

Curs : Microbiologie generala

Conceptul modern de microorganism

Microorganismele reprezintă un grup foarte heterogen de organisme care au în comun câteva particularități generale definitorii:

- 1) **dimensiuni foarte mici, microscopice**, care fac ca aceste organisme să nu poată fi vizibile ca indivizi izolați decât la microscop, astfel că de obicei sunt studiate ca populații omogene sau culturi pure; în natură, pot fi observate uneori ca pelicule sau biofilme dezvoltate pe diverse suprafețe; dimensiunile sunt apreciate după sistemul metric actual, în μm , iar substructurile în nm sau Å;
- 2) **organizare celulară**; teoria celulară (Schleiden și Schwann, 1838), a reprezentat o importantă generalizare pe care s-a fundamentat biologia modernă, postulând că toate organismele sunt alcătuite din celule; deci microorganismele au o organizare celulară, **de tip procariot sau eucariot**;
- 3) **sunt sisteme biologice, deci prezintă particularitățile viului**; sistemele biologice cele mai rudimentare sunt bacteriile, care însumează trăsăturile minime ce caracterizează viața, reunind atributele de: organizare celulară, autonomie (metabolism propriu), invarianță (informație genetică ce codifică toate proprietățile acestor celule și transmita descendenților, ceea ce asigură menținerea speciilor);
- 4) **raport mare între suprafață și volumul celular**, deoarece o celulă reprezintă chiar un organism; această particularitate favorizează strategia de supraviețuire a microorganismelor în natură, pentru că acest raport **influențează capacitatea de interacțiune cu mediul, respectiv viteza schimburilor de substanțe dintre organism și mediu, care stă la baza intensității mari a metabolismului, ca și a vitezei mari de multiplicare**.

Tot ce poate fi definit prin aceste patru particularități este considerat la ora actuală microorganism; rezultă că această noțiune este un concept integrator, fără valoare taxonomică.

Principalele grupe de microorganisme, având ca reper organizarea celulară, sunt:

– PROKARYOTES = MONERA

EUBACTERIA – diferențiate în două mari grupe: bacterii Gram pozitive și negative

CYANOBACTERIA

ARCHAEA (grupează microorganisme cu organizare celulară de tip procariot, anterior încadrate între bacterii; în prezent sunt încadrate în Domeniul ARCHAEA organisme care la nivel molecular sunt mai asemănătoare cu eucariotele decât cu bacteriile).

- EUKARYA

MICROFUNGI: unicelulari - Levuri (= Drojdii) și filamentozii = Mucegaiuri

MICROALGE

PROTOZOARE

Archaeele au fost descoperite de Woese în 1980 în apa hipersalină a lacurilor din peninsula Sinai. Aceste microorganisme cu organizare celulară de tip procariot, sunt considerate ca fiind adevărate fosile vii, reprezentând formele actuale ale unor organisme apărute în condițiile primordiale ale vieții pe pământ. Pe baza unor criterii de biologie moleculară (de ex., prin secvențierea moleculelor de ARNr 16S), în prezent sunt considerate mai asemănătoare cu eucariotele, decât cu procariotele, reprezentând o direcție de evoluție aparte, dintr-un strămoș comun, ceea ce explică reîncadrarea lor taxonomică. Moleculele ARNr (16S pentru domeniile *Bacteria* și *Archaea* și 18S pentru domeniul *Eukarya*) sunt înalt conservate, fiind considerate adevărate "cronometre" moleculare, astfel ca datele obținute prin secvențierea lor sunt utile pentru stabilirea distanțelor filogenetice și respectiv a gradului de înrudire dintre specii.

Microorganismele archaeene prezintă o afinitate pentru nișe ecologice speciale, fiind considerate microorganisme extremofile, cu particularități structurale și activități metabolice neobișnuite; sunt clasificate în trei grupe fiziologice: metanogene, termoacidofile, halofile

Poziția microorganismelor în sistemele de clasificare a lumii vii. Sistemul de clasificare propus de Whittaker (1969), acceptat și în prezent, împarte lumea vie în 5 regnuri:

- 1) *Monera = Bacteria (Prokaryotes)*
- 2) *Pro(toc)tista*
- 3) *Fungi*
- 4) *Plantae*
- 5) *Animalia*

Acest sistem de clasificare demonstrează caracterul de grup heterogen al microorganismelor, care se regăsesc în primele 3 regnuri și caracterul integrator al noțiunii de microorganism.

Cel mai nou sistem de clasificare este cel pe domenii, bazat pe date de analiza filogenetică la nivel molecular, date ce au permis stabilirea cadrului conceptual necesar elaborării **sistemului de clasificare filogenetică a lumii vii în 3 domenii** (Carl Woese, 1997):

Domeniul *Bacteria*
Domeniul *Archaea*,
Domeniul *Eukarya*.

Cum microorganismele sunt esențiale pentru derularea multor cicluri biogeochimice și pentru continuarea funcționării biosferei, acest sistem de clasificare al lui K. Woese a clarificat aspecte privind evoluția și diversitatea microorganismelor, cu un impact puternic asupra viziunii specialiștilor în ecologie generală și microbiană.

Pentru taxonomia procariotelor s-au utilizat diferite sisteme și scheme de clasificare. Cu toate acestea, nu există o clasificare a procariotelor unanim acceptată. Totuși în niciun sistem de clasificare nu sunt luate în considerare virusurile, deoarece sunt entități infecțioase, având relații cu lumea vie (pentru toate cele 5 regnuri există virusuri specifice), dar cu o organizare acelulară și fiind particule complet inerte în mediul extern (nu cresc, nu se divid). La nivel molecular sunt mai înrudite cu celula-gazdă pe care o parazitează, decât între ele; sunt atașate doar convențional microorganismelor, cu care au în comun doar dimensiunile mici și existența unei informații genetice. În lumea medicală consideră că și capacitatea de a genera boli specifice, unele destul de asemănătoare ca simptomatologie cu cele de etiologie microbiană ar fi un caracter de asemănare.

Domeniul PROKARYOTES

Bacteriile au fost definite de Fr. Jacob ca fiind un „minimum vital”, sau organismele cele mai simple, dotate cu atributele viului: organizare, autonomie, invarianță. Reprezintă o categorie aparte de organisme unicelulare cu o morfologie caracteristică, destul de limitată, dimensiuni mici și caractere de colorabilitate ușor de stabilit prin observații microscopice. Odată cu observarea unor particularități foarte diferite, a devenit necesară stabilirea unor caractere diferențiale, care să permită stabilirea cu certitudine a apartenenței unui microorganism la grupul bacteriilor.

