza pentru mentinerea constanta a acesteia o perioada de timp, care difera de la un material la altul.

Relația dintre presiune și temperatură în autoclav.

PRESIUNEA (atm)	TEMPERATURA (°C)	PRESIUNEA (atm)	TEMPERATURA (°C)
0,0	100,0	1,0	121,0
0,2	105,0	1,2	124,0
0,4	110,0	1,4	126,0
0,5	112,5	1,5	127,0
0,6	114,5	1,8	130,0
0,8	117,0	2,0	132,0

In mod obisnuit, autoclavarea se face la 121 °C timp de 20 de minute, care asigura o sterilizare perfecta. Dupa terminarea sterilizarii, încălzirea se întrerupe.

Informatii utile:

!!! Când se autoclaveaza un mediu lichid este necesara utilizarea unui recipient cu o capacitate de două ori cat volumul lichidului.

!!! Nu se autoclaveaza plăci Petri din material plastic. Acestea și multe alte recipiente din plastic se topesc în căldură.

!!! Slăbiți capacele la toate recipientele care conțin lichide înainte de autoclavare. Strângeți capacele după de lichidele sterilizate s-au răcit.

!!! Lăsați spații între vasele introduse în autoclavă pentru a facilita distribuția egală de energie termică.

!!! Autoclavare agar:

a. Dacă se dorește pregătirea unui mediu îmbogățit, dizolvați mai întâi toate celelalte componente în vasele utilizate, înainte de adăugarea agarului, deoarece acesta este insolubil la temperatura camerei .

b. Agarul și soluțiile de săruri nu pot fi introduse în autoclav în același recipient. deoarece se va forma un precipitat.

!!! După ce un lichid a fost autoclavat nu-l scoateți-l din autoclavă până nu s-a răcit. Fierberea cu bule indică faptul că lichidul este supraîncălzit și poate exploda dacă nu este manipulat corespunzător. Mediile lichide, care nu conțin agar, pot fi lăsate în autoclav până când sunt răcite la temperatura camerei.

!!! Mediile care conțin agar trebuie răcite până la aproximativ 55 °C înainte de a le turna în plăci (Petri) pentru a evita formarea de umiditate în exces. O baie de 55 °C H₂O este un loc convenabil pentru răcirea mediului, precum și pentru a-l stoca în timp ce este distribuit în plăci.

TEHNICI GENERALE DE IZOLARE DIN MEDII NATURALE ȘI OBȚINEREA CULTURILOR PURE

Pentru obținerea culturilor pure se aplică metode fizice, metode fizico-mecanice și metode biologice. În prima etapă de izolare, știind că densitatea celulelor în mediul natural poate fi ridicată, se fac diluări ale suspensiilor de celule în ser fiziologic steril. Tehnica de diluare folosită este tehnica diluțiilor decimale. Se folosesc eprubete cu ser fiziologic steril (0,8 % NaCl) pentru a preveni turgescența celulelor.

- **Metodele bazate pe tehnici de răspândire** au la bază principiul răspândirii celulelor prin diluare în medii lichide sau prin diseminare mecanică pe suprafața mediilor sterile.

Metoda în strii folosește drept suprafață de răspândire mediul înclinat din două trei eprubete, prin transferul de celule din mediul natural, prin realizarea succesivă de striuri. Aceste metode se folosesc și în cazul în care o cultură pură este contaminată în perioada de păstrare cu microorganisme străine și aceasta trebuie să fie salvată.

Metode scarificate

În placa Petri se repartizează un mediu de cultură adecvat (MMA/BCA) și după solidificarea mediului, cu firul ansei se recoltează celule din mediul natural și se execută trasări pe suprafața mediului, astfel încât diversele celule rămân distanțate între ele. Prin termostatare 2-3 zile, din colonia care corespunde microorganismului ce trebuie să fie izolat, se face repicare într-o eprubetă cu mediu solid înclinat și astfel se obține o cultură pură.

Metoda culturală Koch este folosită în special pentru izolarea de Levuri. Ca mediu de răspândire se folosește mustul de malț cu gelatină repartizat în trei eprubete, fluidificat și menținut la 40° C. Din mediul natural, de exemplu un must în fermentație, se recoltează o ansă care se introduce succesiv în cele trei eprubete, cu agitare, care să asigure desprinderea celulelor. După inoculare și uniformizare, conținutul fiecărei eprubete se repartizează în câte o placă Petri; prin solidificare, celulele rămân fixate în gel și prin multiplicare vor forma colonii/clone

izolate. În funcție de densitatea celulelor recoltate inițial, în placa a doua sau a treia coloniile sunt suficient de distanțate (2cm), pentru a putea face izolarea din colonia adecvată a culturii pure.

• Metode bazate pe tehnici de diluare

Din suspensia de celule din care dorim să facem izolarea se fac diluări în mediu steril și sub control microscopic se verifică dacă s-a făcut diluarea corespunzător și la o picătură de lichid se află o celulă.

Metoda Lindner este cea mai cunoscută metodă folosită la selectarea culturilor pure de Levuri în industria fermentativă. Pe o lamelă se plasează cu ajutorul unui toc cu peniță topografică steril o serie de picături. Apoi lamela se plasează cu picăturile în jos pe o lamă cu escavație. Apoi se studiază la microscop și se notează picătura care conține o singură celulă. Cu ajutorul unei hârtii de filtru sterilizată, luată cu o pensetă sterilă, se absoarbe picătura, prin absorbție va trece și celula de levură. După ce se absoarbe această picătură, hârtia care conține celula se introduce într-o eprubetă care conține must de malț steril. Celula va da naștere prin înmulțire în condiții favorabile la o biomasă care va reprezenta cultura pură.

Metoda Hansen constă în diluări decimale în mediu steril, după care se numără celulele din 1 ml diluție și se realizează însămânțarea pe mediu nutritiv solidificat pentru obținerea de colonii. Pentru izolarea culturilor de mucegaiuri se folosesc metode scarificate de antrenare a sporilor în plăci cu must de malț agar. O altă metodă care ne permite obținerea de colonii izolate de mucegaiuri este metoda inundării. În placa Petri cu must de malț agar se adaugă câțiva ml din o suspensie diluată, cu o concentrație mică de spori; după clătirea suprafeței mediului, lichidul se scurge iar unii spori, cei reținuți de suprafața mediului, conduc la colonii izolate.

Metoda lui Naumov izolează picături de MMA în care în prealabil s-au introdus un mediu restrâns de spori. În mediu încă fierbinte, după inoculare, se adaugă picături pe capacul plăcii Petri, iar după solidificare și cultivare se alege picătura de mediu solid care prezintă o singură colonie.

Metoda cu micromanipulator este o metodă mecanică. Micromanipulatorul este alcătuit dintr-un sistem de tuburi capilare cu care se poate lucra sub microscop, cu posibilitatea de a recolta prin absorbție în microcapilar unele celule izolate. Apoi celula este introdusă în mediu nutritiv adecvat.

- **Metodele biologice** au la bază principiul proprietăților diferențiate ale culturii ce urmează a se izola (proprietăți diferențiate de ale microorganismelor asociate). Ca proprietăți distincte amintim comportarea față de temperatură, pH, relația față de oxigen, rezistența la plasmoliză sau rezistența la anumite substanțe chimice sau antibiotice.

Metoda Burri este metoda clasică care constă în izolarea bacteriilor aerobe de cele anaerobe prin metode biologice. Din suspensia de microorganisme în care se află în amestec aerobi și anaerobi se face însămânțare în mediul BCA (bulion de carne cu agar) fluidificat și răcit la 45°C, turnând într-un tub de sticlă prevăzut la partea inferioară cu un dop de cauciuc. Se acoperă apoi tubul cu dop de vată și se termostatează. În zona unde mediul este în contact cu aerul se vor dezvolta bacteriile aerobe. În restul mediului vor fi fixate bacteriile anaerobe. Pentru a înțelege modul de înmulțire a microorganismelor în culturile pure este important să cunoaștem comportarea culturii într-un mediu nutritiv steril limitat cantitativ.

3.1 CONSERVAREA CULTURILOR PURE

În momentul în care au fost obținute dintr-un mediu natural, în prima etapă, culturile pure se numesc izolate. Această denumire însoțește cultura până când, pe baza studiului morfologic și fiziologic a izolatului pe mediu standard, se face identificarea pe baza criteriilor taxonomice și știm că acest izolat aparține unei specii.

Odată identificată cultura, ea poate fi comparată cu cultura standard ce caracterizează specia și sunt studiate anumite proprietăți ale tulpinii respective, în scopul evidențierii unor proprietăți valoroase. În

natură numeroase tulpini care aparțin aceleiași specii pot prezenta caractere fiziologice diferențiate. În scopul selectării tulpinilor cele mai valoroase dintre cele aparținând aceleiași specii izolate din natură, în laboratorul de microbiologie se aplică metode de screening (ecranare) specifice. Prin screening se aplică criteriile de selectare din ce în ce mai riguroase alegând tulpina cea mai bună.

După selectare, în scopul stimulării activității de metabolism în sensul dorit, se practică fie metode culturale, prin care se modifică condițiile de cultivare (prin modificarea compoziției mediului, a temperaturii, a pH-ului, a gradului de aerare, cultivare staționară, cultivare pe agitator etc). Prin metode culturale se produce o creștere însemnată a activității fiziologice a microorganismelor, aplicându-se tehnici pentru obținerea de enzime, acizi, alcooli (produse de catabolism). Stimularea activității fiziologice și de biosinteză a microorganismelor se poate realiza și prin metode de bioinginerie care constau în modificări în genomul celular (modificări genetice în structura acizilor nucleici), în transfer de gene, de plasmide, modificări structurale genetice. Aceste metode conduc la obținerea de mutanți – microorganisme care au suferit transformări genotipice asociate de obicei cu transformări fenotipice (modificări de formă).

În acest scop se folosesc agenți mutageni dintre care cei mai utilizați sunt:

- agenți mutageni fizici (radiații ultraviolete, $\lambda = 250$ nm) care pot produce transformări în structura secundară a acizilor nucleici;
- agenți mutageni chimici (β -propiolactona, β -naftolul, antibiotice).

Prin mutații se pot selecta agenți cu performanțe de biosinteză mult superioare față de celula parentală (cantitatea de penicilină obținută din mutant de *Penicillium* este mult mai mare). Pentru conservarea culturilor valoroase în practica de laborator se folosesc diferite tehnici care urmăresc prelungirea fazei staționare de creștere un timp cât mai îndelungat și se evită apariția fazei de declin care poate duce la pierderea culturii. Această prelungire se poate realiza astfel:

- prin scăderea temperaturii față de temperatura optimă (sunt încetinite procesele de metabolism) – procedeele de păstrare în domeniul de refrigerare sau păstrarea culturilor congelate.

- prin reducerea cantității de apă liberă și menținerea culturilor în stare uscată – procedee aplicate la conservarea bacteriilor sporulate și a mucegaiurilor.

- prin privare de O₂, condiție în care, după ce a avut loc dezvoltarea culturii în condiții de aerobioză, biomasa se acoperă cu un strat de ulei de parafină (vaselina) de 1 cm înălțime deasupra culturii, care asigură păstrarea culturilor ani de zile.

Cea mai modernă tehnologie de păstrare a culturilor pure este liofilizarea. Celulele vii sunt suspendate într-un lichid protector (glicerol 10% sau amestec de 3% glutamat de sodiu, 3% dextran, 6% zaharoză în proporție de 1:1:2) și se supun congelării astfel: se face congelarea lentă în fiole de sticlă până la -20°C după care urmează o congelare rapidă la -70°C, urmată de uscarea celulelor în vid până când umiditatea acestora ajunge la 5%. Apoi fiolele de sticlă se efilează și se închid ermetic. Culturile liofilizate își mențin procentul de viabilitate ridicat ani de zile. În practica de laborator, când numărul de celule este mic, se folosesc tehnici de repicare care constau în transferul celulelor din mediul epuizat pe mediu proaspăt. Culturile pure standard (cu anumite caractere) precum și culturi cu performanță în biosinteză sunt păstrate în colecții numite micoteci – întâlnite în mari laboratoare de cercetare, în laboratoare de microbiologie uzinale, în instituții de învățământ superior.

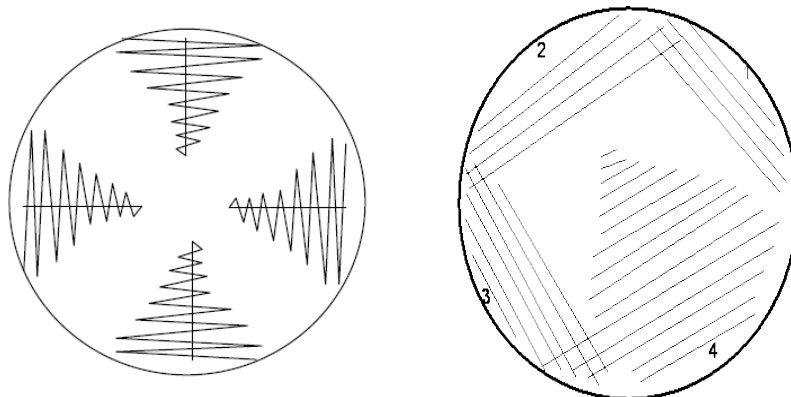
Modul de lucru

1. Se pregatesc cutiile Petri.
2. Se toarna agarul la temperatura de 50°C in cutii Petri sterile a.i. acesta sa acopere toata suprafata cutiei intr-un strat subtire

(aprox. 10-15 ml de solutie agar in fiecare cutie). Cutiile se depoziteaza cu partea care contine agarul in jos pana cand acesta se solidifica (aprox 30 minute). Nu mutati placile Petri dupa ce ati turnat mediul agarizat, ci lasati-le in hota sterila timp suficient pentru a se solidifica.

3. Se sterilizeaza ansa (aceasta se tine intre degetul mare si primele doua degete ale mainii drepte ptr dreptaci si stanga ptr stangaci).
 - Pentru a steriliza ansa mentineti-o in flacara pana cand aceasta este rosie.
 - Raciti ansa timp de 3-5 secunde in apropierea flacarii.
 - Resterilizati ansa inaintea oricarei inoculari.
 - Nu lasati ansa sa atinga orice alta suprafata in afara agarului din cutie Petri.
4. Luati cutia Petri in mana stanga. Descoperiti cutia Petri numai atat cat sa puteti realiza inocularea (introducearea ansei cu microorganisme in interior). Pastrati permanent partea superioara a cutiei (capacul) deasupra partii inferioare a cutiei (care contine mediul de agar) - deschideti cutia numai cat sa permiteti accesul ansei in interior in timp ce realizati inocularea pentru a impiedica patrunderea contaminantilor in interior. Nu atingeti cu ansa partea superioara a cutiei Petri.
5. Eprubeta din care faceti inocularea trebuie tinuta in aceeasi mana ca si cutia Petri intre podul palmei si degetul mic – dopul acesteia va fi scos cu degetul mic al mainii drepte si podul palmei (ansa va fi tinuta in continuare in aceasta mana).
6. Nu apasati ansa in interiorul agarului, ci lasati-o sa alunece pe suprafata acestuia.
7. In timp ce mentineti capacul si ansa intr-o mana si treceti prin flacara capacul flaconului din care faceti inocularea. Nu atingeti cu ansa marginile sau peretii acestui flacon.
8. Nu apropiati ansa de flacara dupa ce ati introdus-o in flaconul din care realizati inocularea sau veti distruge inoculul.

9. Asigurați un model de linii inoculare (linii paralele, zig-zag, etc) pentru a putea verifica dacă ceea ce ați obținut a crescut în urma inoculării sau a fost introdus prin contaminare.



10. Imediat ce ați terminat inocularea reasezați capacul cutiei Petri la loc.
11. Resterilizați ansa

Incubare:

1. Întoarceți plăcile cu capacul în jos și introduceți-le în incubator. Temperatura ideală pentru incubare este de 32 ° C. Creșterea bacteriană ar trebui să înceapă să devină vizibilă în aproximativ 24 ore.

Observatii:

Colonie – o aglomerare de bacterii care se dezvoltă dintr-o singură celulă sau un grup de celule (UFC - unitate formatoare de colonii) pe suprafața unui mediu solid.

Fiecare specie bacteriană formează colonii specifice (caracter util în identificare)

Caracteristica coloniilor

Dimensiuni – colonii mici (0,1-1mm), medii (1-2mm), mari (2-3mm)

Contur (marginii) – neted, ondulat, zimțat, lobat, etc
Suprafață – plată, bombată, convexă, ombilicată, etc
Formă – punctiformă, circulară, filamentoasă, neregulată
Culoare (pigmentație) – albă, galbenă, aurie, etc
Densitate – opacă, transparentă, etc
Consistență – cremoasă, untoasă, uscată, mucoidă

Tipurile de colonii

Colonii S (smooth) – rotunde, netede, umede, lucioase

Colonii R (rough) – margini neregulate, suprafața uscată, rugoasă

Caracterele de cultură ale bacteriilor reprezintă exigențele nutritive (medii, temperatură, pH, aerare, etc), timpul apariției culturii și manifestarea creșterii pe medii lichide și solide

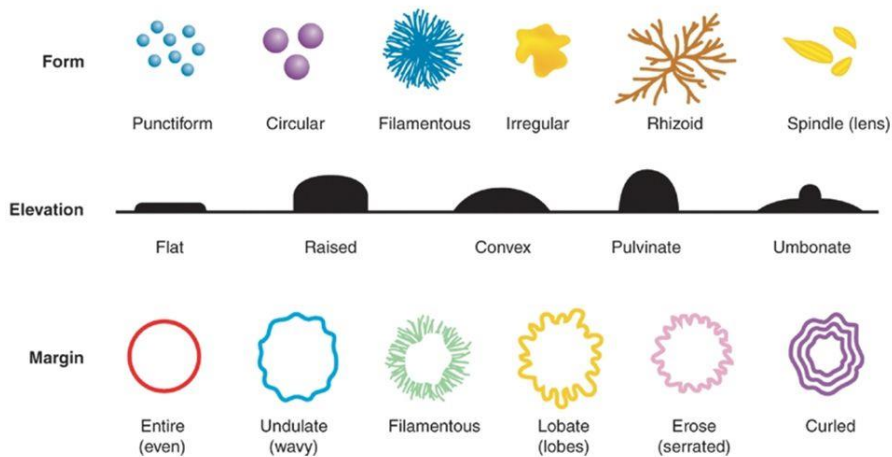


STUDIUL CARACTERELOR COLONIILOR DE BACTERII, DROJDII ȘI MUCEGAIURI

1. Caractere morfo-coloniale ale bacteriilor

a. Culturi pe medii gelozate în plăci Petri

Se vor examina coloniile bacteriene care s-au dezvoltat pe suprafața mediului solidificat, avându-se în vedere următoarele caractere:



1. Mărimea coloniilor: - colonii mici (< 1 mm); colonii medii (1,5 până la 3 mm); colonii mari (> 3 mm)
2. Forma coloniei: - punctiformă, circulară, filamentoasă, neregulată, rhizoidă, fusiformă.
3. Profilul coloniei: - plat, crescut, convex, pulvinat, umbonat.
4. Marginea: - uniformă, ondulată, lobată, erodată, filamentoasă, buclată.
5. Transparența: - colonii transparente
 - colonii translucide
 - colonii opace.
6. Suprafața: - colonii lise (uneori strălucitoare)

- colonii rugoase
- colonii mucoide

7. Consistența - nu poate fi apreciată cel mai adesea decât în urma prelevării de probe:

- colonii grase, cremoase, care dau ușor suspensii omogene
- colonii uscate
- colonii mucoide (filante), care dau greu suspensii omogene.

8. Pigmentația: - coloniile sunt cel mai adesea de culoare crem. O culoare diferită este datorată unor pigmenți, care sunt uneori solubili în mediul de cultură și care nu apar decât la o temperatură determinată.

Coloniile bacteriene pot aparține unuia din următoarele tipuri:

Tipul 1. Colonii S (engl. "Smooth" = neted, lucios) - b

- margini regulate, uneori semi-bombate
- suprafață netedă
- consistență cremoasă
→ suspensie omogenă

Tipul 2. Colonii R (engl. "Rough" = rugos, aspru, zbârcit) - c

- margini adesea neregulate
- suprafață rugoasă
- consistență uscată
→ suspensie heterogenă

Tipul 3. Colonii M (cu consistență mucoasă) - a

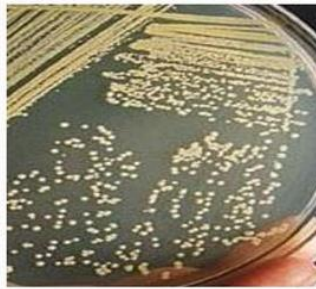
- margine uniformă, regulată
- colonii bombate
- suprafață netedă, strălucitoare
- consistență filantă
→ suspensie heterogenă
→ corespund adesea bacteriilor

capsulate Gram *negative*

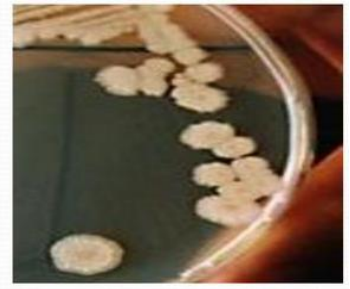
(*Klebsiella, Enterobacter etc*)



a



b



c

b. Culturi în medii lichide în tuburi

Dacă s-a realizat o cultură într-un bulion nutritiv în tuburi, după o incubare de 48 ore se pot evidenția următoarele caractere:

1. Turbiditatea: - tulburare mai mult sau mai puțin intensă a mediului
2. Formarea unei pelicule: - în cazul bacteriilor aerobe apare la suprafața mediului o masă de celule care formează un voal
3. Formare de depozit: în cazul bacteriilor anaerobe se formează un sediment pe fundul tubului, mai mult sau mai puțin abundent, colorat sau nu.

2. Caractere morfocoloniale ale levurilor

- se va observa forma și profilul coloniei, diametrul acesteia, aspectul (de obicei cremos), suprafața (lucioasă sau mată), culoarea (în general alb-crem).

3. Caractere morfocoloniale ale mucegaiurilor

Vor fi determinate următoarele caractere coloniale:

- diametrul coloniei după un timp cunoscut
- culoarea coloniei și modificarea acesteia în timp
- culoarea reversului coloniei
- textura suprafeței coloniei: pufoasă, pârloasă
- eventual prezența picăturilor de “transpirație” pe miceliul aerian
- mirosul

EXAMENUL MICROSCOPIC AL MICROORGANISMELOR

Studiul morfologiei microbiene nu poate fi conceput fără utilizarea microscopului; examenul microscopic joacă un rol important în studiul și identificarea germenilor, precum și în determinarea numărului acestora.

MICROSCOPUL OPTIC

Microscopul optic se compune dintr-un stativ pe care sunt montate un sistem de transmisie optică, o platină port-obiect și un sistem de iluminare.

Sistemul de transmisie optică

Ocularele au puterea de mărire de 5x, 7x, 10x, 15x, 20x și chiar 30x. În lucrările curente cele mai des folosite sunt cele 7x și 10x. Ocularele au rolul de a mări imaginea preparatului, dar și de a aplatiza și lumina câmpul optic.

Obiectivele reprezintă un sistem optic bine centrat, constituit din una sau mai multe lentile destinate a forma o imagine reală a obiectului. Puterea lor de mărire este invers proporțională cu distanța focală, adică cu distanța dintre obiect și lentila pe care se formează imaginea. Calitatea esențială a obiectivelor este puterea lor de rezoluție. Aceasta la rândul ei depinde de mărimea deschiderii unghiului pe care îl face conul de raze care intră în lentilă precum și de indicele de refracție al mediului dintre obiect și lentilă. Obiectivele sunt fixate prin înșurubare pe un revolver port-obiectiv care permite selecționarea rapidă a unuia din ele, prin simpla rotire. Gama de obiective necesare în microbiologie se compune din trei obiective cu puterea de mărire de 10x, 20x, 40x și un obiectiv cu imersie cu grosimentul 90x. Acest obiectiv se folosește în cazul în care obiectul ce trebuie examinat este mai mic sau dacă este necesar a se observa amănunte foarte fine. La obiectivul cu imersie este necesar a se interpune între obiect și lentila

frontală a obiectivului un lichid transparent (ulei de cedru, ulei de parafină, balsam de Canada etc).

Sistemul de iluminare se compune din sursă luminoasă și dintr-un condensator.

Condensatorul este o piesă care se găsește imediat sub platina microscopului și care are rolul nu atât de a strânge (condensa) razele luminoase venite de la sursa de lumină, cât de a mări secțiunea conului de lumină pentru o mai bună claritate a imaginii.

Sistemul de reglare Deplasarea platinei port-obiect sau a sistemului optic se efectuează cu ajutorul unei cremaliere, prin intermediul a două butoane: unul mare care dă o mișcare amplă și rapidă (viza macrometrică) și altul mic, pentru reglajul fin (viza micrometrică).

Modul de utilizare a microscopului

Preparatul este plasat pe platina microscopului, având grijă să fie bine fixat în dispozitivul de prindere. Este selectat obiectivul; în general, un examen debutează cu utilizarea obiectivului cel mai mic. În practică, se utilizează obiectivul 10x, apoi 20x pentru un preparat necunoscut sau pentru Levuri și mucegaiuri și obiectivul 40x pentru bacterii. Se reglează distanța lentilei obiectivului față de preparat prin mișcarea vizei macrometrice și a celei micrometrice. (Obiectivele au o distanță de reglare care descrește cu puterea lor). Căutarea imaginii este apoi efectuată prin manevrarea butonului care acționează cremaliera, iar după fixarea imaginii se face o nouă reglare a acesteia.

Curățarea sistemului optic se efectuează regulat cu xylol și nu cu alcool etilic.

Reglarea intensității luminii condensatorului se face ținând seama de puterea de mărire a obiectivelor; cu cât aceasta este mai mare, cu atât poziția condensatorului este mai ridicată.

EXAMENUL PREPARATELOR ÎN STARE PROASPĂTĂ

Acest tip de operație constă în examinarea unui microorganism într-un mediu lichid între lamă și lamelă.

STUDIUL MICROSCOPIC AL CULTURILOR DE LEVURI

Levurile reprezintă un grup taxonomic complex și heterogen de microorganisme unicelulare eucariote, care se înmulțesc prin înmugurire, ca formă generală de reproducere și în mod particular prin ascospori. Una din proprietățile cele mai importante ale levurilor este aceea de a fermenta o serie de zaharuri, în condiții de anaerobioză, cu formare de alcool etilic, dioxid de carbon și compuși secundari, care dau aroma caracteristică produselor fermentate, proprietate foarte mult utilizată în industria alimentară. Levurile au o compoziție chimică valoroasă și, după cultivare în condiții de aerare sunt utilizate ca sursă de proteine cu denumirea de SCP (single cell protein) în alimentația omului și a animalelor.

Celula de levură are în mod obișnuit formă sferică, ovală, cilindrică, apiculată, sau formă de sticlă, cu dimensiuni medii de 4 - 14 μm. Forma și dimensiunea celulei sunt caractere de specie și pot fi influențate de starea fiziologică și de condițiile de cultivare.

Principiul metodei: Pentru evidențierea caracterelor morfologice și structurale ale Levurilor se folosesc preparate microscopice în stare proaspătă, studiate la microscop cu obiectivele 10x, 20x, 40x.

Materiale utilizate:

- ca materiale biologice se vor utiliza o tulpină de *Saccharomyces cerevisiae* sau o tulpină de *Candida utilis*, cultivate pe mediu cu extract de malț-agar.

- lame de microscop;
- lamele de microscop
- microscop;

- pipete sterile;
- ansă;
- eprubete sterile;
- albastru de metilen;
- alcool etilic 95 %;
- apă distilată 100 ml;
- sticlură picurătoare.

Mod de lucru

a) Prepararea colorantului -soluție albastru de metilen

Se cântăresc 0,3 g albastru de metilen, peste care se adaugă 30 ml alcool etilic 95 %. După dizolvarea colorantului în alcool se adaugă 100 ml apă distilată.

b) Evidențierea caracterelor morfologice

De pe suprafața mediului de cultură se recoltează cu ansa o porțiune din cultura de levură care se amestecă într-o eprubetă cu câțiva ml apă. Din suspensia de celule se depune pe lama microscopică o picătură cu diametrul de ~ 0,7 cm, în zona centrală, cu ajutorul unei pipete. Se acoperă preparatul cu o lamelă curată, evitându-se formarea de bule de aer. Se examinează la microscop cu obiectivele de 10x, 20x și 40x, reținându-se forma celulei, prezența nucleilor, prezența celulelor înmugurite.

c) Evidențierea celulelor autolizate

O suspensie de celule de levură se amestecă în volume egale cu o soluție de albastru de metilen diluat și după 3-5 minute se execută un preparat umed: celulele autolizate vor apare intens colorate în albastru, comparativ cu celulele vii, necolorate. Într-un câmp microscopic se vor determina numărul total de celule și separat, celulele autolizate, făcându-se raportul acestora.

STUDIUL MICROSCOPIC AL CULTURILOR DE FUNGI

Mucegaiurile (sau fungii filamentoși) includ microorganisme de tip eucariot, monocelulare sau pluricelulare, cu nutriție de tip absorbtiv, diferențiate din punct de vedere morfologic și care se reproduc prin spori sexuați sau asexuați. Corpul mucegaiurilor constă din celule filamentoase, ramificate, numite hife, care formează miceliul. Mucegaiurile pot fi monocelulare, când se dezvoltă sub forma unei celule uriașe cu ramificații (miceliu coenocitic) sau pluricelulare, caz în care miceliul este septat prin pereți despărțitori (miceliu necoenocitic). Aparatul reproducător este reprezentat de hifele reproducătoare purtătoare de spori sexuați sau asexuați.

Principii metodei: Pentru evidențierea caracterelor morfologice și structurale -hife vegetative și aparat reproducător - se efectuează un preparat proaspăt între lamă și lamelă sau un preparat în lactofenol, prin tehnica benzii adezive.

Materiale utilizate:

- culturi de *Aspergillus niger* și *Penicillium sp.* în plăci Petri ;
- lame microscopice;
- lamele microscopice;
- microscop;
- pipete sterile;
- ansă;
- lactofenol;
- bandă adezivă transparentă.

Mod de lucru:

Se efectuează un preparat umed între lamă și lamelă, în felul următor: din cultura în plăci Petri se recoltează cu ajutorul firului metalic, din partea marginală a coloniei și fără a deranja structura inițială a miceliului, o mică porțiune, care se desprinde ușor într-o picătură de apă sterilă sau lactofenol de pe lama microscopică. Se așează lamela evitând formarea în preparat a bulelor de gaz și se face

studiul cu obiectivele 10x, 20x și 40x. Pentru menținerea cât mai exactă a structurii aparatului reproducător, se poate așeza ușor banda cu partea adezivă peste cultura de mucegai din placa Petri, apoi se pune peste picătura de lactofenol de pe lama microscopică. Se examinează cu aceleași obiective. Pentru cele două tulpini fungice se observă forma hifelor, prezența septurilor hifale, prezența conidiforilor cu organele de fructificație specifice genurilor *Aspergillus* și *Penicillium*.

EVIDENȚIEREA MICROSCOPICĂ A BACTERIILOR

Bacteriile sunt microorganisme monocelulare de tip procariot, cu un cromozom unic, cu dimensiuni medii între 0,5 - 8 μm, care se înmulțesc asexuat prin sciziune binară, izomorfă. Bacteriile au un rol major în natură în transformarea compușilor organici în compuși anorganici simpli, prin procesul de mineralizare a materiei organice nevii, contribuind la realizarea circuitelor unor elemente chimice de importanță vitală: carbon, azot, sulf, fosfor ș.a. În procesele industriale, bacteriile sunt utilizate drept culturi starter în unele procese fermentative din industria alimentară (fabricarea produselor lactate, în panificație, la conservarea materiilor prime vegetale), la obținerea de enzime, proteine, aminoacizi, acizi organici, solvenți, antibiotice, îngrășăminte biologice, insecticide , vitamine, hormoni etc.

Principiul metodei: metoda se bazează pe efectuarea preparatului proaspăt între lamă și lamelă din culturi bacteriene obținute din *Bacillus subtilis* și *Lactobacillus sp.*

Materiale utilizate:

- cultură în slanturi de *Bacillus subtilis*;
- cultură de *Lactobacillus* in mediu lichid (mediul MRS);
- lame microscop;
- lamele;
- ansă;
- apă distilată.

Mod de lucru:

Pe lama microscopică se pune o picătură de apă sterilă cu diametrul de 0,7 -1 cm. Cu vârful firului metalic se recoltează steril, la flacăra de gaz, o porțiune dintr-o cultură de *Bacillus subtilis* pe agar nutritiv, în eprubete. Cultura se omogenizează într-o picătură de apă, apoi se ia o lamelă curată, se sprijină pe lamă la un unghi de 45 grade, se deplasează până când lamela devine tangentă la picătură și se lasă să cadă peste aceasta: lichidul în exces se absoarbe cu o hârtie de filtru. Un preparat bun nu trebuie să prezinte bule de aer; acestea pot determina aglomerări de celule și împiedică o bună observare a proprietăților.