Stanier (1971) a definit bacteriile sau procariotele prin antiteză cu eucariotele, utilizând caractere discriminatorii, care stabilesc diferențe nete între celulele procariote și eucariote; ulterior, K. Woese a adus completări esențiale (tabel nr.1).

Tabel nr. 1. Conceptul de bacterie, definit prin antiteza dintre caracteristicile celulelor procariote și eucariote

(adaptat după Stanier, 1971; Woese, 1997).

Caracteristica	PK	EK
1. Peretele celular (P.C.) și markeri biochimici ai acestuia	- prezent în mod constant – <i>mureina</i> (PG) - <i>DAP</i> - <i>D-aminoacizi</i> - <i>acizii teichoici</i> (exc. Gr. Mycoplasmele și G. <i>Halobacterium</i>); - la <i>Archaeae</i> – pseudomureina/m.neconventionala	- absent - la celula animală - prezent: - la cel. vegetală- <i>celuloza</i> - la cel. fungică- <i>chitina</i>
2. Membrana plasmatică	omniprezentă și structurată la fel la toate organismele , potrivit modelului mozaicului fluid al membranei - comp.ch.: steroli – absenți (exc. <i>Mycoplasma</i>) - f. selectivă: permeabilă pt. apa, unii ioni, ac.grași și s. liposolubile, fragm.de ADN (molecule cu $\varnothing \leq 0,8\text{nm}$)	- constant prezenți - plasticitate mare la celula animală (capabilă de endocitoză), redusă la cel.veg și fungică (cu P.C.)
3. Citoplasma	- stare permanentă de gel curenți citoplasmatici – absenți - citoschelet – absent	- tranziție permanentă gel→sol + curenți citopl. - prezent
4. Ribozomii	- de tip 70S (mol. de ARNr 16S = semantida; struct. înalt conservata)	- de tip 80S - de tip 70 S (în organite)
5. Organite membranare	- absente	-prezente(mitocondrii,reticul endopl., cloroplaste, ap. Golgi)
6. Sinergonul respirator și fotosintetic	- localizate la nivelul membranei plasm., interconectate structural și funcțional - marker: bacterioclorofila	- autonome, localizate la nivelul organitelor specifice (mitocondrii și cloroplaste)
7. Sediul și organizarea materialului genetic	- în citoplasmă - inf. genetică esențială - <i>nucleoid</i> - fără mb. nucleară 1 moleculă de ADN d.c.c.c.î. = 1 cromozom bacterian (nucleosom) - inf. genetică accesorie - <i>plasmide</i> → molecule de ADN d.c.c.c.î. = minicromozomi (conferă avantaje adaptative) - colinearitatea genelor - se succed continuu, fara secv. non-informationale - grd. de ploidie - haploid (1cromosom)	- în nucleu distinct (+ nucleol) delimitat de membrana nucleară - cromozomi–număr caract. fiecărei specii = ADN + histone -la niv. mitocondriilor și cloroplastelor- ADN d.c.c.c.î -informație discontinua: Exoni+ Introni - celule somatice– diploide - celule sexuale – haploide
- funcționarea materialului genetic	- replicarea materialului genetic - simplu, de tip semiconservativ - sediul traducerii informației genetice: - în citoplasmă – la niv. (riboz. 70S (transcrierea și traducerea - cuplate)	- prin mitoză – în nucleu - de tip semiconservativ în mitocondrii și cloroplaste - în citoplasmă– la niv riboz.80S - în organite la niv. riboz. 70S
8. Multiplicarea	- prin diviziune directă (binară) (rar prin înmugurire; prin fragmentare și sporulare - la bacteriile filamentoase) - echipartiția materialului genetic: - asigurată de <i>mezosom</i>	- prin mitoză (diviziune indirectă) - în cel.somatice - prin meioză (reducțională) - în celulele reproducătoare - asigurata de aparatul mitotic

Continuare

9. Procese de sexualitate

- excepț., fenomene de parasexualitate
= transfer unidirecțional, cu formare de
merozogoi, parțial și temporar diploizi

- sexualitate propriu-zisă,
datorită fuziunii gameților
(= zigot), prin participarea
egală a partenerilor sexuali

10. Mecanisme de transfer de material genetic

- transformare genetica, conjugare,
transducție genetică

- fuziune de gameți, urmată
de fuziune nucleară, cu
posibilitatea de recombinare
genetică și variabilitate

11. Mobilitatea (facult.)

- flageli de tip PK (facultativ)

- cili și flageli de tip EK

(cu structura 2x9+2 microtubuli)

12. Infectarea cu virusuri

- prin perforarea P.C. și injectarea
genomului prin mec.de microseringă

- la cel. anim. prin
endocitarea virionului
- la cel. veg., fungi-după lezarea P.C.

13. Sensibilitatea la antibiotice subst. inhibitorii ale creșterii celulare

Antibiotice = subst. cu acțiune selectivă → ținte
(structuri celulare/ reacții de biosinteză);

Ex: peniciline, cefalosporine, bacitracina

- inhibă sinteza *mureinei* din P.C.
al bacteriilor în curs de creștere;
- inactice pe celulele eucariote;
folosite în terapia infecțiilor bacteriene;
- **streptomicina, tetraciclina, cloramfenicol**
- ținta → riboz. 70S - efect de blocare a
proteosintzei și implicat a proceselor
de creștere și multiplicare;
* nu au efect asupra celulelor EK (rib. 80S,
și nici asupra ribozomilor 70 S din organite
(mb. mitoc.- imperm.la aceste antibiotice);

- **cicloheximide** =subst.inhibitorii
ale proteosintzei la EK
- ținta → rib.80S-efect citostatic;

- **vinblastina, colchicina** – inhibă
asamblarea microtubulilor
și diviziunea - efect citostatic;

- **antibiotice polienice** - acțiune
antifungică (antimicotice),
active asupra sterolilor din
plasmalema celulelor fungice.

14. Capacitatea de a forma organisme multicelulare

- la PK – o celulă = un organism;
-incapabile de a forma organisme pluricelulare

- la EK -
- capacitatea de a forma
organisme multicelulare este
definitorie, celula fiind
unitatea de bază a organismului
multicelular ca întreg

- în habitatele naturale:

- bacterii solitare (izolate);
- agregate coloniale, asociații de celule
identice sau diferite, fiecare celulă
păstrându-și individualitatea;
= **biofilme microbiene** - celulele beneficiază
de protecție, de un „sistem circulator,,
primitiv, de o „homeostazie,, primitivă;
- celulele disociate – viabile, capabile de viața
independentă și de colonizare de noi spații;

15. Capacitatea de diferențiere celulară

- la PK - rudimentară, limitată,
reprezentată de:
- **endosporul bacterian** – formă de rezistență
la condiții nefavorabile de mediu, considerată
în prezent o formă primitivă de diferențiere,
prezenta la bact. sporogene;
-marker biochimic (endospor/PK) – *acid dipicolinic*
- **heterochistul cianobacteriilor filamentose**
– celulă diferențiată specializată în fixarea N₂ atm.;
- **biofilmele bacteriene** - „țesuturi,, primitive;
între celulele biofilmului se pot stabili relații
sinergice de tip nutrițional, cu activități metabolice
mai diverse și mai eficiente comparativ cu celulele
libere sau planctonice.

- la EK - se extinde pe o gamă
largă, de la forme rudimentare,
la celule înalt specializate,
culminând cu cele strict specializate:
- neuronul, }
- limfocitul } vertebratelor.

Anatomie bacteriană - Structuri esențiale

Peretele celular. Este o structura bacteriană definitorie, prin compoziție chimică, structura primară, secundară și terțiară și în general, un marker biochimic pentru procariote. Este o structură bine definită, rigidă, cu o grosime medie de 15 – 35 nm, care înconjoară celula bacteriană, acoperă membrana plasmatică și poate fi străbătută de flageli, la bacteriile mobile.

Evidențiere – la microscopul optic: - pe preparate proaspete, datorită refringenței;

- pe frotiuri – colorate cu metode selective pentru perete celular;

- la microscopul electronic cu transmisie (MET), pe secțiuni ultrafine;

- prin lezarea peretelui prin metode mecanice (agitare), US, chimice, șoc osmotic, are loc eliminarea conținutului celular și evidențierea peretelui celular ca un sac golit de conținut.

Deși sistemul actual de clasificare filogenetică a bacteriilor se bazează pe criterii oferite de biologia moleculară (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* – ultima ediție fiind publicată între 2001-2012), o schemă generală de clasificare fenotipică a bacteriilor, încă foarte utilă din punct de vedere practic, utilizează drept criteriu structura peretelui celular; mai exact, în funcție de prezența, structura, și gradul de dezvoltare al peretelui celular, bacteriile se împart în 4 diviziuni:

1. Diviz. *FIRMICUTES* (lat. *firmus* = tare, *cutes* = înveliș) = bacteriile Gram pozitive;

Cls. 1. *Firmibacteria* – bacterii cu perete celular gros, rigid, prin conținutul mare în mureină

Cls. 2. *Thallobacteria* – bacterii filamentoase = *Actinobacteria* (den. veche *Actinomycetes*)

2. Diviz. *GRACILICUTES* (lat. *gracilis* = fragil) = bacteriile Gram negative;

Cls. 1. *Scotobacteria* (gr. *scotos* = întuneric) = bacterii care se pot dezvolta în absența luminii;

Cls. 2. *Photobacteria*:

- *Subcls. Oxyphotobacteria*, respectiv *Cyanobacteria*;

- *Subcls. Anoxyphotobacteria* – bacteriile sulfuroase roșii (*Chromatiaceae*);

- „ „ verzi (*Chlorobacteriaceae*);

- „ „ nesulfuroase roșii (*Rhodospirillaceae*).

3. Diviz. *TENERICUTES* (lat. *teneri* = moale) = bacteriile fără perete celular = micoplasme.

Cls. *Mollicutes* (lat. *molli* = moale, pliabil), genul reprezentativ fiind *Mycoplasma*; sunt cele mai mici bacterii cunoscute capabile de creștere pe medii acelulare; membrana plasmatică a micoplasmelor are un caracter unic printre bacterii, în sensul că aceasta conține steroli care protejează celula de șocul osmotic și îi conferă un polimorfism accentuat.

4. Diviz. *MENDOSICUTES* (lat. *mendosus* = fals, greșit) = care grupează în prezent microorganismele încadrate în Domeniul *Archaea*, respectiv microorganismele cu organizare celulară de tip procariot, dar care la nivel molecular sunt mai asemănătoare cu eucariotele decât cu procariotele, reprezentând o direcție de evoluție aparte. Astfel archaeele prezintă un perete celular „fals”, în compoziția căruia intră pseudomureina sau o mureină neconvențională (lipsită de acidul N-acetilmuramic = NAM), lipidele membranare sunt diferite, glicerolul fiind înlocuit cu acidul N-acetil-talosaminuronic; alte deosebiri: structura particulară a moleculelor de ARNt, a ARNr 16S, sensibilitatea diferită la antibiotice. Archaeele sunt foarte răspândite în natură, nu doar în medii cu condiții extreme, ci și în sol, mediul marin și oceanic; au fost identificate și specii comensale, prezente în microbiota intestinală normală a omului și animalelor, participând la procesul de digestie (specii metanogene); nu au potențial patogen direct.

Diferențele cele mai nete sunt însă între bacteriile Gram pozitive și Gram negative, fiind nu doar de tinctorialitate, ci și din punct de vedere biochimic, comportamental, antigenic și de patogenitate. Această colorație diferențială a fost inventată în 1884 de H.Ch. Gram, fiind o metodă ce permitea și permite în continuare diferențierea celor două grupe mari de bacterii pe baza afinității lor pentru coloranți; după elucidarea structurii peretelui celular bacterian, au fost înțelese mecanismul acestei colorații, ca și toate implicațiile privind biologia bacteriilor.

Structura peretelui celular la bacteriile Gram pozitive. Bacteriile incluse in acest grup au un perete celular gros, relativ omogen, din mai multe straturi suprapuse, cu un conținut de:

- **mureină** – in proportie de 80 - 90% din masa uscata, substanta care din punct de vedere chimic este un *peptidoglican*, numit și mucopeptid sau mucocomplex, substanta considerata ca fiind un marker biochimic pentru procariote;

- **polizaharide;**

- **proteine.**

Specia tip pentru acest grup de bacterii este *Staphylococcus aureus*.