Pentru executarea preparatului din culturile lichide de *Lactobacillus*, se recoltează din proba omogenizată cu o pipetă din care se lasă să cadă pe lamă o picătură, care se acoperă apoi cu lamela.

Se observă cu obiectivele 20x și 40x. Se vor urmări: în ambele cazuri- forma celulelor, eventual formarea de lanțuri de bacili; prezența sporilor bacterieni în cazul preparatului cu *Bacillus subtilis*.

EXAMENUL PREPARATELOR BACTERIENE ÎN STARE USCATĂ

Examenul microscopic studiază morfologia și structura bacteriilor, precum și caracterele lor tinctoriale. Examenul microscopic poate fi efectuat:

1. În stare nativă (preparate umede, necolorate: “între lamă și lamelă”, “picătură suspendată”), studiază morfologia, mobilitatea bacteriilor, unele activități (ex.: sporogeneza)

2. În frotiuri (preparate fixate și colorate).

Prin **frotiu** se înțelege material microbial (produs patologic sau cultura microbiană) etalat în strat subțire pe suprafața unei lame de microscop.

Efectuarea unui preparat în stare uscată sau frotiu constă în etalarea probei de studiat urmată de o uscare, de o fixare și, eventual, de o colorare. Frotiurile sunt realizate frecvent pentru bacterii sau pentru produse care conțin bacterii, rareori pentru alte microorganisme.

TEHNICA DE EXECUTARE A PREPARATELOR USCATE. COLORATIA GRAM

Caracter tinctorial definește capacitatea bacteriilor de a fixa diferiți coloranți. Aceștia pot fi:

- Coloranții bazici (violetul de gențiană sau de metil, fucsina bazică, albastrul de metilen, vezuvina, chrizoidina, etc) și au afinitate pentru structurile acide ale celulei bacteriene
- coloranți acizi (eosina)

Colorațiile folosite în bacteriologie sunt:

1. Colorațiile simple - utilizează un singur colorant și evidențiază doar morfologia microbilor: dimensiune, formă, gruparea celulelor, prezența capsulei. Dintre colorațiile simple, uzuală și rapidă este colorația cu **albastru de metilen** care colorează în albastru toate elementele celulare: bacterii, leucocite, celule epiteliale.

2. Coloratiile diferentiale - evidentiaza in afara caracterelor morfologice si reactiile de culoare ale microbilor.

Coloratia Gram si coloratia Ziehl-Neelsen (Z.N.) sunt cele mai utilizate in bacteriologie. În anul 1884 Christian Gram a constatat că bacteriile reacționează diferit în urma aceleiași tehnici de colorare și pune bazele metodei diferențiale de colorare ce îi poartă numele, prin care bacteriile sunt împărțite în două mari grupe: Gram - pozitive și Gram - negative. Comportarea diferita a bacteriilor in coloratia Gram ține de diferențele structurale ale peretelui bacterian. Bacteriile Gram- pozitive apar colorate în violet, iar cele Gram-negative in rosu. Leucocitele si celulele epiteliale apar cu citoplasma colorata in roz si nucleul in rosu.

Coloratia Ziehl-Neelsen este folosita pentru identificarea urmatoarelor grupe de bacterii: *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* si oochistii de *Cryptosporidium*, *Isopora*, *Sarcocystis* si *Cyclospora*. Uzual in bacteriologie coloratia Z.N. este folosita pentru decelarea *Mycobacteriilor*. Acestea, spre deosebire de alte bacterii, datorita prezentei in peretele bacterian a unor substante ceroase, se coloreaza la cald cu fucsina bazica si rezista la decolorarea cu acizi minerali diluati si cu alcool. Bacilii acido-alcool-rezistenti apar colorati in rosu, iar bacteriile neacido-rezistente apar colorate in albastru la fel ca leucocitele si celulele tisulare, a caror citoplasma se coloreaza in albastru deschis cu nucleul albastru inchis.

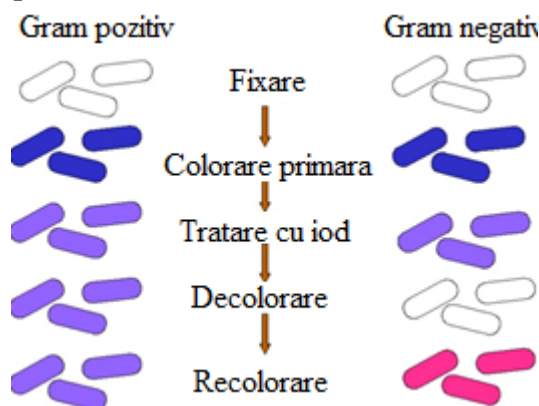
In timp s-au dezvoltat numeroase modificari de la metoda originala descrisa de Ziehl in 1882 si Neelsen in 1883, cea mai utilizata fiind cea descrisa de Kinyoun.

3. Coloratii speciale pentru structuri particulare ale unor bacterii (capsula - tus India; granulatii metacromatice - Del Vecchio, spori-verde malachit).

Controlul intern de calitate al frotiurilor este obligatoriu si se face cu martor pozitiv si negativ. In cazul coloratiei Gram folosim urmatorii martori:

- martor pozitiv: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- martor negativ: *Escherichia coli* ATCC 25922.

Principiul metodei: Colorarea diferențiată a celulelor în funcție de structura peretelui celular, prin metoda Gram, are la bază o tehnică în mai multe etape. În prima etapă, celulele sunt colorate cu colorantul bazic cristal-violet, utilizat drept colorant primar. Cea de a doua etapă cuprinde tratamentul cu o soluție de I₂ / KI, cu rol de mordant, care mărește interacția dintre colorant și componentele celulei. A treia etapă este reprezentată de spălarea cu alcool-acetonă, unde se diferențiază cele două tipuri de bacterii; cele Gram pozitive rețin cristalul violet, în timp ce bacteriile Gram - negative pierd colorantul primar și devin incolore. În final, acestea din urmă sunt colorate cu un alt colorant, secundar, cum este safranina sau fuxina. În acest mod, cele două categorii de bacterii rămân colorate diferit, putând fi diferențiate în funcție de structura peretelui lor celular.



Materiale utilizate:

- cultură bacteriană;
- violet de gențiana;
- fenol cristalizat;
- iod;
- iodură de potasiu;
- alcool;
- acetonă;
- fuxină sau safranină
- ulei de imersie;

- lame de sticlă;
- balanță;
- pipete;
- baloane cotate;
- sticlute picurătoare.

Mod de lucru:

A. Prepararea soluțiilor

1. Violet de gețiana:

- violet de gețiana..... 1 g
- fenol cristalizat.....5 g
- alcool etilic 96 %.....10 ml
- apă distilată.....100 ml

Se triturează cristalele în mojar, se adaugă câteva picături de glicerină și treptat, alcoolul, până devine ca o pastă, și apoi cantitatea de apă. Se păstrează 48 ore, după care se filtrează și se folosește la colorarea după Gram.

2. Soluție de Lugol:

- iod metalic..... 1 g
- iodură de potasiu..... 2 g
- apă distilată.....300 ml

Se dizolvă iodura de potasiu în 5 ml apă, se adaugă cristalele de iod și se dizolvă, apoi se adaugă restul de apă până la 300 ml.

3. Fuxina Ziehl:

- fuxină bazică..... 1 g
- fenol cristalizat.....5 g
- alcool etilic 96%.....10 ml
- apă distilată.....100 ml

Se triturează cristalele în mojar, se amestecă cu câteva picături de glicerină, se adaugă alcoolul treptat, până se formează ca o pastă și se adaugă apă distilată. Se filtrează după un repaos de 48 ore. Pentru soluția diluată se face un amestec cu apă distilată în proporție de 1/10.

B. Etapele de obținere a frotiurilor colorate sunt următoarele:

- Pregătirea lamei: Lama perfect curată se sterilizează prin treceri consecutive ale ambelor fețe prin flacăra becului de gaz și se lasă să se răcească pe stativ, în poziție înclinată.
- **Etalarea** suspensiei de celule: Preparatul se realizează în picătură de apă sterilă în care se suspendă celulele recoltate cu firul de inoculare. Suspensia de celule se întinde prin deplasarea firului ansei tangent cu lama, într-un strat uniform. Preparatul de pe lama pe care s-a făcut etalarea și uniformizarea materialului biologic poartă numele de frotiu.
- **Uscarea** frotiului: După uniformizare, frotiul se așează pe stativul de uscare sau se menține în curentul de aer cald, la distanță de flacăra becului de gaz, pentru a se produce evaporarea lichidului și atașarea celulelor bacteriene de suprafața lamei.
- **Fixarea** frotiului constă în omorârea și aderarea la lamă a celulelor microbiene. Fixarea prin căldură se face trecând frotiul uscat de trei ori, cu o mișcare lentă, prin flacăra becului de gaz, cu fața opusă celei pe care se află preparatul.

C. Tehnica de colorare constă în următoarele:

- Frotiul uscat și fixat se acoperă cu violet de gențiana, care se menține 1-2 minute, după care se scurge și se clătește cu apă.
- Frotiul se acoperă cu soluție Lugol, cu rol de mordant, timp de 1 minut; se scurge și se clătește cu apă;
- Spălarea frotiului în 2-3 rânduri, cu picături din amestecul de alcool-acetonă (3/1);
- Frotiul se spală cu apă în jet subțire și se colorează cu o soluție de fuxină diluată (1/10), care se menține pe preparat 1-2 minute, se scurge excesul de colorant, se spală cu apă;
- Uscarea frotiului și examinarea preparatului cu obiectiv de imersie.

Celulele Gram pozitive vor apare colorate în violet, celulele Gram negative, în roșu.

EXAMENUL PREPARATELOR BACTERIENE ÎN STARE USCATĂ

O metoda de colorație simplă se poate realiza și prin colorare cu un singur colorant, în care tot ce exista în frotiu (bacterii, fungi) colorându-se într-o unica culoare

Materiale utilizate:

- cultură bacteriană;
- albastru de metil;
- alcool;
- ulei de imersie;
- lame de sticlă;
- balanță;
- pipete;
- baloane cotate;
- sticluțe picurătoare.

Modul de lucru:

Pregătirea colorantului:

Se cantaresc 10 g de albastru de metilen, se introduc într-un mojar, se mojarăza fin se adauga 100 ml alcool 96%. Aceasta se pastreaza 7 zile la maturare la termostat si se va agita zilnic. Dupa aceasta perioada la 20 ml din aceasta solutie se adauga 4g fenol cristalizat si 180 ml de apa distilata. Dupa omogenizarea sa perfecta se poate utiliza.

Prepararea frotiului

1. **Etalarea** materialului microbial (cultură microbială) în strat subțire pe suprafața unei lame de sticlă degresată.

Pregătirea lamei: Lama perfect curată se sterilizează prin treceri consecutive ale ambelor fețe prin flacăra becului de gaz și se lasă să se răcească pe stativ, în poziție înclinată.

Etalarea suspensiei de celule: Preparatul se realizează în picătură de apă sterilă în care se suspendă celulele recoltate cu firul de inoculare. Suspensia de celule se întinde prin deplasarea firului ansei

tangent cu lama, într-un strat uniform. Preparatul de pe lama pe care s-a făcut etalarea și uniformizarea materialului biologic poartă numele de frotiu.

2. Uscarea

După uniformizare, frotiul se așează pe stativul de uscare sau se menține în curentul de aer cald, la distanță de flacăra becului de gaz, pentru a se produce evaporarea lichidului și atașarea celulelor microbiene de suprafața lamei.

3. Fixarea (termică, chimică).

Fixarea frotiului constă în aderarea la lamă a celulelor microbiene. Fixarea prin căldură se face trecând frotiul uscat de trei ori, ptr 5-10 secunde, cu o mișcare lentă, prin flacăra becului de gaz, cu fața opusă celei pe care se află preparatul. Trecerea se face în acea poziție față de flacăra care asigură o temperatură suportabilă la atingere de către partea dorsală a mâinii.

4. **Colorarea.** Asigură contrastul dintre microorganisme și fondul preparatului.

Frotiul uscat și fixat se acoperă cu albastru de metilen și se păstrează în această stare 2-5 minute, apoi se varsă colorantul. Se spală lama cu apă, se usucă și se examinează la microscop

5. Examinarea frotiului la microscopul optic cu imersie.

Rezultat la microscop:



Aceasta este o metoda de colorații simple - colorare cu un singur colorant, tot ce exista in frotiu (bacterii, fungi) colorându-se intr-o unica culoare.

OBȚINEREA INOCULULUI DE LABORATOR PENTRU OBȚINEREA B-GALACTOZIDAZEI FOLOSIND *E. COLI* CA MICROORGANISM PRODUCATOR

Obiectiv:

- familiarizarea studentilor cu modul de pregatire al inoculului de laborator si vizualizarea/analiza modului în care se dezvoltă microorganismele de la o singura colonie la inocul utilizat pentru un bioreactor de laborator.
- cumulara tuturor tehnicilor studiate în primele sedințe de laborator (pregatire și sterilizare mediu de cultură, prelevarea unei colonii dintr-o cutie Petri/eprubetă cu mediu înclinat, vizualizarea microorganismelor la microscop) într-un singur proces
- introducerea tehnicilor de analiza a biomasei (analiza densității optice) în vederea obținerii curbei de creștere a microorganismelor și identificarea etapelor de dezvoltare a biomasei într-un proces de biosinteză (inoculul pentru fermentație trebuie să atingă faza exponențială – fiind importantă identificarea acestei etape practic, pentru a face inocularea în momentul optim)

Introducere

Escherichia coli (pe scurt *E. coli*) este un microorganism de o importanță crucială în biotehnologia modernă, fiind folosit pentru a stoca secvențe de ADN din alte organisme, pentru a produce proteine/enzime vitale și pentru a testa funcția proteinelor.

E. coli este o bacterie lactozo-pozitivă (descompune lactoza), gram-negativă, oxidazo-negativă, ce apare la microscop sub formă cilindrica. Face parte din grupa enterobacteriilor care trăiește ca epifit în tractul digestiv, fiind denumită în 1919 după numele bacteriologului germano-austriac Theodor Escherich, care a descoperit-o. Există un număr mare de tulpini (sau subtipuri) de *E. coli* cu caracteristici diverse, iar majoritatea sunt inofensive pentru oameni, inclusiv *E. coli*

ATCC 15224. Acest fapt cumulat cu creșterea sa rapidă în medii bine cunoscute din punct de vedere chimic și relativ ieftine, faptul că nu formează agregate/asocieri, existența unor cunoștințe extinse despre genetica și genomica sa, au făcut ca acest microorganism să fie extrem de utilizat la nivel de laborator.

β -galactozidaza, EC 3.2.1.23, este o enzimă importantă în industria produselor lactate și medicale. Se folosește pentru obținerea produselor lactate cu conținut redus de lactoză, utilizat pentru lapte condensat sau înghețată, pentru accelerarea timpului de coagulare pentru brânză și iaurt și, de asemenea, pentru valorificarea zerului. β -galactozidaza, în *E. coli*, există ca tetramer a patru subunități identice (compuse din 1024 aminoacizi) care catalizează, la un pH optim de 7,2, hidroliza beta-galactozidelor. Reacția naturală catalizată de beta-galactozidază este de a hidroliza dizaharida lactoză la galactoză și glucoză (Fig. 1).

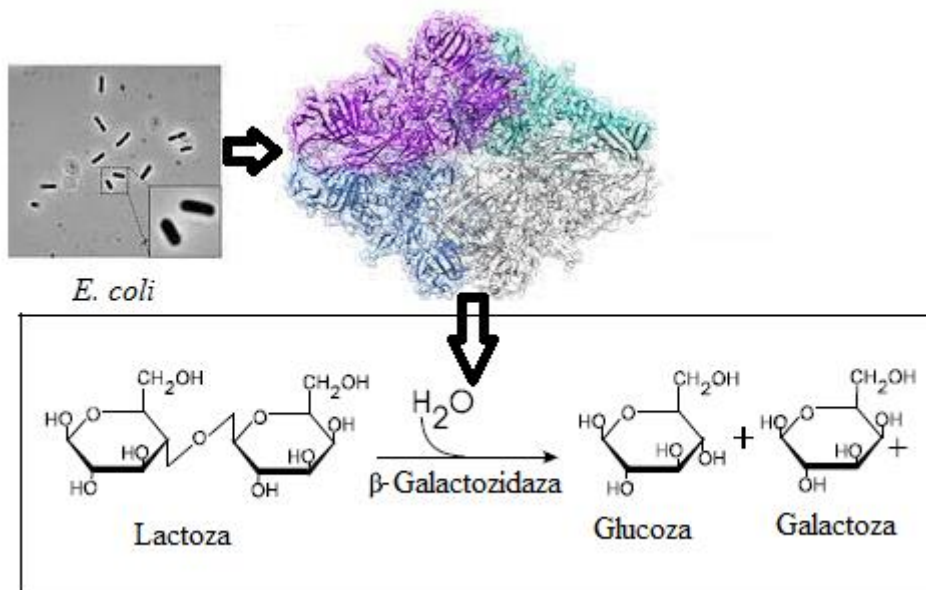


Fig. 1. Reacția catalizată de betagalactozidaza

Prin inocularea de celule, aparținând unei culturi pure, într-un mediu nutritiv steril se poate stabili dinamica de creștere prin studiul

vitezei de acumulare a biomasei sau prin creșterea numărului de celule raportat la unitatea de volum a mediului.