Mureina este un heteropolimer, alcatuit din două componente, respectiv o parte peptidică și una glicanică. *Partea peptidică* este constituită din tetrapeptide și punți interpeptidice; *tetrapeptidele* au urmatoarea secventa de aminoacizi:

L-Ala - D-Glu - LR3 - D-Ala,

unde natura restului R3 variaza de la o specie la alta, putând fi un aminoacid neutru- L- alanina sau L- homoserina, un aminoacid dicarboxilic – acidul L-glutamic sau un aminoacid diaminat – L-lizina sau un derivat al acesteia, respectiv *acidul diaminopimelic– DAP*, derivat din lizină, cu o grupare COOH adițională. Unitățile tetrapeptidice aparținând lanțurilor glicanice adiacente sunt legate la rândul lor prin punți interpeptidice formate din ~ 5 resturi de aminoacizi, astfel încât mureina are în ansamblu o structură tridimensională în rețea, în jurul celulei bacteriene.

Partea glicanică are structura unor lanțuri liniare paralele, alcătuite din resturi alternante de N – acetil-hexozamine: N-acetilul glucozamina - NAG și acidul N-acetil muramic – NAM, legate prin legături β -1-4. Grupările COOH ale acidului NAM furnizează puncte de legare pentru lanțurile interpeptidice, care fac legătura cu gruparea NH₂ a restului LR3. Această structură de bază a peptidoglicanului poate suferi modificări discrete care nu alterează însă arhitectura generală a moleculei (sunt descrise 8 tipuri de peptidoglican).

La bacteriile cilindrice moleculele de mureină sunt formate din lanțuri de glicani așezate în spirală față de axul longitudinal al celulei. Această structură este potrivită pentru creșterea peretelui celular și diviziunea celulelor, procese care se realizează printr-o continua remodelare a peretelui celular, respectiv prin sinteza de molecule de mureină sub acțiunea *murein-sintetazei*, moleculele nou sintetizate fiind introduse acolo unde acționează *murein-hidrolazele*, desfăcând legaturile. Activitatea acestor enzime este perfect coordonată în timp și spațiu, creșterea peretelui celular având loc în zona centrală unde sunt localizate enzimele. Prin mecanisme de acțiune asemănătoare acestor enzime acționează și lizozimul (*muramidaza*), o proteină enzimatică, prezentă în umorile organismului (serul sanguin, secreții), cu rol în apărarea antibacteriană nespecifică sau așa-numita rezistență naturală a organismului animal și uman.

De asemenea, penicilinele sunt antibiotice care au ca țintă de acțiune peretele celular bacterian, inhibând sinteza peptidoglicanului și implicit procesele de creștere și diviziune. Penicilina (și alte antibiotice β -lactamice) acționează prin inhibarea *proteinelor care leaga penicilina* (= PBP), proteine care catalizează în mod normal formarea legaturilor încrucisate din peretele celular bacterian. Inelul β -lactam (grupul functional) al penicilinei se leaga de enzima DD-transpeptidaza care participa la legarea moleculelor noi de peptidoglican în peretele celular în curs de creștere. Enzimele care hidrolizează legaturile încrucisate din peptidoglican continua să funcționeze, ceea ce conduce la slăbirea peretelui celular, mergând până la citoliza sau moartea celulei bacteriene datorită lizei osmotice. În plus, formarea de precursori ai peptidoglicanului atrage după sine activarea hidrolazelor și autolizinelor din peretele celular, care vor digera mai departe peptidoglicanul existent. Acest dezechilibru între sinteza și degradarea mureinei este responsabil de acțiunea bactericidă rapidă a acestei clase de antibiotice, chiar în absența procesului de diviziune celulară. Mai mult, dimensiunea relativ mică a moleculelor de penicilina permite patrunderea lor în profunzimea peretelui celular, afectându-l în totalitate, spre deosebire de alte clase de antibiotice care inhibă sinteza peretelui celular, cum ar fi glicopeptidele (vancomicina) ale caror molecule sunt de dimensiuni mai mari.

Penicilina prezintă un efect sinergic cu aminoglicozide (streptomycină, gentamicină, kanamicină, neomicină etc.), deoarece inhibarea sintezei de peptidoglican permite aminoglicozidelor să patrundă prin peretele celular mai ușor, permițând acțiunea lor specifică, respectiv inhibarea proteosintezei din celule.

Rigiditatea sacului de mureină este determinată de legăturile încrucișate foarte numeroase, de alternanța aminoacizilor dextro- și levogiri din tetrapeptide în care legăturile sunt mai compacte decât între orice tip de monomeri, de legăturile β -1,4 din lanțurile glicanice care fac aceste molecule să fie foarte compacte, asemănătoare celor din constituția chitinei. În plus, acestor legături li se adaugă și punțile de hidrogen. Rigiditatea sacului de murină este relativă totuși, astfel că poate suferi flexiuni, cum ar fi de ex. la spirochete. De asemenea, legăturile încrucișate conferă o oarecare flexibilitate, ceea ce permite mărirea și micșorarea volumului celular în condițiile modificării presiunii osmotice. Bacteriile patogene au numeroase legături încrucișate și sunt mai rezistente la acțiunea lizozimului.

În compoziția peretelui celular intră și **polizaharide** caracteristice pentru procariote, respectiv *acizi teichoici* (gr. *teichos* = zid), care se prezintă sub forma unor molecule lungi, flexibile formate din 1,5–poliribitol-fosfat și 1,3–poliglicerol-fosfat (legături fosfodiesterice) și diferiți substituenți care le imprimă specificitate (zaharuri, colină, D-Ala). Aceste molecule sunt ancorate cu o extremitate de straturile interne de peptidoglican (acizi teichoici de perete – prezenți la anumite specii) sau de membrana plasmatică (acizi lipoteichoici – prezenți la toate bacteriile), cealaltă extremitate fiind liberă, expusă la exterior. Acizii teichoici pot fi și excretați, ca molecule solubile.

Acizii teichoici intervin în transportul unor ioni, în procesul de diviziune normală, ca receptori de fași, iar la bacteriile patogene constituie un factor de virulență, făcând parte din categoria adezinelor, respectiv a structurilor de suprafață cu rol în aderența bacteriilor la substratul celular sensibil – prima etapă a unui proces infecțios; au și un rol antifagocitar, opunându-se fagocitozei, proces realizat de către celulele fagocitare ale gazdei, care fac parte din prima linie de apărare, nespecifică a organismului.

Datorită compoziției lor specifice, permit caracterizarea și diferențierea bacteriilor Gram pozitive prin metode imunologice, cu ajutorul unor antiseruri specifice față de diferite tipuri de acizi teichoici și prin evidențierea reacțiilor Ag-Ac.

Proteinele se constituie în așa-numitul *strat S*, reprezentat de două straturi proteice paracristaline. Acest strat face parte dintre cele mai primitive structuri parietale, fiind prezent la toate eubacteriile și la majoritatea archaeelor.

Semnificație biologică. Cu excepția bacteriilor care au dezvoltat strategii pentru a trăi în condiții foarte specializate, adesea extreme, care fac posibilă prezența monoculturilor, majoritatea lor trebuie să supraviețuiască în comunități multispecifice și deci în habitate înalt competitive. Se consideră că stratul S are rol de protecție, de sită moleculară, de capcană pentru molecule și ioni. De asemenea, se consideră că stratul S este implicat în adeziunea celulară și recunoaștere și constituie regiunea-cadru care determină și menține forma celulelor la acele archaee la care stratul S este unicul component al peretelui celular.

Bacteriile Gram pozitive au capacitatea de a sintetiza și elibera în mediu metaboliți, respectiv **exoenzime** și **exotoxine** (gr. *exo* = în afară). Deci degradarea nutrienților are loc sub acțiunea exoenzimelor în mediul extracelular, moleculele cu g.m. mai mică fiind apoi preluate în celule. Sunt favorizate bacteriile Gram pozitive din mediile naturale bogate în nutrienți și cu mare densitate populațională, pentru că moleculele rezultate prin biodegradare sunt folosite de populația respectivă.

Toxinele sunt otrăvuri microbiene care afectează profund inițierea și evoluția unei infecții, deoarece o singură toxină poate face ca un microorganism să fie patogen și foarte virulent. Nu numai bacteriile parazite produc toxine, ci și bacteriile saprotrofe (*Clostridium botulinum*).

Exotoxinele bacteriene sunt produse în cea mai mare parte de către bacteriile patogene Gram pozitive (deși și unele bacterii Gram negative au această capacitate). Sunt toxine puternice, care odată eliberate în mediu, se dizolvă în sânge și circulă în organism, ajungând la situsul lor de acțiune (manifestă cito/histotropism) și determinând apariția manifestărilor caracteristice unor boli specifice, cum ar fi: botulismul alimentar, tetanosul, difteria etc. Sinteza și eliberarea din celulele producătoare are loc în faza de multiplicare activă a celulelor, iar concentrația lor în mediu este maximă când creșterea bacteriană a atins punctul maxim.

Toxinele purificate au o toxicitate mult mai mare, comparativ cu cea a filtratelor culturilor bacteriene aparținând unor specii toxigene. Deoarece exotoxinele sunt proteine, moleculele lor sunt sensibile la caldura (termolabile) și la substanțe chimice care reacționează în mod normal cu proteinele. De exemplu, toxinele supuse acțiunii formaldehidei își pierd toxicitatea, transformându-se în *anatoxine* sau *toxozizi* care își

păstrează însă capacitatea de a declanșa un răspuns imun dacă sunt introduse într-un organism imunocompetent. Exploatarea acestor proprietăți conduce la obținerea anatoxinelor difterică și tetanică utilizate în imunizarea activă antidifterică și respectiv antitetanică. Fiind de natură proteică, multe exotoxine pot fi inactivate sau chiar distruse de enzimele proteolitice intestinale. Face excepție toxina botulinică, a cărei toxicitate se intensifică după o proteoliză limitată, prin expunerea unor grupări de toxicitate anterior mascate. Multe dintre toxinele bacteriene au utilizări medicale (terapie, imunoprofilaxie), ca și în cercetare.

Peretele celular la bacteriile Gram negative (*Gracilicutes*)

Specie tip – *Escherichia coli* (din *Fam. Enterobacteriaceae*). Peretele celular al acestor bacterii are o structură specifică: conține doar 8-10% mureină, lipsesc acizii teichoici; de asemenea, apare o structură suplimentară numită *membrana externă*, o copie a membranei plasmatică.

Peretele celular este alcătuit din 2 componente majore:

- complexul peptidoglican - lipoproteină (G = 1,2 – 5 nm); PG-LP;
- membrana externă (G = 5 - 20 nm); conține: lipide 35%, proteine 15% și LPS 50%;
 - o dublu strat fosfolipidic în care sunt inclavate LPS și diferite categorii de proteine, dintre care semnificative sunt porinele, organizate sub formă de trimeri legați necovalent de PG, în care se continuă; acești trimeri formează un canal central cu Ø de 1nm, prin care pot trece molecule mici; au și rol de receptori de fagi.

Spațiul dintre cele 2 membrane este numit *spațiu periplasmic*; la acest nivel se află complexul PG - LP, format din lanțuri scurte de PG, de care sunt atașate prin porțiunea proteică LP, care mențin membrana externă atașată de PG. La nivelul membranei externe se află LPS și proteine. **LPS sau endotoxinele** sunt alcătuite din lipidul A care este toxic, inserat în membrana externă și lanțuri de polizaharide care formează așa-numitul Antigen O, care are variabilitate antigenică (maximă în cazul genului *Salmonella*).

În spațiul periplasmic există și proteine de legare cu rol de transport, molecule de oligozaharide implicate în procesele de osmoreglare (determină presiunea optimă, pentru a face față presiunii interne care împinge membrana internă spre exterior) și enzime: RN-aze, DN-aze, penicilinază, hidrolaze.

Fragilitatea bacteriilor Gram negative este dată de cantitatea mică de mureină, de prezența spațiului periplasmic, ca și a membranei externe.

Membrana externă este mai puțin fluidă și mai puțin permeabilă la molecule hidrofobe (antibiotice), mai rezistentă și la atacul sărurilor biliare, ceea ce explică existența bacteriilor Gram negative în număr mare în intestin (atât a celor ce fac parte din microbiota intestinală normală, cât și a unor bacterii alohtone).