În condițiile experimentale procesul evoluează într-o serie de faze succesive (Fig. 2).

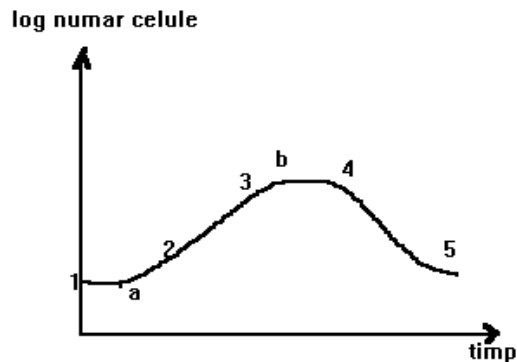


Fig. 2. Curba de multiplicare a microorganismelor

- 1÷2-faza de repaos (faza lag); 1÷a-perioada de adaptare; a÷2-perioada de refacere;
- 2÷3-faza exponențială; 3÷4-faza staționară;3÷b- perioada de spor de creștere negativ;
- b÷4-perioada de staționare propriu-zisă;5-faza finală de declin.

1) Faza de latență, de creștere zero sau de lag reprezintă etapa de timp când după inoculare numărul celulelor rămâne neschimbat, sau chiar scade, noile condiții de mediu implică latența inducției acelor enzime necesare pentru adaptarea la mediul nutritiv. Faza de latență apare, deci ca o perioadă de adaptare la condițiile noi de cultură, în care microorganismele viabile din inocul își acumulează în celulă metaboliți și sistemele necesare creșterii, în cazul în care aceste componente biochimice le lipseau datorită condițiilor de mediu anterioare inoculării. Dacă la inoculare se utilizează o cultură viguroasă, aflată în faza activă de creștere, în mediul cu o compoziție similară, faza lag este scurtă sau poate să fie absentă.

2) Faza de multiplicare exponențială sau de creștere logaritmică este caracterizată prin aceea că, după o scurtă perioadă de accelerare a ritmului de creștere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresivă mărită, acest ritm devine constant și caracteristic în anumite condiții de cultură, durata unei generații fiind minimă. Perioada de echilibru poate fi menținută numai atât cât nu intervin alterări importante, pe care creșterea le poate provoca în compoziția mediului. Celulele aflate în faza exponențială de multiplicare sunt cele mai potrivite pentru inoculare într-un bioreactor de volum superior.

3) Faza staționară (de maturare) în care numărul celulelor viabile este maxim și rămâne constant o perioadă de timp. Celulele de microorganisme au în această fază caracteristicile morfologice cele mai tipice genului și speciei. Această fază poate fi prelungită atunci când urmărim păstrarea culturii pure, prin modificarea unor factori care scad viteza de metabolism celular.

4) Faza de declin se caracterizează printr-o scădere în progresie geometrică, în raport cu timpul, a numărului de celule vii. Pe măsură ce mediul devine mai puțin favorabil, celulele vii nu se mai multiplică (deși activitatea lor mai continuă un timp), după care mor și intră în autoliză.

Scopul lucrării:

- Obținerea inoculului de laborator prin cultivarea bacteriei *E coli*

Modul de lucru:

E. coli ATCC 15224, tulpina mutantă care nu necesită lactoză în mediu pentru producția de β -galactozidază, va fi utilizată pentru obținerea unei culturi în faza exponențială care să poată fi utilizată pentru un bioreactor cu volumul util de 1l.

Mediul de cultură (100 ml) utilizat va fi: glucoza 3 g/l, peptona 10 g/l, extract de carne 5 g/l, clorura de sodiu 5 g/l. Se prepară separat soluția de glucoză de restul mediului de cultură (pentru a evita

formarea compușilor cu acțiune inhibitorie asupra microorganismelor în timpul sterilizării), ținându-se cont de volumul total al mediului. Mediul preparat se ambalează corespunzător (flacon Erlenmayer prevazut cu dop de vată care să permită trecerea aerului și folie de aluminiu pentru protecție împotriva contaminării) și se supune sterilizării în autoclavul BIOBASE la programul 1 (120°C timp de 20 min). La finalizarea procesului de sterilizare se așteaptă până la scăderea temperaturii autoclavului sub valoarea de 80°C când se pot aduce flacoanele la nișa sterilă, având fluxul laminar pornit.

După răcirea mediului la temperatura de 35-40°C (aproximativ 15 min), se va amesteca soluția de glucoză cu restul mediului și se va realiza inocularea. În acest scop, se va utiliza o eprubeta cu mediu inclinat care conține cultura pură de *E. coli*. La nișa sterilă, se va antrena cu ajutorul ansei microbiologice sterilizată prin încălzire la roșu în flacăra becului de gaz și răcită, (pentru a evita distrugerea microorganismelor), o singura colonie de pe suprafața agarului. Aceasta va fi trecută în flaconul cu mediu. După agitarea mediului pentru dispersarea coloniei, flaconul cu mediu se va trece în incubator la temperatura de 37 °C. Din 20 în 20 de minute flaconul va fi aduc la nișă și se vor preleva probe pentru determinarea densității optice (0.5 ml cu pipeta sterilă).

Densitatea optică se analizează spectrofotometric la lungimea de unda 600 nm, după diluție 1:5 cu o soluție de 9g/l NaCl (care va inhiba dezvoltarea microorganismelor).

Din probele obținute prin diluție, se va analiza câte 0.1 ml la microscop în preparat lamă/lamelă după fiecare probă pentru a verifica sterilitatea și pentru a vizualiza și la microscop creșterea numărului de microorganisme. Pentru penultima proba se va realiza și un preparat colorat Gram.

Prelucrarea datelor:

Se va reprezenta grafic în funcție de timp densitatea optică pentru a putea pune în evidență etapele de creștere a microorganismelor (dezvoltarea biomasei) – Fig. 2.

Timp, min	0	20	40	60	80	100	120	150	180
Densitate optica									

Observatii:

! Utilizați manșile din laborator pentru protecție la transportul flacoanelor fierbinți.

! Utilizați doar instrumente sterile la prelevarea proelor din flacoane în timpul procesului de fermentație pentru evitarea contaminării.

DETERMINAREA VITEZEI DE CREȘTERE A COLONIILOR DE FUNGI

Dezvoltarea fungilor are loc destul de rapid în condiții favorabile, astfel că în interval de 2 - 3 zile pe mediu nutritiv se formează colonii vizibile, care cresc în diametru. În cazul mucegaiurilor inferioare caracterizate prin miceliu coenocitic, neseptat, coloniile se dezvoltă rapid, sunt extinse, cu tendința de a ocupa tot spațiul disponibil, având aspect păslos și culori alb, bej, cenușiu, brun. Mucegaiurile superioare caracterizate prin miceliu septat formează colonii cu creștere radiară limitată și culori ce diferă de la alb la galben, brun, verde, portocaliu, albastru.

Principiul metodei:

Viteza de creștere a mucegaiurilor se poate determina prin cultivarea acestora în plăci Petri, prin înțepare centrală și măsurarea zilnică a diametrului coloniei, până la invadarea completă a suprafeței plăcii. Pentru microorganismele cercetate, apariția sporilor coincide cu colorarea zonei respective, începând cu centrul coloniei.

Materiale utilizate:

- plăci Petri sterile;
- ansă microbiologică;
- mediu de cultură: extract de malț - agar în flacoane Erlenmayer;
- soluție acid lactic 5 %, sterilă;
- hârtie indicatoare de pH;
- material biologic -cultura în slanturi de *Pencillum*, *Aspergillus* sau alt fung
- baie de apă termostată;
- bec de gaz.

Mod de lucru:

Mediul de cultură se topește pe baia de apă, apoi se termostatează la 45 °C. Se adaugă soluția sterilă de acid lactic până când pH-ul devine 3,5,

valoare la care este inhibată dezvoltarea bacteriilor, dar nu și a mucegaiurilor.

Se toarnă 15-20 ml mediu de cultură în fiecare placă Petri și se lasă la temperatura camerei pentru solidificare.

Cu vârful acului de inoculare, se recoltează o mică porțiune din cultură sporulată din eprubeta cu cultura de mucegai și se însămânțează prin înțepare în partea centrală a plăcii, cu mare atenție pentru a nu se răspândi sporii pe suprafața mediului de cultură. Cutia se va închide cu bandă adezivă și se termostatează la temperatura camerei, măsurându-se zilnic diametrul coloniei.

Se determină viteza de creștere, $V_{\text{creștere}}$, după formula:

$$V_{\text{creștere}} = \text{diametrul maxim al coloniei} / \text{nr.zile (ore)}$$

ESTIMAREA DENSITĂȚII POPULAȚIILOR MICROBIENE

Numărarea microorganismelor se execută în mod frecvent în laboratorul de microbiologie, în vederea aprecierii stadiului de multiplicare a celulelor din diferite culturi folosite în industrie sau pentru determinarea gradului de contaminare a unor produse, în special alimentare. Pentru a asigura o numărare rapidă și în același timp precisă, ținând cont că încărcătura microbiană a diferitelor produse și culturi poate să fie foarte ridicată, se recomandă în prima etapă să se efectueze diluări ale produsului supus analizei microbiologice.

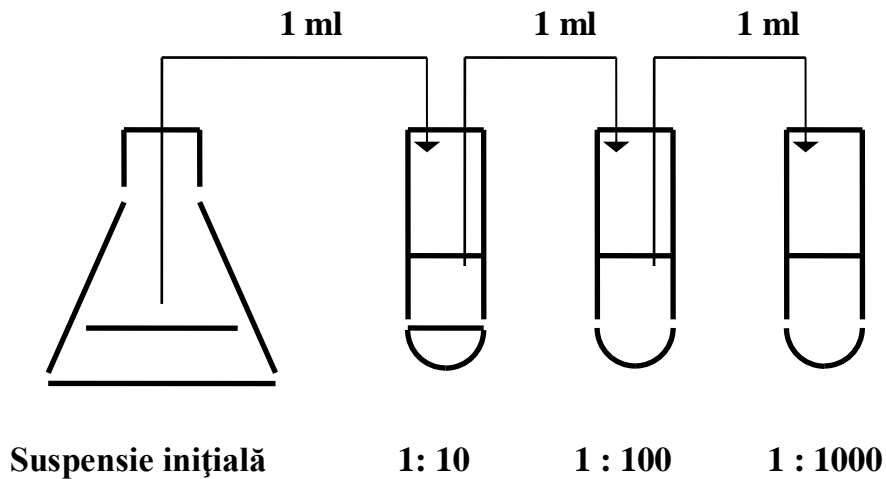
TEHNICA OBȚINERII DILUȚIILOR DECIMALE

După recoltare, la omogenizarea probelor destinate analizei microbiologice, se recomandă ca raportul între produs și diluant să fie de 1:10, obținându-se astfel prima diluție (diluție 10^{-1}). Pentru efectuarea următoarelor diluții decimale, cu o pipetă sterilă, se barbotează lichidul pentru omogenizare, se recoltează 1 ml din diluția I și se scurge lichidul în altă eprubetă cu 9 ml ser fiziologic steril, obținându-se diluția a II-a (diluție 10^{-2}) și se continuă procedeul până la obținerea diluției necesare. Gradul de diluare este condiționat de numărul presupus de microorganisme din proba de analizat; cu cât numărul este mai mare, cu atât se fac mai multe diluții. Pentru majoritatea produselor sunt suficiente 4 - 8 diluții succesive.

Când se face numărarea celulelor dintr-o anumită diluție considerată corespunzătoare, numărul obținut se multiplică cu coeficientul de diluție "k", pentru a obține numărul de celule existent în produsul inițial (pentru d I, $k = 10$, pentru d II, $k = 100$ etc).

Pentru evitarea erorilor se recomandă omogenizarea conținutului eprubetelor în care s-a făcut diluarea fie prin rotirea eprubetei între palme, fie, cu ajutorul pipetei sterile, prin barbotare, înainte de recoltarea volumului de 1 ml destinat următoarei diluții. Se iau toate

măsurile de precauție pentru a evita contaminarea cu microorganisme din mediul ambiant, lucrând în zona de protecție din jurul flăcării becului de gaz și respectând regulile de manipulare.



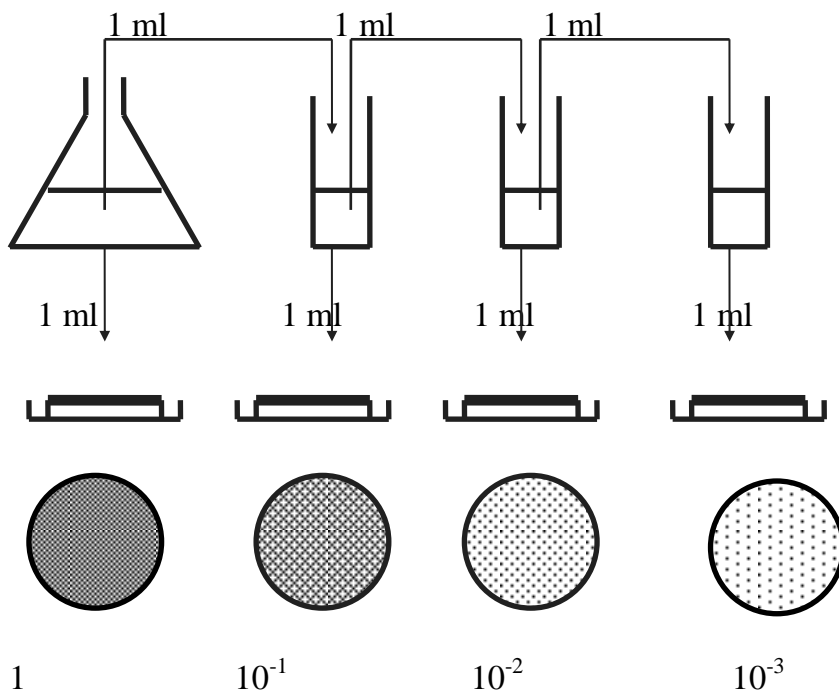
După efectuarea diluțiilor decimale, numărarea microorganismelor se poate realiza prin metode directe, cu ajutorul camerelor de numărare sau prin metode indirecte.

ESTIMAREA NUMĂRULUI DE CELULE MICROBIENE PRIN METODA CULTURALĂ

Principiul metodei:

Metoda culturală Koch constă în însămânțarea unui volum cunoscut din suspensia de celule în / sau pe medii de cultură solidificate în plăci Petri și, după o perioadă de incubare, se face număratoarea coloniilor considerând că fiecare colonie este rezultată prin multiplicarea unei singure celule. Metoda cultivării în plăci este foarte adesea folosită pentru determinarea numărului de microorganisme vii dintr-un produs și permite, în același timp, o analiză calitativă prin studiul caracterelor morfologice ale coloniilor dezvoltate. De obicei se utilizează diluțiile decimale ale produsului de analizat.

Rezultatul se exprima în UFC (unități formatoare de colonii), deoarece pot exista mai multe celule aglomerate care formează o colonie, iar în cazul mucegaiurilor există fragmente multiceulare de hife; în plus, există destule celule izolate care nu formează colonii. Se vor alege plăcile care conțin între 30 și 300 colonii.



Materiale utilizate:

- mediu de cultură: agar nutritiv sterilizat în flacoane Erlenmayer de 500 ml;
- plăci Petri sterile;
- pipete sterile;
- eprubete cu câte 9 ml apă sterilă;
- probe de apă din diferite surse;
- baie de apă la 45 °C;
- termostat la 37 °C;
- dispozitiv de numărat colonii.

Mod de lucru:

Mediul de cultură conținut în balonul Erlenmayer se pune la topit pe baie de apă. După fluidificarea completă, se termostatează, tot pe baie de apă la 45 °C.

Folosind pipeta sterilă, se pregătesc câte 3 diluții din probele de apă și apoi se recoltează câte 1 cm³ din aceste diluții și I, prin desfacerea plăcii Petri sterile, se lasă să treacă numai pipeta și se scurge conținutul.

Peste volumul de suspensie se toarnă mediul de cultură steril la 42-45 °C și, imediat, prin rotirea în plan orizontal a plăcii, se face omogenizarea cu mediul și se lasă în repaos pentru solidificarea mediului și fixarea celulelor. Se recomandă ca din aceeași diluție să se facă însămânțari în câte două plăci paralele.

Plăcile cu mediile însămânțate se introduc în termostat, reglat la temperatura de 37 °C, pentru dezvoltarea microorganismelor. Numărarea coloniilor se va face după 72 ore. Pentru numărare se aleg plăcile în care numărul de colonii este cuprins între 30 - 300, acolo unde este posibil. În cazul în care coloniile sunt dese, pentru a înlesni numărătoarea, placa Petri se inversează și se așează pe numărătorul de colonii .

La metoda culturii, toate operațiunile se execută cu multă atenție evitându-se orice sursă de infectare cu microorganisme străine, care, ajungând în placă ar influența rezultatul analizei.

Numărul de unități formatoare de colonii este dat de formula:

UFC/ml = Nr. colonii x coeficientul de diluție

DETERMINAREA NUMĂRULUI DE MICROORGANISME ÎN MEDII LICHIDE

Această metodă se bazează pe efectuarea de diluții cu care este înșămânțat mediul de cultură lichid. Diluțiile se efectuează din 10 în 10, pornind de la suspensia inițială pentru care se determină numărul de germeni.

Mediul de cultură ales convenabil este repartizat steril câte 9 ml în fiecare tub. Serii de 3 sau 5 tuburi vor fi înșămânțate cu câte 1 mililitru din suspensia inițială, apoi din diluțiile decimale în ordine descrescătoare a densității celulelor (fiecare nouă serie antrenează un nou factor 10 de diluție). După incubare se procedează la citirea rezultatelor, considerându-se pozitive tuburile în care este vizibilă creșterea (sau este vizibilă o activitate biologică: virajul unui indicator de pH, degajare de gaz sau altele) și negative celelalte.

Pentru fiecare serie de culturi provenite din aceeași diluție, se numără tuburile pozitive, care pot fi:

1. - 0, 1 sau 2 pentru 2 tuburi;
2. - 0, 1, 2 sau 3 pentru 3 tuburi;
3. - 0, 1, 2, 3, 4 sau 5 pentru 5 tuburi.

Se compune astfel un număr caracteristic, format din cifrele corespunzătoare pentru trei diluții succesive (pentru cazul 2), prima diluție utilizată fiind cea mai concentrată. Numărul este alcătuit din trei cifre și anume: prima cifră reprezintă numărul de eprubete din ultima diluție în care s-a observat creșterea în toate eprubetele înșămânțate, următoarele două cifre reprezintă numărul de eprubete pozitive din următoarele două diluții succesive. Interpretarea acestui test se bazează pe date statistice. Tabelele elaborate dau pentru fiecare număr caracteristic, numărul de celule cel mai probabil dintr-un mililitru din tubul corespunzător primei cifre din numărul caracteristic.

Numărul de microorganisme dintr-un gram sau mililitru din produsul inițial se calculează înmulțind numărul din tabel

(corespunzător cifrei caracteristice) cu coeficientul de diluție corespunzător primei cifre din caracteristică.

Concentrația inițială se calculează ținând cont de diluțiile efectuate. De exemplu, pentru numărul caracteristic 210 (care înseamnă 2 tuburi pozitive pentru cea mai mare densitate de celule, un tub pozitiv pentru cea medie și toate tuburile negative pentru densitatea cea mai mică), în tabel corespunde numărul cel mai probabil de celule 1,5 / ml, care se va înmulți cu coeficientul de diluție. Dacă, de exemplu, diluția a fost 10^{-2} , au fost inițial 150 celule / ml.

În tabelul următor (numit tabelul lui Mac Grady) se prezintă relația între numărul caracteristic corespunzător pentru trei tuburi însămânțate și numărul cel mai probabil de celule:

Număr caracteristic	Număr de celule	Număr caracteristic	Număr de celule	Număr caracteristici	Număr de celule
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

DETERMINAREA BACTERIILOR COLIFORME DINTR-UN PRODUS ALIMENTAR

Pentru a reflecta calitatea microbiologică a produselor alimentare în timpul fabricației, în timpul conservării, cât și pentru a asigura protecția față de microorganismele patogene transmisibile prin alimente, se efectuează analize microbiologice în scopul de a garanta siguranța igienei pentru consum.

Bacteriile coliforme fac parte din categoria microorganismelor **indicatori igienico-sanitari**, fiind bacterii Gram negative nesporulate, aerobe sau facultativ anaerobe, ce pot să se înmulțească în prezența sărurilor biliare, capabile de a fermenta lactoza cu producere de gaze.

Principiul metodei: Metoda pentru determinarea bacteriilor coliforme include teste prezumtive și de confirmare, bazate pe capacitatea bacteriilor coliforme de a fermenta lactoza cu producere de acid lactic, CO₂ și H₂, în timp de 48 ore la 37⁰C.

Testul prezumtiv constă în inocularea probei în mediul nutritiv de îmbogățire cu lactoză, favorabil atât coliformilor cât și altor bacterii capabile să folosească lactoza drept sursă de carbon. Aprecierea probelor pozitive se face fie în funcție de acumularea de gaze în tubul Durham (plutitor), fie ca urmare a modificării pH-ului datorită acumulării de acizi.

Testul de confirmare constă din inocularea culturilor din eprubetele pozitive ale testului prezumtiv, pe medii selective care inhibă dezvoltarea bacteriilor însoțitoare și evidențiază bacteriile coliforme.

Materiale utilizate:

- proba de analizat (apă, carne tocată, produse lactate etc)
- eprubete în care a fost introdus tubul Durham
- bec de gaz
- termostat

- stativ pentru eprubete
- mediul pentru testul prezumtiv:
bulion lactozat - peptonă10g
- NaCl.....5g
- extract de carne.....3g
- lactoză5g
- apă dist.1000ml
- sau mediu Mac Conkey (conform cataloagelor de medii de cultură)
- mediu pentru testul de confirmare - bulion bilă lactoză verde briliant (BLBV) sau
- bulion E.C. (conform catalog)

Mod de lucru: Mediile lichide de cultură se introduc în eprubetele ce conțin tuburile Durham răsturnate, astfel încât să nu rămână aer în acestea, în volum de aproximativ 10 ml, în funcție de grosimea eprubetei. Se sterilizează prin autoclavare, după indicațiile de pe flaconul cu mediu deshidratat.

Din proba de analizat și din diluții decimale succesive se inoculează câte 1 ml în câte 3 eprubete cu mediu pentru testul prezumtiv (ce conțin tuburile Durham inversate) și se incubează 24 - 48 ore la 37°C, după care se citesc rezultatele, conform tabelului de mai sus. Se consideră pozitive eprubetele în care se înregistrează tulburarea mediului de cultură, acumulare de gaz în plutitor (mai mult de 1/3 din volum) și, unde este cazul, virarea indicatorului de pH.

Pentru testul de confirmare, din eprubetele pozitive se recoltează câte o ansă (fir cu buclă) și se face inocularea în mediul pentru confirmare. Se termostatează 48 ore la 37°C, se citesc rezultatele.

După înmulțirea numărului citit în tabel cu factorul de diluție, se obține numărul cel mai probabil de coliformi /g sau ml probă de analizat (**MPN** = most probable number).

EVIDENȚIEREA METABOLISMULUI GLUCIDIC AL MICROORGANISMELOR

Glucidele (monozaharide, dizaharide, polizaharide) pot fi degradate de bacterii urmând una din cele două căi principale: oxidarea (în aerobioză) sau fermentația (în anaerobioză).

Principiul metodei: Metoda se bazează pe virarea culorii unui indicator de pH datorită metabolizării zahărului de către tulpina bacteriană.

Materiale utilizate:

- cultura bacteriană
- eprubete cu dop de vată
- ac de inoculare
- bec de gaz
- baie de apă la fierbere
- parafină sterilă
- mediul de cultură: (se va utiliza mediul Hugh - Leifson)
 - peptonă.....2g
 - extract de drojdie.....1g
 - NaCl.....5g
 - K_2HPO_40,2g
 - albastru de bromtimol.....0,08g
 - agar-agar.....2,5g
 - zahărul adăugat.....10
 - apă distilată.....1000ml
- termostat
- autoclav

Mod de lucru: Mediul de cultură repartizat câte 10 ml în eprubete, se sterilizează separat de glucidul ce trebuie testat, la 121°C timp de 20 minute. Dacă mediul a fost preparat mai înainte, se regenerează prin topire într-o baie de apă la fierbere, se adaugă glucidul ce trebuie testat, după care se solidifică. Se inoculează tuburile prin înțepare în profunzime, până la baza mediului din cultura de studiat.

Pentru fiecare glucid se vor realiza câte două tuburi, din care unul se va acoperi cu un strat de ulei de parafină sterilă (5 mm înălțime).

Tuburile se vor incuba la 30 sau 37°C timp de 48 ore sau mai mult, după care se va observa modificarea culorii mediului de cultură (care a avut inițial culoarea verde), existând următoarele posibilități;

A. Culoare galbenă în ambele tuburi (cu sau fără ulei):

- fermentarea zahărului

B. Culoare galbenă (în suprafață) în tubul fără ulei:

- oxidarea zahărului

Fermentarea unui zahăr poate fi însoțită de o degajare de gaz.

C. Culoare verde în ambele tuburi (cu sau fără ulei):

- zahărul nu a fost metabolizat

D. Culoare albastră în tubul fără ulei și verde în tubul cu ulei:

- alcalinizare datorată utilizării peptonei

STUDIUL EFECTULUI ANTIBIOTICELOR ASUPRA MICROORGANISMELOR

EFECTUAREA ANTIBIOGRAMEI PRIN METODA DISCURILOR

Antibioticele sunt substanțe a căror acțiune antibacteriană se exprimă astfel:

- prin inhibarea multiplicării bacteriilor - efect bacteriostatic
- prin distrugerea bacteriilor - efect bactericid

Evidențierea acțiunii bacteriostatice a unor antibiotice prin metoda discurilor

Principiul metodei: Când un antibiotic este plasat pe suprafața unui mediu de cultură gelozat, în cutii Petri, acesta difuzează după un gradient de concentrație. Bacteria însămânțată nu se va dezvolta la concentrații ale antibioticului superioare unei mărimi numită **C.M.I.** (concentrație minimă de inhibiție). În jurul discurilor de hârtie impregnate cu antibioticul respectiv se vor observa zone concentrice de inhibiție, al căror diametru este dependent de sensibilitatea mai mare sau mai mică a tulpinii testate față de acest antibiotic.

Materiale utilizate:

- cultura bacteriană
- cutii Petri
- discuri de hârtie impregnate cu diferite antibiotice (discurile au un diametru de aproximativ 0,6 cm și sunt inscripționate cu denumirea prescurtată a antibioticului respectiv; concentrația de antibiotic este menționată de obicei de firma producătoare pe ambalaj).
- eprubete cu apă sterilă
- pipete sterile de 5 ml
- bec de gaz

- termostat
- mediul de cultură: agar nutritiv

Mod de lucru: Se sterilizează mediul de cultură și eprubetele cu apă prin autoclavare 20 minute la 121°C, apoi se toarnă în plăcile Petri și se lasă să se solidifice. Se pregătește inoculul prin obținerea unei suspensii de celule bacteriene în apă sterilă, astfel încât concentrația acestuia să fie de $2 - 3 \times 10^6$ UFC/ml. Această concentrație bacteriană trebuie să permită obținerea de colonii conflente pe suprafața mediului de cultură. De asemenea, este indicat ca inoculul să provină dintr-o cultură bacteriană veche de 24 ore, aflată în faza staționară. Însămânțarea mediului de cultură din plăcile Petri se realizează prin “inundarea” întregii suprafețe cu 2 -4 ml din diluția obținută din cultura bacteriană, iar excesul de lichid se scurge prin aspirare cu o pipetă Pasteur. Se aplică apoi discurile de testat fie cu ajutorul distribuitorului automatic, fie cu o pensă (sterilizată prin flambare), în mod aseptice, apăsând ușor pe discuri pentru a asigura aderența la mediu. Acest din urmă procedeu este tot mai rar întrebuintat. Incubarea are loc 16 - 18 ore la 37°C.

Se măsoară diametrul zonei de inhibiție și se compară influența diferitelor antibiotice asupra tulpinii bacteriene testate, menționându-se cel mai eficient antibiotic precum și cel cu acțiunea cea mai slabă.



BIOSINTEZA PE CALE MICROBIANĂ A UNOR COMPUȘI DE INTERES INDUSTRIAL

Microbiologia industrială a devenit o parte importantă a microbiologiei, având ca domeniu de studiu utilizarea microorganismelor în scopul producerii de metaboliți de interes industrial, farmaceutic, agricol, pentru conservarea mediului etc.

Prođușii de origine microbiană sunt clasificați în **metaboliți primari și secundari**. Metaboliții primari sunt reprezentați de compușii aflați în legătură cu sinteza componentelor celulei microbiene, produși cel mai adesea în faza de creștere exponențială sau trofofaza. Aceștia includ aminoacizi, nucleotide, enzime, produși finali de fermentație cum sunt etanolul sau acizii organici.

Metaboliții secundari se acumulează în mediul de cultură în idiofază, adică în perioada următoare fazei de creștere exponențială; aceștia sunt compuși care nu au legătură directă cu creșterea și sinteza de material celular. Din această categorie fac parte cele mai multe antibiotice, micotoxine și coloranți microbieni.

Microorganismele utilizate în aplicațiile industriale sunt cultivate fie în tuburi, în flacoane agitate, în fermentatoare, cu agitare sau static, în medii lichide în submers sau pe medii solide (fermentație pe suport solid). Mediile de cultură utilizate trebuie să aibă un preț de cost cât mai mic, de aceea sunt reprezentate de materii prime, produse, subproduse și deseuri ale industriei agroalimentare, constituind sursa de carbon, de azot, factorii de creștere, care pot fi suplimentate cu săruri minerale.

OBȚINEREA DE ENZIME PECTOLITICE DIN *ASPERGILLUS NIGER*

Substanțele pectice sunt constituenți fiziologici universali ai vegetalelor, alcătuint *lamela mijlocie* care formează legătura dintre celule. Tesuturile parenchimotoase sunt deosebit de bogate în substanțe

pectice: acizi pectinici, acizi pectici și protopectine. Acizii pectinici sunt heteropolizaharide constituite în principal din acizi D-galacturonici, în majoritate sub formă de ester metilic, uniți prin legături α -1,4. Acizii pectici sunt acizi poligalacturonici neesterificați insolubili în apă. Protopectinele, insolubile în apă, stau la originea substanțelor pectice, pe care le eliberează prin hidroliză.

Enzimele care acționează asupra substanțelor pectice se pot încadra în două grupe: enzime depolimerizante și enzime saponifiante. Enzimele pectolitice saponifiante sunt esteraze înalt specifice catalizând demetoxilarea pectinelor prin scindarea legăturilor esterice dintre grupele $-\text{COOH}$ și alcoolul metilic din lanțurile poligalacturonice. Ele se numesc *pectin-metil-esteraze* sau *pectin-esteraze* fiind notate PME sau PE. Enzimele pectolitice depolimerizante catalizează depolimerizarea pectinei.

Preparatele enzimatice comerciale se obțin prin cultivarea tulpinilor selecționate de microorganisme (de obicei *Aspergillus niger*) pe medii de cultură formate din tărâțe de grâu, tăiței de sfeclă de zahăr, morcovi, melasă, tescovină de mere etc.

După dezvoltarea microorganismului și biosinteza enzimelor, mediile de cultură sunt prelucrate după tehnicile cunoscute obținându-se preparate enzimatice pectolitice purificate sub formă de lichid concentrat sau sub formă solidă.

Preparatele enzimatice pectolitice de origine microbiană sunt utilizate în industria sucurilor de fructe, conservelor de legume, vinurilor, produselor zaharoase.

Materiale utilizate:

- tulpina de *Aspergillus niger* producătoare de enzime pectolitice
- flacoane Erlenmeyer de 1500 ml
- ac de inoculare
- apă sterilă
- mediu de cultură: tărâțe de grau cu umiditate de 40 - 50%
- bec de gaz
- termostat

Mod de lucru: Se prepară mediul de cultură conținând tărâțe de grâu și apă de robinet (50% umiditate) și se repartizează câte 100 g în fiecare flacon, după care se sterilizează la 121⁰C, timp de 60 minute. Se inoculează cu 10 ml suspensie de spori de *Aspergillus niger* obținută prin raclarea culturii dintr-un tub de cultură în 10 ml apă sterilă. Mediul nutritiv se omogenizează foarte bine și se incubează la 30⁰C, timp de 5 zile, cu agitare din 24 în 24 de ore. După dezvoltarea completă și sporularea culturii, se efectuează o extracție 1: 3 în apă de robinet, în care se adaugă și câteva picături de Tween pentru umectarea sporilor și optimizarea extracției și se lasă la temperatura camerei 2 ore. Se filtrează mai întâi grosier, apoi pe filtru EK și se poate supune operației de concentrare.