Semnificația biologică a peretelui celular – este o structură de rezistență mecanică, ce menține întreaga structură a celulei, conferă formă celulei bacteriene, rigiditate, +/- elasticitate.

- asigură protecție față de șocul osmotice (se opun presiunii osmotice a mediului intracelular, asigurând integritatea celulelor bacteriene);
- participă la procesele de creștere și de diviziune, mai exact la formarea septului transversal de diviziune; conține enzime active în procesul de sporogeneză (la bacteriile Gram pozitive sporogene);
- are rol în procesele de schimb între celula bacteriană și mediu (transportul nutrienților, ca și al produsilor de metabolism);
- la nivelul peretelui celular sunt localizați receptori pentru bacteriofagi, ca și suprafețe de recunoaștere și legare a altor bacterii, cu rol în formarea cuplurilor de conjugare;
- anumite componente structurale ale peretelui celular bacterian fac parte din categoria generică a *adezinelor*, care mediază legarea sau *aderenta* bacteriilor la diverse suprafețe, inerte din mediul natural sau celulare, la nivelul unor receptori specifici (de pe suprafața plantelor, ca și de pe tegumente și mucoasele organismelor animale).

La bacteriile Gram negative, prezența unor structuri suplimentare conferă noi funcții peretelui celular; astfel:

Membrana externă - funcționează ca o barieră suplimentară de permeabilitate, ca o sită moleculară ce oprește pătrunderea unor molecule ce depășesc o anumită masă,

- conține proteine de transport: **porine** și sisteme active de transport, specifice (permeaze);
- are acțiune antifagocitară, având efect chimiotactic negativ asupra fagocitelor sau opunându-se contactului cu membrana acestora și contribuind astfel, indirect, la virulența bacteriilor patogene;
- prezintă proteine receptori cu funcții specifice de înglobare a anumitor substanțe - vitamina B₁₂, maltoză, maltodextrine, fier (proteine specifice de chelare și transport al fierului în celule, numite generic siderofori);
- prin LPS, mai exact prin Antigenul „O”, bacteriile capătă personalitate biochimică și imunologică, care permite identificarea serogrupurilor bacteriene (de ex., la *Salmonella sp.*, au fost identificate peste 65 de serogrupuri);
- Lipidul A are acțiune toxică fiind numit și endotoxină, care este termostabilă și determină, în cazul eliberării masive în circulație în infecțiile sistemice sau generalizate așa-numitul șoc endotoxic caracterizat prin: febră mare, colaps circulator, coagulare intravasculară diseminată (C.I.D.), ceea ce determină o conduită terapeutică diferențiată în cazul infecțiilor sistemice cu bacterii Gram negative. Lipidul A având o structură înalt conservată, aceste fenomene patologice sunt aceleași indiferent de specia bacteriană implicată. Spre deosebire de exotoxine, endotoxinele sunt termostabile, proprietate care are implicații de ordin practic.

Spatiul periplasmic – este considerat un compartiment pericelular adaptativ, în care are loc degradarea enzimatică a nutrienților cu g.m. mare la molecule mai mici, care aflându-se în vecinătatea membranei, sunt transportate integral (prin mecanisme de transport pasiv sau activ) și utilizate în celula bacteriană în metabolismul energetic sau de biosinteză al acesteia. Prezenta acestui spațiu conferă bacteriilor Gram negative o **eficiență mai mare a procesului de nutriție**, creșterea acestor bacterii fiind favorizată în mediile sărace în nutrienți sau *oligotrofe*, cum sunt mediile acvatiche, în general.

Bacteriile încadrate în Cls. *Mollicutes*, cu genul reprezentativ *Mycoplasma* sunt bacterii lipsite de perete celular (în mod natural). Sunt cele mai mici bacterii cunoscute capabile de creștere pe medii acelulare; membrana plasmatică a micoplasmelor are un caracter unic printre bacterii, în sensul că aceasta conține steroli care protejează celula de șocul osmotic și îi conferă un polimorfism accentuat; datorită dimensiunilor mici și lipsei peretelui celular celulele traversează majoritatea filtrelor bacteriologice. Există specii de micoplasme saprotrofe, comensale și parazite la om și animale (implicit patogene) - de o manieră unică, respectiv micoplasmele sunt paraziti de suprafața ai celulelor gazdei, fiind tolerate la acest nivel datorită asemănării structurale a membranelor celulelor animale și micoplasmelor.

Indepărtarea peretelui celular bacterian. S-a demonstrat în condiții de laborator că după îndepărtarea peretelui celular cu ajutorul lizozimului se obțin **protoplaști** în cazul bacteriilor Gram pozitive și *sferoplaști* în cazul bacteriilor Gram negative, acestea prezentând încă resturi de perete celular. Protoplaștii bacterieni sunt sensibili la variațiile presiunii osmotice, păstrând însă o serie de proprietăți ale celulelor bacteriene, cum ar fi: capacitatea de sinteză proteică și a acizilor nucleici și de reacții ale metabolismului energetic, iar viabilitatea lor se poate menține, fiind posibil chiar procesul de diviziune, iar în anumite condiții poate avea loc procesul de regenerare a peretelui celular și trecerea la forma vegetativă normală; protoplaștii pot realiza chiar replicarea unui bacteriofag dacă celula bacteriană a fost infectată în prealabil. Forme de protoplaști există și în mediul natural, mai ales în organismul animal, dar și la periferia coloniilor bătrâne și în anumite medii acvatiche.

Aplicații practice. Între metodele circumscrise tehnologiei ADN-recombinant este inclusă și **tehnica fuziunii de protoplaști**, o tehnică prin care se obțin *in vitro* celule hibride (bacteriene, ca și celule hibride fungice sau vegetale); protoplaști aparținând la două specii diferite sunt expuși acțiunii unor substanțe fuziogene, de tipul PEG și în prezența ionilor de Ca⁺⁺; în aceste condiții celulele se apropie, stabilesc interacțiuni de tipul proteină-proteină, iar fosfolipidele membranare se asociază prin fenomenul de

coalescență. Fuziunea de protoplasti s-a realizat mai ales la bacteriile Gram pozitive, dar și la unele bacterii Gram negative.