Preparatul enzimatic brut se prezintă ca un lichid transparent, de culoare brună, având, o încărcătura relativ ridicată de conidiospori de *Aspergillus niger*, care poate fi înlăturată prin trecerea pe filtru EK, din azbest.

METODE DE OBȚINERE A PREPARATELOR MICROBIENE PENTRU ANALIZĂ

Celula microbiană reprezintă din punct de vedere biologic un complex de structuri chimice organice, anorganice și biologice astfel organizate încât să-i asigure o perfectă funcționare.

Pentru a putea fi analizată din punct de vedere chimic și biologic, celula microbiană trebuie supusă unor fenomene de distrucție mai mult sau mai puțin pronunțate astfel încât unii sau principalii componenți ai săi să fie puși în libertate din propria structură. Ca urmare a acestor fenomene de distrucție se va obține un preparat microbial de analiză din care se pot separa și analiza anumiți componenți structurali ai săi.

Orice metodologie de obținere a unui preparat microbial pentru analiză cuprinde două etape:

1. Etapa de obținere a culturii microbiene cu o compoziție chimică cât mai completă
2. Etapa de pregătire a culturii microbiene pentru analiză sau etapa de obținere a preparatului microbial de analiză.

Obținerea culturii microbiene

Cultura microbiană se obține prin metodele microbiologice în sine cunoscute, mărindu-se pe parcursul dezvoltării rata ei de creștere și modul de utilizare a diferitelor surse nutritive. Cultura va fi condusă până atinge 2/3 din faza exponențială după care este oprită și folosită la obținerea preparatului microbial.

Obținerea preparatului microbial pentru analiză

Obținerea preparatului microbial pentru analiză se face în funcție de scopul urmărit, metodele de obținere diferind în funcție de analiza la care este supus. Există mai multe metode de obținere a unui preparat microbial de analiză. Ele se pot grupa în:

- A. Metode fizice
- B. Metode chimice
- C. Metode biologice sau enzimatic.

A. Metode fizice.

În categoria lor intră toate acele metode prin care se urmărește dezintegrarea totală sau parțială a celulei microbiene. cele mai folosite metode ce intră în această categorie sunt:

1. Metode mecanice
2. Metode ce vizează modificarea presiunii osmotice
3. Metoda ultrasonării
4. Metode de congelare
5. Metode termice

Metode mecanice

Metodele mecanice sunt acele metode prin care se urmărește distrugerea parțială a unei structuri celulare sub acțiunea unor forțe mecanice de distrucție. o metodă larg utilizată este metoda mojarării. Această metodă constă în realizarea unor forțe de frecare care iau naștere între celula microbiană și unele materiale dure (nisip, cuarț, sticlă pisată) care nu modifică compoziția chimică a celulei. Mojararea se poate realiza în dispozitive speciale sau în mojarale obișnuite de laborator.

Metode ce vizează modificarea presiunii osmotice

Această metodă nu se poate folosi decât într-un număr limitat de lucrări de biologie moleculară, deoarece substanțele utilizate pentru modificarea presiunii osmotice pot schimba compoziția chimică a celulei. Metoda este totuși larg utilizată în lucrările de cercetare din domeniul geneticii moleculare. Ea constă în tratarea celulei microbiene cu substanțe ce determină o creștere a presiunii osmotice celulare care la rândul său va duce la cedarea unor structuri celulare membranare și punerea în libertate a unor constituenți celulari. Metoda se aplică cu succes la obținerea de protoplaști, în acest caz celula microbiană trebuie tratată cu substanțe care determină distrugerea totală sau parțială a peretelui celular. În această situație celula microbiană trebuie înglobată în substanțe care să-i asigure o cât mai bună stabilitate osmotică. Se folosesc în general soluții de concentrații cuprinse între

0,3-0,5M de glucoză, rafinoză, trehaloză, malebioză, zaharoză, citrat de sodiu. În ultimul timp s-a constatat că polietilenglicolul cu greutate moleculară 4000 este un bun stabilizator osmotic.

Metode de ultrasonare

Distrucția celulei microbiene prin ultrasonare se face cu aparate de ultrasunete, cu ajutorul cărora datorită vibrațiilor acustice de înaltă frecvență legăturile chimice dintre principalii componenți moleculari sau celulari sunt distruse ireversibil. În felul acesta unii componenți celulari sau moleculari pot fi analizați.

Metode de congelare

În vederea distrucției celulei microbiene se folosesc în general metode de congelare lentă, procedeu prin care are loc trecerea apei libere din formă lichidă în formă solidă cu formare de cristale. Cristalele formate vor determina distrugerea celulei și eliberarea unor componenți structurali ai săi.

Metode termice

Această categorie de metode au o largă utilizare în analiza unor bioelemente celulare. Pentru punerea lor în libertate din complexe moleculare, celula trebuie supusă unor procese avansate de distrucție. Aceasta se realizează prin supunerea ei unor temperaturi înalte prin care și cele mai solide legături intermoleculare și interatomice sunt distruse. În felul acesta fiecare element chimic component va putea fi regăsit în reziduul rămas după acțiunea temperaturilor înalte. O metodă larg utilizată este **calcinarea**.

B. Metode chimice de distrucție celulară

În această categorie intră toate metodele prin care celula microbiană, în vederea distrucției, este supusă acțiunii unor factori chimici nocivi ce conduc la dezintegrarea sa structurală sau/și moleculară. Substanțele chimice utilizate frecvent în distrugerea celulei microbiene pot fi:

- acizi sau baze tari
- substanțe chimice cu acțiune deproteizantă: etilendiaminotetraacetatul (EDTA), fenolii sau acidul tricloracetic (ATC)

C. Metode biologice

Acestea sunt metodele cu ajutorul cărora se urmărește ruperea unor legături chimice de la nivelul unor suprastructuri, în special de la nivelul peretelui celular și a membranei plasmatică. Cea mai folosită metodă, în acest sens, este metoda lizozimului. Lizozimul este o enzimă ce are proprietatea de a hidroliza legăturile dintre acidul N-acetilmuramic și N-acetilglucozamină. Ca urmare a hidrolizei acestor legături, la nivelul peretelui celular apar unele discontinuități structurale ce fac ca unele componente moleculare ale spațiului periplasmatic, în special protein-enzime să fie eliberate în mediul extracelular.

Toate aceste metode se pot folosi fie singular fie în combinație. de exemplu, în cazul determinării unor bioelemente celulare se poate folosi numai metoda calcinării, pe când în cazul izolării ADN-ului se va folosi o gamă largă de metode: fizice – ultrasonarea, chimice – tratarea cu fenol și EDTA și biologice – metoda lizozimului.

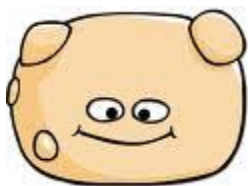
Cultivarea levurii *Saccharomyces cerevisiae*

Mediu de cultură:

1. extract de malț – 3 g/l
2. extract de drojdii – 3 g/l
3. peptonă – 5 g/l
4. glucoză – 10 g/l
5. apă de canal – 1000 ml

pH = 5,5

sterilizare 20 minute la 120°C

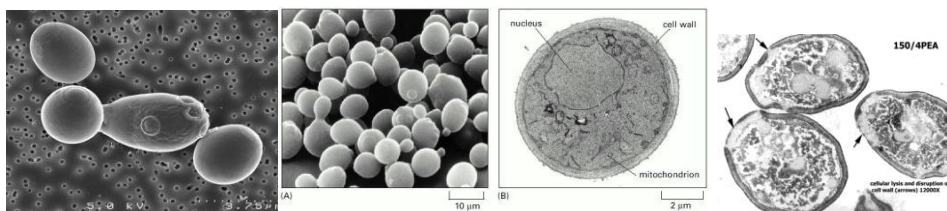


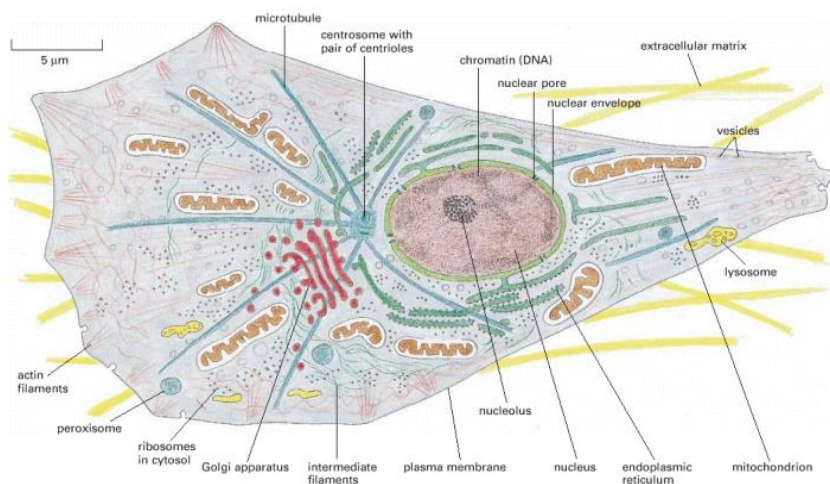
Drojdia *S.cerevisiae* este unul dintre cele mai simple organisme eucariote, cu o marime a genomului doar de trei ori mai mare decăt al bacteriei *E.coli*. Metabolismul acestei drojdii este extrem de adaptabil, ea fiind capabila sa creasca pe o varietate foarte mare de substraturi, in conditii favorabile putand creste in prezenta unor concentratii mari de etanol.

Drojdiiile din genul *Saccharomyces* prezintă celule de formă variată: rotundă, ovale, alungite, cilindrice, care uneori formează pseudomicelii și se înmulțesc pe cale vegetativă prin **înmugurire multilaterală și sexuat prin spori**. În condiții naturale, celula diploidă se transformă în urma diviziunii meiotice într-o ască cu patru ascospori - 2α și $2s$. Pe mediu nutritiv complet sau în condiții optime de hrană în natură, între spori sau celule vegetative se realizează conjugarea, rezultând zigotul diploid.

Saccharomyces cerevisiae izolată din bere sau din vin, după cultivarea pe extract de malț timp de 3 zile, se prezintă sub forma unor celule sferice, elipsoidale, cilindrice, alungite, dispuse izolat sau în perechi și ocazional formează lanțuri și aglomerări. Celulele de *S. cerevisiae* se încadrează în 3 grupe de dimensiuni: în prima grupă sunt încadrate celulele cu dimensiuni:

1. $4,5 - 10,5 \times 7 - 21$ mm,
2. $2,5 - 7 \times 4,5 - 11 - 18,5$ μm ,
3. $3,5 - 8 \times 5 (11,5) - 17,5$ μm





Noțiunea de component celular are o semnificație largă, ea desemnând atât structurile celulare organizate, cu semnificație funcțională (organite celulare), substanțele de rezervă și depozit ale celulei (incluziuni celulare), cât și macromoleculele, micromoleculele și ionii ce definesc compoziția chimică a celulelor. Separarea componentelor celulare reprezintă atât un scop experimental în sine, dar este și o etapă inițială și obligatorie necesară studiului ulterior al acestor componente, prin variate mijloace de investigație.

În vederea determinării bioelementelor cultura de *Saccharomyces cerevisiae* obținută se centrifughează pentru a îndepărta supernatantul. Centrifugarea este o metodă mecanică clasică de separare a componentelor celulare.

Metode de determinare a bioelementelor celulare

În celulă bioelementele se găsesc în concentrații variabile, dar dispuse în limite specifice fiecărui microorganism în parte. Determinarea lor se poate face prin metode diferite, dar exprimarea concentrației lor foarte exacte este greu de realizat, indiferent de acuratetea metodei.

Orice metodă de determinare a bioelementelor celulare se poate realiza prin parcurgerea mai multor etape care se succed în mod obligatoriu și logic. Într-o primă etapă se vor aplica metodele de obținere a materialului necesar determinărilor. Această categorie de metode urmăresc transformarea materiei vii în materie moartă. Transformarea se poate realiza prin procedee de **calcinare** la temperaturi înalte (600°C).

Într-o etapă următoare, materia moartă obținută prin calcinare va fi supusă diferitelor metode de analiză prin care se vor evalua principalele bioelemente și se va raporta conținutul lor la cantitatea de material celular luat în lucru.

Transformarea materiei vii în materie moartă prin metoda calcinării

Prin această metodă se urmărește transformarea treptată a masei celulare în cenusă, prin expunerea ei succesivă la temperaturi înalte. În cazul în care nu se urmărește în paralel și determinarea substanțelor ușor volatile, materia vie va fi supusă în mod simplu calcinării și carbonizării până la obținerea unei cenușe ca produs rezidual al calcinării.

Tehnica de calcinare

Masa microbiană obținută prin metoda centrifugării este cântărită cu exactitate în creuzete de calcinare



(care în prealabil au fost uscate la 105°C) după care este introdusă în cuptorul de calcinare. Se pornește cuptorul și se urmărește calcinarea. Pe parcursul procesului au loc o serie de transformări ale biomasei, în strânsă legătură cu modificările sale chimice ca urmare a creșterii energiei termice.

După încheierea calcinării care trebuie să dureze aproximativ 2 h la 600°C, se oprește aparatul, se lasă să se răcească, se scoate creuzetul, se introduce în exicator, se cântărește și se face diferența între masa microbială vie și cea calcinată. Cenușa rezultată se va folosi la determinarea bioelementelor.

Determinarea manganului Mn^{2+}

Determinarea manganului se poate face prin diferite metode chimice sau flamfotometrice.

Metode chimice de determinare a manganului (Mn^{2+})

Metoda chimică de determinare a manganului din cenușa rezultată de la calcinarea masei microbiene este o metodă spectrofotometrică. Mn^{2+} după extracție din masa microbială este supus unei reacții de oxidare în prezența persulfatului de amoniu. Ca urmare a acestei reacții are loc oxidarea Mn^{2+} la MnO_4^- în prezența ionului de argint (Ag^+) drept catalizator de reacție.

Reactivi necesari:

1. Soluție de HNO_3 2%
2. Soluție de HNO_3 concentrată
3. Soluție de azotat de argint 3%
4. Soluție de persulfat de amoniu 20%
5. Soluție etalon de $KMnO_4$ 0,001N (1ml $KMnO_4$)

Mod de lucru

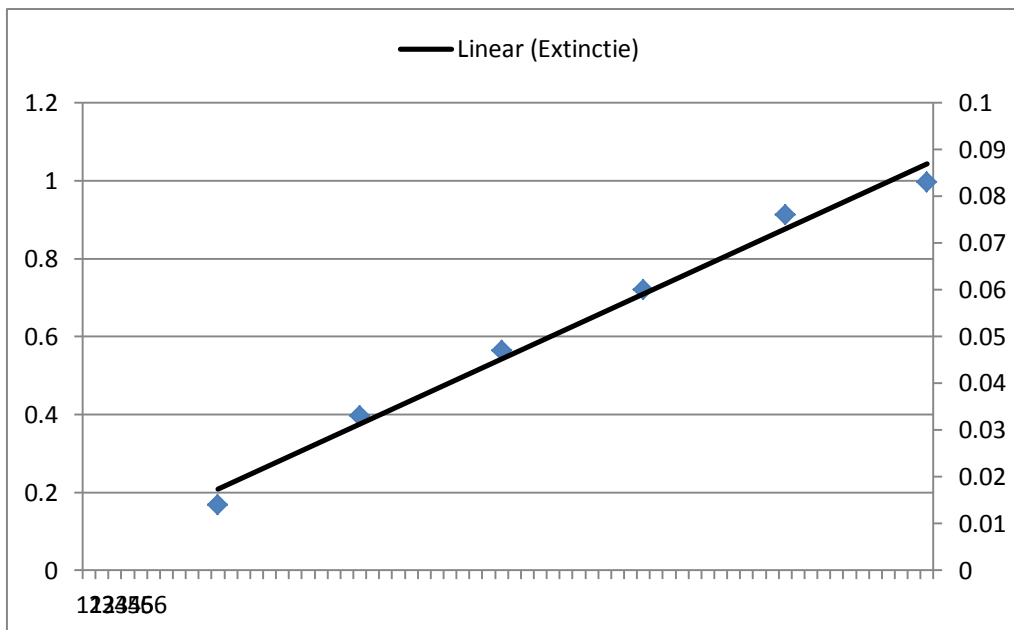
Într-o capsulă de cântărire se introduc 0,01 g cenușă, după care se adaugă câțiva mililitri de HNO_3 conc. și se evaporă la sec. Operația se repetă de 2-3 ori. După ultima repetiție, se adaugă la conținutul din

creuzet 10 ml HNO_3 2%, se amestecă bine și conținutul se filtrează într-o eprubetă gradată al cărei volum trebuie să fie aproximativ 30 ml. Se spală creuzetul de 3-4 ori cu mici cantități de HNO_3 2% care se vor filtra și ele. Volumul total din eprubetă nu trebuie să depășească 15 ml. La conținutul din eprubetă se adaugă apoi 0,5 ml AgNO_3 3% și 3 ml soluție persulfat de amoniu 20%. Se agită bine probele și se introduc la baia de apă pentru fierbere timp de 15 minute, timp în care opalescența trebuie să se reducă sau să dispară. Se scot probele de la baie, se lasă să se răcească, după care se completează volumul la 20 ml cu apă distilată. Probele se analizează la 540 nm, iar rezultatele se prelucrează utilizând curba etalon.

Curba etalon se obține prin determinarea extincției probelor de Mn^{2+} de diferite concentrații, conform tabelului:

KMnO_4 , ml	AgNO_3	Persulfat de amoniu	H_2O , ml
0	0,5	3	16,5
1	0,5	3	15,5
2	0,5	3	14,5
3	0,5	3	13,5
4	0,5	3	12,5
5	0,5	3	11,5
6	0,5	3	10,5
7	0,5	3	9,5

Probele astfel obținute se fierb timp de 15 minute, se răcesc și se determină extincția. Cu rezultatele obținute se reprezintă curba etalon.



Curba etalon pentru Mn²⁺

Determinarea fierului (Fe²⁺ și Fe³⁺)

Determinarea fierului se poate face spectrofotometric prin metoda cu tiocianat de amoniu. Determinarea implică două operații:

1. Determinarea fierului total
2. Determinarea fierului feric

1. Determinarea fierului total.

Se face spectrofotometric sub formă de sulfocianură ferică, de culoare roșie extractibilă în acetat de etil.

În prima fază, ionul fier feros (Fe²⁺) este oxidat, cu apă oxigenată la fier feric (Fe³⁺). În faza următoare, ionul Fe³⁺, reacționează cu SCN⁻, formându-se sulfocianura ferică de culoare roșie, care este extrasă cantitativ în acetat de etil. Determinarea concentrației se realizează spectrofotometric.

Reactivi necesari:

1. Apă oxigenată
2. Soluție de HCl 5%
3. Soluție sulfocianură de amoniu 20%

4. Soluție etalon de fier. Se prepară în modul următor: se cântărește 0,8635 g $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (alaun feriamoniacal), se dizolvă în apă într-un balon cotat de 1000 ml, se adaugă 1 ml HCl conc. și se aduce la semn cu apă distilată. Din această soluție se iau 10 ml și se diluează la 100 ml (1 ml = 0,01 ml Fe).

Modul de lucru

a.) Pentru fierul total

Cenușa rezultată la calcinarea masei microbiene (o cantitate determinată 1-10 mg) se tratează cu câteva picături de apă oxigenată și se recalcează ușor la flacără. se reia apoi reziduul cu 4 ml HCl 5%, exact măsuțați și se filtrează printr-un filtru cantitativ uscat. 2 ml din filtrat se introduc într-o pâlnie de separare, în general, de volum mic, la care se adaugă

- 3 ml apă distilată
- 1 ml sulfocianură de amoniu 20%
- 5 ml eter acetic

Se agită ușor și cu atenție pâlnia pentru separarea straturilor, stratul apos se trece în altă pâlnie identică în care se adaugă 3 ml eter acetic, după care se procedează ca mai sus.

Soluția eterică se va aduce cantitativ într-o eprubetă gradată. Dacă extracția nu este definitivată se va mai repeta operația încă o dată. Volumul din eprubetă se completează cu eter acetic până la 10 ml, se omogenizează și se analizează spectrofotometric.

b.) Pentru fierul feric

Se va proceda în felul următor: într-o pâlnie de separare se pun 10-25 ml extract la care se adaugă

- 2 ml HCl 5%
- 1 ml sulfocianură de amoniu 20%

5 ml eter acetic

În continuare se procedează ca mai sus.

c.) Fierul feros se obține din diferența dintre cele două determinări a-b.

Curba etalon

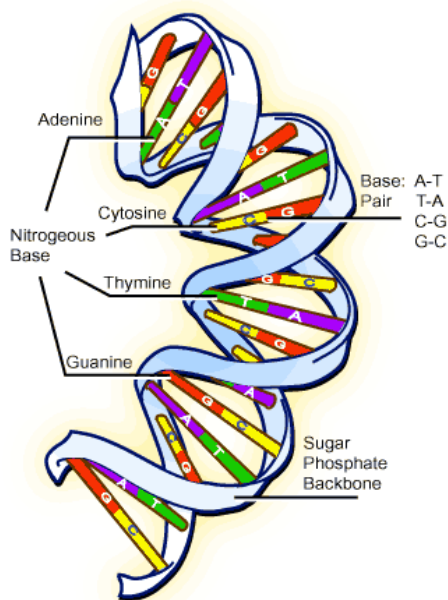
Într-un număr de eprubete gradate (5-6) se introduc cantități diferite de soluții etalon: 0,5; 1; 2; 3; 4; 5, după care volumul se aduce la 10 ml cu apă distilată. Probele se citesc la spectrofotometru la lungimea de undă

L3 Metode de izolare și determinare a biomoleculor celulare

1. Determinarea ARN-ului celular

Acidul ribonucleic (ARN) este, ca și ADN-ul, un polinucleotid format prin copolimerizarea ribonucleotidelor.

Un ribonucleotid este format dintr-o bază azotată (adenină A, guanină G, uracil U și citozină C), o pentoză (riboză) și un fosfat. ARN-ul are ca rol transportul și poziționarea aminoacizilor în cadrul sintezei proteice. Există mai multe metode și procedee de determinare a ARN-ului celular, cele mai multe dintre ele sunt metode indirecte care constau în determinarea conținutului de riboză din molecula de ARN.



1. Determinarea ARN-ului prin dozarea conținutului de riboză

Reactivi necesari:

1. Soluție standard de riboză 0,1% (0,1 g riboză la 100 ml apă distilată)
2. Soluție acid tricloracetic 5%
3. Soluție acid tricloracetic 10%
4. Soluție de clorură ferică 0,1% (se prepară în HCl conc)

5. Soluție orcinol 0,01 g/ml (se dizolvă orcinol cristal în alcool etilic 95%; se prepară în momentul executării experimentul)

Modul de lucru

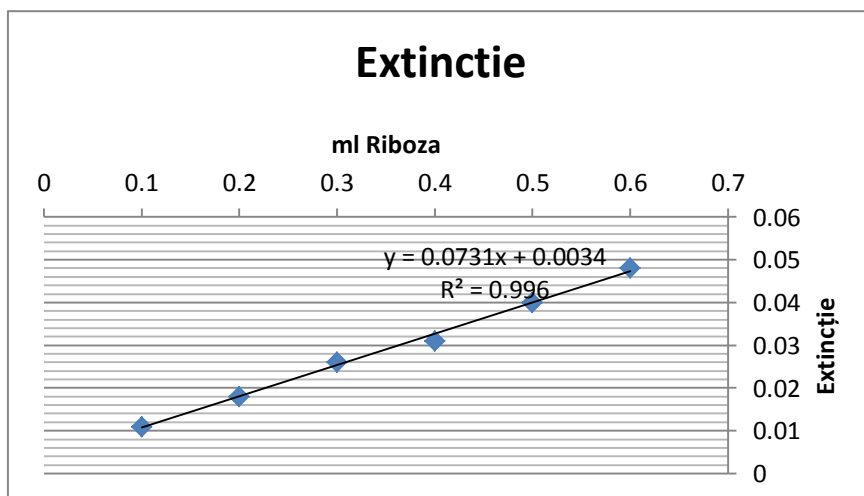
1. Construirea curbei etalon

1 ml soluție standard de riboză se dizolvă în apă bidistilată la 25 ml (pentru a se obține o soluție de lucru în concentrație de 40 γ /ml.

Se pipetează apoi într-o serie de eprubete câte: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 și 0,6 ml soluție standard de lucru ce vor conține 4; 8; 12; 16; 20 și 24 γ /ml riboză.

Se aduc volumele din eprubete la 1,5 ml cu apa distilată, apoi se adaugă în fiecare eprubetă câte 1,5 ml clorură ferică în acid clorhidric, apoi câte 0,15 ml orcinol. Se agita bine conținutul eprubetelor. Se introduc la baie de apă pentru 30 de minute (în acest moment are loc coagularea conținutului eprubetelor), se răcesc și se determină densitatea optică la 670 nm.

Pentru proba martor se pregătește o eprubetă cu toți reactivii cu excepția soluției de riboză care va fi înlocuită cu 1,5 ml apă distilată. Rezultatele probelor redacte de extincția citită la spectrofotometru se vor folosi la construirea curbei etalon.



Curba etalon ARN

2. Dozarea ARN-ului celular

a. Obținerea preparatului de ARN. Se face prin dezintegrarea celulelor cu ATC (acid tricloracetic)

Pentru obținerea preparatului de ARN se procedează astfel:

Dintr-o cultură relativ tânără (aproximativ 18-24 de ore) se ia 1 ml lichid de cultură care se introduce într-o eprubetă de centrifugă la care se adaugă 3 ml ATC 10%. Se agită bine aproximativ 5-10 minute la 3000 rpm, apoi se centrifughează timp de 10 minute la 3000 rpm. Se îndepărtează supernatantul, iar la conținutul rămas în eprubetă se adaugă 1,5 ml ATC 5% și se agită bine conținutul după care se introduce în baia de apă la 90° C timp de 15 minute. Se scot probele de la băi și se răcesc la temperatura camerei, după care se centrifughează timp de 10 minute la 3000 rpm. Supernatantul rezultat se preia și se folosește la dozarea ARN-ului.

b. Dozarea propriu-zisă

Pentru dozarea ARN-ului se procedează în felul următor: într-o eprubetă se introduc 0,1 ml supernatant; 1,5 ml FeCl₃ 0,1%; 0,15 ml orcinol soluție și se agită probele bine. Se introduc pe baia de apă la fierbere timp de 30 minute, apoi se răcesc la temperatura camerei și se determină densitatea optică la 670 nm. Proba martor se pregătește în paralel cu proba de cercetat în felul următor: Într-o eprubetă se introduc reactivii folosiți la obținerea probei de cercetat cu excepția supernatantului care se înlocuiește cu 0,1 ml apă distilată. Celelalte operații vor fi similare probei de cercetat. Se citesc probele la spectrofotometru la lungimea de undă 670 nm. Rezultatele obținute pentru ambele probe se vor folosi la calcularea rezultatelor.

c. Prelucrarea rezultatelor

Se calculează mai întâi diferența dintre cele două probe:

$$A = P_c - P_m$$

Apoi se calculează cantitatea de ARN exprimată în γ ARN/ml

$$\gamma \text{ ARN/ml} = 75 \times A \times 4$$

în care 75 – factorul de diluție al probelor

A – diferența rezultată din citirea probelor

4 – raportul riboză/ARN (1/4)

Schema de lucru

Pentru curba etalon

Reactivul	P _m	Probe cercetat					
		I	II	III	IV	V	VI
Riboză diluată, ml	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Apă distilată, ml	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	1,0	0,9
FeCl ₃ , ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Orcinol, ml	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
Agitare – Omogenizare							
Fierbere 30 minute							
Răcire la temperatura camerei							
Citirea la lungimea de undă 670 nm							
Construirea curbei etalon							

Pentru dozarea ARN-ului

Reactivi	P _m	P _c
Supernatant, ml	-	0,1
Apă distilată, ml	1,5	1,4
Clorură ferică, ml	1,5	1,5
Orcinol, ml		
Agitare – Omogenizare		
Fierbere 30 minute		
Răcire la temperatura camerei		
Citirea la lungimea de undă 670 nm		
Extrapolarea pe curba etalon		
Calculul rezultatelor		

Metode de evaluare a proceselor respiratorii celulare

Respirația celulară reprezintă totalitatea proceselor de oxido - reducere care au loc la nivelul unor compartimente celulare specializate (în general, mitocondrii), procese care furnizează cea mai mare parte a energiei necesare desfășurării activităților celulare vitale.

La organismele aerobe, respirația se desfășoară în două etape distincte:

1. etapa **anaerobă** - în care substraturile nutritive sunt descompuse până la produși intermediari de catabolism (această etapă este asimilată frecvent cu glicoliza anaerobă, sau, în unele cazuri, cu procesul de fermentație); randamentul energetic al respirației anaerobe este relativ scăzut;

2. etapa **aerobă** - prin care produșii intermediari rezultați din prima etapă sunt transformați în produși finali de catabolism (apă și dioxid de carbon), prin parcurgerea etapelor de reacție ale ciclului Krebs și ale lanțului transportorilor de electroni; randamentul energetic al acestei etape este superior față de cel al respirației anaerobe.

Aprecieri asupra modului de desfășurare a proceselor respiratorii celulare se pot face prin metode directe sau indirecte. Metodele directe urmăresc determinarea cantității de oxigen consumată într-un proces respirator, prin măsurarea sa directă. O metodă larg utilizată este metoda Warburg.

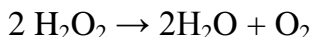
Deoarece aprecierea intensității respirației celulare, prin investigarea tuturor reacțiilor bio-chimice care o caracterizează, este dificil de realizat, determinarea acestui proces se face în mod curent prin măsurarea manifestărilor sale exterioare, în mod frecvent a schimburilor de gaze dintre celule și mediu (consumul de O_2 sau eliminarea de CO_2), într-o unitate determinată de timp.

Evaluarea proceselor respiratorii celulare se poate face și în mod indirect prin aprecierea și determinarea cantității de apă oxigenată rezultată din proces, care la rândul său poate fi urmărită prin urmărirea activității unei enzime responsabilă de hidroliza apei oxigenate și anume *catalaza*.

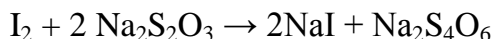
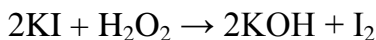
Determinarea activității catalazei

Principiul metodei

Catalaza este o enzimă cu rol important în îndepărtarea apei oxigenate din celulă, prin descompunerea peroxidului de hidrogen conform reacției:



Pentru determinarea ei se pot utiliza diferite metode: metoda cu permanganat, cu tiosulfat de sodiu, etc. Cea mai practică este metoda iodometrică cu tiosulfat de sodiu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Conform acestei metode în mediul acid, apa oxigenată rămasă nedisociată ca urmare a întreruperii acțiunii catalazei, oxidează iodura de potasiu conform reacției:



Activitatea catalazei se exprimă în mg H_2O_2 descompuși în unitatea de timp. Se consideră ca unitatea catalazică acea cantitate de enzimă care descompune un mol de apă oxigenată la $T = 20^\circ\text{C}$ în timp de 5 minute. Ca unitate catalazică se poate folosi și exprimarea în $\mu\text{moli H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ proteina, în care caz trebuie determinate și proteinele solubile din lichidul a cărui procese respiratorii sunt urmărite. Pe baza lor se calculează activitatea specifică a enzimei care se redă în $\mu\text{moli H}_2\text{O}_2/\text{mg}$ proteină.

Reactivi necesari

1. Soluție tampon fosfați de sodiu 0,01 M pH 7,0

Se obține din două substanțe: fosfat monosodic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), $\text{GM} = 156,06$ și fosfat disodic ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), $\text{GM} = 358,24$.

a) Pentru obținerea soluției tampon 0,2 M de fosfați de sodiu se cântăresc 12,172 g NaH_2PO_4 și 43,705 g Na_2HPO_4 și se dizolvă în apă

bidistilată la balon cotat de 1 000 ml. După dizolvare, se completează volumul la semn. Din această soluție se va pregăti soluția de 0,01 M.

b) Prin pregătirea separată a fiecărei din cele două soluții 0,2 M se vor folosi calculele din exemplul anterior și se vor pregăti separat cele două soluții respectiv 390 ml soluție fosfat monosodic și 610 ml soluție fosfat disodic care se vor amesteca obținându-se 1 000 ml soluție tampon fosfați de sodiu 0,2 M din care se va pregăti soluție de tampon fosfați de sodiu 0,01 M.

Se măsoară 10 ml din soluția tampon fosfați de sodiu 0,2 M și se dizolvă în 190 ml apă bidistilată obținându-se 200 ml tampon fosfați de sodiu 0,01 M.

2. Soluție de H₂O₂ 3%

Se prepară din apă oxigenată 3 % astfel: se măsoară 9 ml apă oxigenată și 81 ml apă distilată și se amestecă într-un vas obținându-se 90 ml apă oxigenată 3%.