Fuziunea de protoplaști este *un fenomen de sexualitate artificială* pentru că are loc cu fuziunea în întregime a genomurilor bacteriene și poate avea loc între specii foarte îndepărtate taxonomic, care nu prezintă mecanisme de transfer genetic realizate în mod spontan, făcând astfel posibilă recombinația genetică cu depășirea barierelor de specie și chiar de gen. Între celulele aparținând unor specii înrudite, procentul de recombinanți este mare.

Scopul și avantajele acestei tehnici sunt: *tehnica fuziunii de protoplaști* permite obținerea de celule ce conțin tranzitoriu informația genetică de la două celule în întregime, iar în final, prin recombinație genetică se obțin celule cu o informație genetică provenită de la celulele de origine, într-o măsură mai mică sau mai mare; tehnica se practică cu scopul obținerii bacteriilor cu proprietăți super-utile pentru biotehnologii de obținere a unor produși de interes sau pentru obținerea unor celule cu calități ce avantajează anumite procese biotehnologice.

Structura și funcțiile componentelor intraparietale

Membrana plasmatică. Este o formațiune structurală permanentă, care delimitează ansamblul constituenților celulari, cu diametrul de 7,5 – 8 nm, alcătuită dintr-un dublu strat fosfolipidic (la arhee lipsesc grupările fosfat), în care sunt inclavate proteine situate pe fața externă, internă sau transmembranar. La unele specii de arhee membrana este unistratificată. Din, din punct de vedere funcțional, membrana plasmatică a bacteriilor prezintă o asimetrie, fiind frontiera între mediul extern și intern.

De menționat în ceea ce privește compoziția chimică, este faptul că lipsesc sterolii (cu excepția micoplasmelor și a unor specii de arhee hipertermofile care conțin molecule *sterol-like*, cu structura pentaciclică, numite opanoizi). Membrana plasmatică a bacteriilor prezintă toate proprietățile plasmalemei celulelor eucariote, ceea ce a determinat adoptarea și pentru bacterii a modelului „mozaicului fluid al membranei„ (Singer & Nicholson, 1972). Datorită fluidității moleculelor dublului strat fosfolipidic, acestea își schimbă permanent poziția, pe același strat cu viteză mare prin mișcări de difuzie laterală și de pe un strat pe celălalt, prin mișcări flip-flop.

Funcțiile proteinelor membranare:

- proteinele enzimatică participă la biosinteza învelișurilor celulare, ce asigură creșterea celulelor, ca și *turnover*-ul componentelor (hidrolaze);
- proteinele de transport – preiau substanțe nutritive din mediu și le introduc în celule;
- proteinele ce formează sistemele transportoare de electroni, cu rol în respirația celulară (ex., citocromi);
- ATP-aza – cu rol în metabolismul energetic.

Funcțiile membranei plasmatică:

- înveliș celular;
- barieră osmotică, impermeabilă pentru unele molecule și permeabilă pentru altele: molecule liposolubile, filiforme, glucoză, ioni;
- sediul sinergonului respirator și fotosintetic (la nivelul membranei și invaginărilor sale);
- suportul chemotaxiei prin prezența *chemoreceptorilor* ce leagă molecule atractive sau repelente, cu rol în semnalizare și deplasarea orientată a bacteriilor = chemotaxie;
- sediul unor procese metabolice, cum ar fi sinteza exoenzimelor și exotoxinelor, sintetizate de ribosomii legați de fața internă; se consideră că procesele de formare a structurii secundare și terțiare a acestor proteine de tip special au loc la nivelul membranei sau pe fața sa externă.

Citoplasma bacteriilor

Citoplasma celulelor bacteriene este un sistem coloidal complex cu conținut variabil și compus din proteine (mai ales enzime), glucide, lipide, săruri minerale și apă (în proporție de 70-80%), care determină și presiunea osmotică a mediului intern. Citoplasma se află într-o stare permanentă de gel pentru a putea

menține materialul nuclear lipsit de membrană nucleară într-o stare compactă și are o structură granulară datorită prezenței ribosomilor cu conținut crescut în ARNr, ceea ce explică bazofilia intensă a citoplasmei. Alte caracteristici ale citoplasmei bacteriilor: este lipsită de curenți intracitoplasmatici (proprietate corelată cu starea permanentă de gel) și de un citoschelet, desi, mai nou, se consideră că și la bacterii ar fi prezentă o formă rudimentară de citoschelet, format dintr-o proteină contractilă similară actinei. Citoplasma mai poate conține și structuri neesentiale, cum ar fi vacuole și incluziuni (granulații).

Când celulele bacteriene sunt supuse unui stres osmotic sunt afectate reacțiile metabolice și implicit procesele de creștere și multiplicare.

NUCLEOIDUL

Informația genetică a celulelor bacteriene este localizată în *nucleoid* sau *nucleosom* - **de tip PK**, respectiv **fără membrana nucleară** și localizat într-o zonă a citoplasmei numită nucleoplasmă; este o structură esențială, ce nu poate fi observată prin microscopie optică, prin colorarea cu metode simple sau diferențiale, datorită colorării omogene a celulelor cu coloranți bazici, bazofilia intensă datorându-se conținutului bogat în ARN al citoplasmei. La microscopul optic nucleoidul poate fi evidențiat prin digestie enzimatică; de ex., în celulele bacteriene supuse acțiunii RN-azei sau hidrolizei acide, se observă o zonă centrală opacă, ce corespunde ADN-ului nedigerat și o zonă periferică clară. La microscopul cu contrast de fază, celulele apar cu o zonă centrală mai clară cu filamente subțiri, paralele, ondulate, aceasta fiind macromolecula de ADN. În raport cu celula de tip eucariot, celula procariota prezintă un contrast invers, datorită numărului mare de ribosomi și cantității mari de ARN din citoplasma. La microscopul electronic de transmisie (MET) pe secțiuni ultrafine se evidențiază o regiune electronotransparentă ce corespunde nucleoidului – fibrile de ADN impachetate și o regiune electronodensă ce corespunde citoplasmei, bogată în particule ribosomale și lipsită de organite membranare.

Cu ajutorul unor tehnici speciale, din corpusculul central s-a extras materialul nuclear și s-a demonstrat existența unui singur cromosom, la celule aflate în stare de repaus. În prezent, se cunosc și excepții de la această regulă, unele specii prezentând 2 cromosomi (de ex., ag. patogen al holerei - *Vibrio cholerae* (2 crs.), ca și specia fitopatogenă - *Agrobacterium tumefaciens* (1 crs. circular și 1 linear).