3. Soluție acid sulfuric 10%

Într-un flacon cotat de 100 ml se pun 90 ml apă distilată la care se adaugă picătură cu picătură 10 ml H₂SO₄ concentrat.

4. Soluție iodură de potasiu (KI) 10%

Se cântăresc 10 g KI se introduc într-un flacon cotat de 100 ml se dizolvă și se aduce volumul la semn cu apă distilată.

5. Soluție molibdat de amoniu 1 %

Se cântărește 1 g molibdat de amoniu și se trece într-un flacon cotat de 100 ml, se adaugă apoi apă distilată, se dizolvă și se completează la semn cu apă.

6. Soluție de amidon 1%

1g de amidon se suspendă în 10 ml de apă distilată într-un pahar Berzelius de 50 ml. În alt vas se fierb 90 ml apă distilată, iar când aceasta a ajuns la fierbere se adaugă suspensia din primul vas amestecându-se continuu, după care se fierbe în continuare 3-5 minute. Se răcește și se poate folosi în lucru.

7. Soluție de tiosulfat de sodiu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) N/50 sau 0,02 N

Echivalentul gram a tiosulfatului:

$$E_g = 248,25$$

Din soluția de tiosulfat de sodiu N/10 se iau 200 ml scare se introduc într-un flacon cotat de 1 000 ml și se adaugă 800 ml apă distilată.

Modul de lucru

Determinarea catalazei se poate face atât pe lichidul de cultură rezultat de la separarea biomasei (supernatant) cât și pe masa lor microbiană.

În cazul în care se utilizează și biomasa, aceasta este mai întâi dezintegrată mecanic prin mojarare cu nisip cearșos sau cu sticlă pisată, după care se face extracția enzimei. Extracția enzimei se face în apă distilată. Procedura este următoarea: mai întâi se cântărește masa microbiană după care se adaugă o cantitate aproximativă de nisip sau sticlă pisată și se supune operației de mojarare într-un mojar de laborator. Operația de mojarare se continuă până când se obține o pastă fină. Se adaugă apoi mici cantități de apă și se continuă mojararea după care amestecul se filtrează prin hârtie de filtru. Filtratul obținut se folosește la determinarea activității enzimei.

În cazul în care se folosește supernatantul acesta nu necesită pregătiri prealabile, ci se folosește așa cum a rezultat de la separarea de masa microbiană.

Determinarea activității catalazei în ambele cazuri se face în felul următor:

Se vor pregăti în paralel două probe: proba martor (PM) și proba experimentală (PE). Probele se vor executa în flacoane Erlenmeyer de 100 ml sau în baloane de 100 ml.

Pregătirea lor se poate face după următoarea schemă de lucru:

PM	PE
6 ml tampon fosfați de sodiu 0,5 – 2 ml filtrat sau extract sau extract enzimatic 5 ml H₂SO₄	6 ml tampon fosfați de sodiu 0,5 – 2 ml filtrat sau extract sau extract enzimatic 0,2 ml H₂O₂ 3 %
Se lasă probele în repaos 5 minute și se agită periodic	
0, 2 ml H₂O₂ 3 %	5 ml H₂SO₄
4 ml KI	4 ml KI
2 picături de amidon	2 picături de molibdat de amoniu
Titrare cu tiosulfat de sodiu până la culoarea galben pai	
2-3 picături de amidon	2-3 picături de amidon
Se continuă titrarea până la decolorarea completă a probelor	
Citirea cantității de tiosulfat folosită la titrarea fiecărei probe	
Calculul rezultatelor	

Calculul rezultatelor

Se face aplicând următoarea formulă de calcul:

$$\text{mg H}_2\text{O}_2 / \text{ml} / 5' = (n_1 - n_2) \cdot F \cdot 0,34$$

Unde:

n_1 = ml tiosulfat folosiți la titrarea probei martor

n_2 = ml tiosulfat folosiți la titrarea probei experimentale

F = factorul soluției de tiosulfat de sodiu (se ia 1)

0, 34 = mg H₂O₂ ce corespund 1 ml de Na₂S₂O₃ .

În cazul în care se dorește obținerea rezultatelor în μM H₂O₂/ml sau g/min se va aplica următoarea formulă:

$$\mu \text{ M H}_2\text{O}_2 / \text{ml} / \text{min} = \frac{(n_1 - n_2) \cdot F \cdot 0,34}{V \cdot 0,034 \cdot 5}$$

În care: V= volumul supernatantului luat în lucru;
0,034 = factorul de conversie la μM

Pentru extractul de biomasă:

$$\mu \text{ M H}_2\text{O}_2 / \text{g} / \text{min} = \frac{(n_1 - n_2) \cdot F \cdot 0,34}{V \cdot 0,034 \cdot 5}$$

În care: V= volumul extractului luat în lucru;
0,034 = factorul de conversie la μM

Aspecte privind energetica celulară și moleculară

Determinarea activității ATP-azei

La nivelul celulei microbiene ATP-aza joacă un rol important în biosinteza ATP-ului cu structură moleculară macroergică primordială. Prin acțiunea ei se crează acea stare specifică la nivelul celulei prin care protonii rezultați din procedeele de fosforilare oxidativă ce au loc de-a lungul lanțului respirator sunt implicați în formarea energiei celulare ce se stochează în molecula de ATP:

ATP-aza este o proteină membranară ce joacă rol important în crearea forței protonmetrice de pompare a protonilor în celulă și de sinteză a ATP-ului.

Determinarea activității ATP-azei are la bază reacția de culoare pe care o da radicalul PO_4 . În prezența acidului ascorbic cu acetatul de sodiu și molibdatul de amoniu.

Evidențierea activității ATP-azei

Reactivi:

1. Soluție ATP 20 M. Se prepară în momentul utilizării, în apă bidistilată, la pH 7-7,3 (se cercetează dacă este nevoie de NaOH 1N).
2. Soluție EDTA 3mM
3. Soluție tampon Tris (GM = 121,14) – HCl, pH 7,36 (la 23°). Se prepară amestecând 25 ml soluție Tris 0,2 M cu 42,5 ml soluție HCl 0,1 N, după care se completează volumul la semn cu apă bidistilată.
4. Soluție $MgCl_2$ 60 mM
5. Soluție NaCl 100 mM
6. Soluție KCl 20 mM
7. Soluție ATC 40%.

Obținerea centrifugatului celular și dozarea enzimei

2 g masă microbiană se mojarază cu nisip ceartșos în prezența a 1 ml soluție EDTA 3mM, timp de 10 minute. La omogenat se adaugă 2 ml tampon Tris-HCl și se centrifughează timp de 10 minute la 2100- 2500 rpm. Supernatantul rezultat din centrifugare se transvazează într-o eprubetă gradată și se completează volumul la 4 ml cu soluție tampon Tris- HCl, apoi se agită cu atenție.

În eprubete pregătite în prealabil se efectuează probele după schema:

Reactivi (ml)	ATP-ază				Contr ol reacti vi	Fosfat anorgan ic	Observa ții
	Mg ²⁺		K ⁺ Na ⁺				
	Contr ol	Cercet at	Contr ol	Cercet at			
1	2	3	4	5	6	7	8
Tris- HCl	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	
MgCl ₂	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
NaCl	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	
KCl	0,1	0,1	-	-	0,1	0,1	
ATP	-	0,3	-	0,3	0,3	-	
Prepara t enzimat ic	0,8	0,8	0,8	0,8	-	-	
Apă bidistila tă	-	-	0,2	0,2	0,8	1,10	
Incubare 30 minute la 35° C							
ATC	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
40% ATP	0,3	-	0,3	-	-	-	
Filtrare pe hârtie de filtru							

După scoaterea de la termostat probele se introduc într-o baie cu gheață și se adaugă reactivii indicați în tabel (ATC) pentru întreruperea

reacției și ATP. Volumul probelor de control și de cercetat trebuie să fie în final de 2ml. Filtratul obținut se folosește la dozarea fosforului anorganic.

Dozarea fosforului anorganic

Reactivi:

1. Tampon acetat pH 4

41 ml soluție de acid acetic 0,2 M se amestecă cu 9 ml acetat de sodiu 0,2 M. Se completează volumul la 100 ml cu apă distilată.

- Soluția de acid acetic 0, 2M se prepară în felul următor: 11,55 ml acid acetic glacial se dizolvă în 1000 ml apă distilată la balon cotat.

- Soluția de acetat de sodiu 0,2 M se prepară în felul următor: 27, 2178 $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se dizolvă în 1 000 ml distilată la balon cotat.

2. Soluție molibdat de amoniu 1% în H_2SO_4 0,05 N

3. Soluție acid ascorbic 1% prepat în soluție de CuSO_4 0,001 M (pentru 25 ml se cântăresc 0,006 g CuSO_4 și se dizolvă în 10-12 ml apă bidistilată, după care se adaugă 0,25 g acid ascorbic și se completează volumul la 25 ml apă bidistilată). Reactivul se prepară în momentul utilizării.

Dozarea fosforului anorganic se face după următoarea schemă:

Reactiv (ml)	Control 1	Cercetat 1	Control 2	Cercetat 2
Filtrat	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampon acetat	4,8	4,8	4,8	4,8
Molibdat amoniu	0,5	0,5	0,5	0,5
Acid ascorbic	0,5	0,5	0,5	0,5
Total reactivi (ml)	6	6	6	6

Calculul rezultatelor

Rezultatele se pot raporta la ml filtrat luat în lucru sau la mg biomasă folosită la obținerea filtratului. Calcularea lor se face în felul următor.

4 ml filtrat (extract enzimă) 2 mg
biomasă
1 ml filtrat (extract enzimă) x

$$x = 2/4 = 0,5$$

Deci:

0,5 g filtrat biomasă a mg Pi (se va scoate de pe
curbă)

1 g filtrat biomasă y

$$y = a / 0,5$$

Unde: a = mg Pi citit pe curbă

y = mg Pi ce corespunde la 1 g biomasă

Curba etalon

Se măsoară 0,02 0,5 ml sol KH_2PO_4 conținând între 2
..... 50 g Pi într-o serie de eprubete la care se adugă:

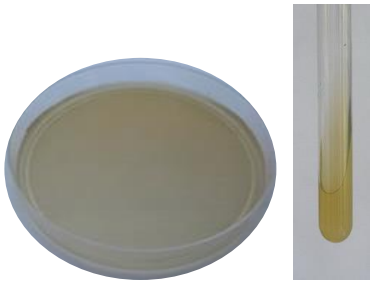
- 0,1 ml din cei ce rezultă din amestecul:
 - 0,4 ml tampon Tris- Hcl
 - 0,1 ml MgCl_2
 - 0,1 ml NaCl
 - 0,1 ml KCl
 - 1,1 ml apă bidistilată
 - 0,2 ml ATC
- 0,5 ml soluție molibdat de amoniu
- 0,5 ml soluție acid ascorbic

Indiferent de volumul fosfatului luat în lucru se adaugă până la 6 ml tampon acetat. Pentru pregătirea curbei se poate folosi schema:


Reactivi (ml)	Probe						
	1	2	3	4	5	6	7
KH ₂ PO ₄	0,02	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Amestec de reactivi	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Molibdat de amoniu	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Acid ascorbic	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tampon acetat	4,88	4,85	4,8	4,7	4,6	4,5	4,4
Total reactivi	6	6	6	6	6	6	6

După agitare, probele se lasă în repaus 10 minute, după care se fotocolorizează la un spectrofotometru în $\lambda = 656 \text{ nm}$ și se construiește curba.

Geloză simplă (nutrient agar)

Tip	Mediu simplu	
Compoziție	Pentru 1000 ml <ul style="list-style-type: none">▪ Agar 3.0g▪ Extract bovin 1.0g▪ Peptonă 1.0g▪ NaCl 0.5g	
Utilizare	Cultivarea bacteriilor nepretențioase	

Geloză sânge (blood-agar)


Tip	Mediu compus	
Compoziție	Pentru 1000 ml <ul style="list-style-type: none">▪ Agar 15.0g▪ Peptonă C 15.0g▪ Peptonă S 5.0g▪ NaCl 5.0g▪ Sânge de berbec defibrinat 50.0mL▪ pH 7.4 ± 0.2 la 25°C	
Utilizare	Cultivarea bacteriilor pretențioase	

Mediu Chapman (manitol-salt-agar)


Tip	Mediu selectiv-diferențial	
-----	----------------------------	--

Compoziție	Pentru 1000 ml <ul style="list-style-type: none"> ▪ NaCl 75.0g ▪ Agar 15.0g ▪ D-Mannitol 10.0g ▪ Peptonă A 5.0g ▪ Peptonă C 5.0g ▪ Extract bovin 1.0g ▪ Roșu fenol 0.025g ▪ pH 7.4 ± 0.2 la 25°C 	
Utilizare	Izolarea selectivă și cultivarea stafilococilor. Microorganismele care utilizează manitolul transformă mediul în galben.	


Geloză lactozată (CLED agar)

Tip	Mediu diferențial	
Compoziție	Pentru 1000 ml <ul style="list-style-type: none"> ▪ Agar 15.0g ▪ Lactoză 10.0g ▪ Peptonă C 4.0g ▪ Peptonă G 4.0g ▪ Extract bovin 3.0g ▪ L-Cistina 0.128g ▪ Albastru brom-timol 0.02g ▪ pH 7.3 ± 0.2 la 25°C 	
Utilizare	Izolarea, enumerarea și identificarea prezumptivă a bacteriilor din urină (în suspiciune de infecție urinară). Cultivarea și izolarea neselectivă a enterobacteriilor.	

Mediu MacConkey


Tip	Mediu selectiv-diferențial	
Compoziție	<p>Pentru 1000 ml</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Agar 13.5g▪ Lactoză 10.0g▪ NaCl 5.0g▪ Săruri biliare 1.5g▪ Peptonă A 1.5g▪ Peptonă C 1.5g▪ Peptonă G 17.0g▪ Roșu neutru 0.03g▪ Cristal violet 1.0mg▪ pH 7.1 ± 0.2 la 25°C	
Utilizare	<p>Izolarea, cultivarea și diferențierea coliformilor și a patogenilor enterali. Enterobacteriile patogene nu fermentează lactoza, producând colonii transparente.</p>	

Mediu Levine (EMB agar)


Tip	Mediu selectiv-diferențial	
Compoziție	<p>Pentru 1000 ml</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Agar 15.0g▪ Lactoză 10.0g▪ Peptonă 10.0g	

	<ul style="list-style-type: none"> ▪ K₂HPO₄ 2.0g ▪ Eozină Y 0.4g ▪ Albastru metilen 0.065mg ▪ pH 7.1 ± 0.2 la 25°C 	
Utilizare	Izolarea, cultivarea și diferențierea coliformilor și a patogenilor enterali. Enterobacteriile patogene nu fermentează lactoza, producând colonii transparente. <i>E. coli</i> produce colonii cu luciu metalic	


Geloză chocolată

Tip	Mediu special	
Compoziție	<p>Pentru 3031 ml</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Agar 15.0g ▪ Pantonă 10.0g ▪ Bitone 10.0g ▪ NaCl 5.0g ▪ Extract cord bovin 3.0g ▪ Amidon 1.0g ▪ Sânge defibrinat de berbec 100.0mL ▪ Supliment B 10.0mL ▪ pH 7.3 ± 0.2 la 25°C 	
Utilizare	Cultivarea microorganismelor pretențioase	


Mediu Sabouraud

Tip	Mediu selectiv	
Compoziție	Pentru 1000 ml <ul style="list-style-type: none">▪ Glucoză 120.0g▪ NaCl 90.0g▪ Agar 45.0g▪ Peptonă 30.0g▪ Soluție Cloramfenicol 15.0mL▪ Soluție Cicloheximidă 15.0mL▪ Soluție Gentamicină 1.5mL	
Utilizare	Izolarea și cultivarea fungilor	

Mediu Mueller Hinton

Tip	Mediu special	
Compoziție	Pentru 1000 ml <ul style="list-style-type: none">▪ Extract bovin 300.0g▪ Hidrolizat acid de cazeină 17.5g▪ Agar 17.0g▪ Amidon 1.5g▪ pH 7.4 ± 0.2 la 25°C	
Utilizare	Testarea susceptibilității față de antibiotice; Izolarea și menținerea speciilor patogene de Neisseria.	

Mediu ABE

Tip	Mediu diferențial	
Compoziție	Pentru 1000 ml <ul style="list-style-type: none">▪ Ovgall 40.0g▪ Agar 15.0g▪ Peptonă 5.0g▪ Extract bovin 3.0g▪ Citrat de fier 0.5g▪ Esculină 1.0g	
Utilizare	Izolarea și identificarea prezumptivă a streptococilor grup D și a enterococilor	