Cromosomul bacterian este format dintr-o moleculă de ADN dublu catenară, circulară, covalent închisă (d.c.c.c.î.). Circularitatea moleculei este obligatorie, pentru că astfel este protejată de acțiunea endonucleazelor, este reglat procesul de replicare și se creează constrângeri topologice care determină o anumită tensiune în molecula de ADN, favorizând acțiunea topoizomerazelor ce modifică topologia moleculei. În ultimul deceniu, au fost evidențiați și cromosomi (*Borrelia burgdorferi* și *Streptomyces sp.*), ca și plasmide lineare. Aceste elemente genetice lineare prezintă secvențe repetate invers la capetele lor și proteine (secvențe denumite *invertroni*) la capetele 5' care protejează moleculele de acțiunea enzimelor specifice.

La *E. coli*, molecula de ADN are $L = 1360 \mu\text{m}$, în timp ce lungimea celulei este de $3 \mu\text{m}$. Genomul ocupă un spațiu de $1 \mu\text{m}^3$, conține aprox. 4000 gene, g.m. = $2,5 \times 10^9 \text{Da}$; diametrul moleculei de ADN este de 2,5 nm. Datorită constrângerilor topologice, molecula circulară suferă procese de pliere, supraspiralizare și suprapunere, pentru ca în final molecula să fie compactă și totuși funcțională. În structura fizică a moleculei intervin topoizomerazele și anume, giraza determină suprarăsucirea moleculei, iar alte enzime sunt implicate în derularea moleculei compacte, mai precis a acelor secvențe de ADN necesare a fi transcrise și traduse, în funcție de condițiile în care se afla celula la un moment dat.

Din punct de vedere chimic, cromosomul poate fi disociat în următoarele componente: ADN – 60-80 %; ARN – ARNm (în curs de sinteză), ARNr; proteine – ARN-polimeraza, topoizomeraze, proteine asociate nucleoidului (diferite de histone).

S-a demonstrat că moleculele de ARN și proteine nu sunt asociate doar funcțional cromosomului, ci au rol și în împachetarea acestuia. Modelul de împachetare (Stonington și Pettijohn, 1971) demonstrează că prin închiderea moleculei, aceasta își reduce diametrul la $350 \mu\text{m}$, apoi sub acțiunea topoizomerazelor molecula suferă o pliere (engl. *foldings*) în ~ 50 domenii sau bucle, diametrul reducându-se la $30-35 \mu\text{m}$, prin

suprarăsucirea (*supercoiling*) domeniilor diametrul se reduce la 3 μm , iar prin suprapunerea acestora la 1 μm . Spiralizarea moleculei se realizează cu ajutorul topoizomerazelor.

Compactizarea moleculei se face astfel încât asigură totuși transcrierea genelor vitale. S-a demonstrat că acest corpuscul este o structură dinamică, existând și porțiuni laxe (bucle în citoplasmă), care reprezintă secvențe de ADN funcțional, gene în curs de transcriere, pentru biosinteza proteinelor.

La bacterii procesele de transcriere și traducere sunt cuplate, având loc în citoplasmă.

Din punctul de vedere al gradului de ploidie *celula bacteriană este haploidă*, caracter contestat de unii cercetători care au observat 2, 3, 4 mase nucleare (cromosomi), aparență datorată faptului că cele 2 mase nucleare nu sunt independente, ci legate prin punți de ADN foarte fine. Structura genetică a bacteriilor trebuie raportată la condiția normală, fiziologică a celulei bacteriene, care are de regulă 1 cromosom și este haploidă. Condiția normală este cea în care diviziunea celulei bacteriene este perfect reglată, existând o corelație perfectă între ritmul de replicare al cromosomului și procesul de diviziune celulară. În condiții speciale (medii bogate în nutrienți) apare un decalaj între ritmul de replicare al cromosomului și cel de creștere și diviziune (viteză mare de replicare). Celula încearcă să compenseze această situație prin inițierea unor cicluri suplimentare de replicare a ADN, apărând mai multe bifurcații de replicare. În celulă nu există 2 sau 4 cromosomi replicați, ci un cromosom cu n furci de replicare, expresia unui fenomen de amplificarea genică pentru determinanții din apropierea originii replicării.

Structura genetică a cromosomului bacterian. Din punct de vedere molecular, cromosomul bacterian este numit și *genoform* sau *lineom*, denumiri care se referă la fenomenul de colinearitate a genelor, informația genetică fiind continuă, astfel că și biosinteza proteinelor va fi diferită față de cea din celulele eucariote, datorită faptului că din molecula de ADN bacterian lipsesc secvențele non-informaționale sau intronii. Sunt consemnate excepții și de la această regulă (de ex. în Dom. *Archaea* – genele pentru ARNt de la halofile și hipertermofile, de asemenea unele cianobacterii). Există situsuri de atașare la membrana plasmatică, regiuni corespunzătoare originii replicării cromosomului și punctului terminus al replicării.

Unitatea genetică de structură și funcție este reprezentată de *operon*. De ex., la *E. coli* cromosomul este compus din ~ 4000 de gene, din care 90% sunt gene structurale, care codifică structura primară a proteinelor (succesiunea aminoacizilor). Nu toate aceste gene sunt funcționale în același timp, fiind supuse proceselor de reglare prin inducție și represie enzimatică.

În organizarea cromosomului bacterian există regiuni corespunzătoare genelor reglatoare, de tipul promotorilor și operatorilor. Diferite gene structurale sunt dispuse în ordinea ce corespunde ordinii în care produsele lor intră în acțiune într-o cale metabolică. La eucariote, astfel de gene pot fi situate pe cromosomi diferiți, fiind coordonată exprimarea lor de secvențe genice care alcătuiesc un *reglon*.

Reglarea sintezei enzimelor la bacterii prin inducție și represie enzimatică a fost explicată pe modelul *operon*, elaborat de Jacob și Monod (distinși cu premiul Nobel pentru Medicină în 1965). În general genele structurale care codifică enzimele care intervin într-o cale metabolică sunt supuse controlului unei regiuni de reglare împreună cu care alcătuiesc un operon:

- **genele de reglare** codifică substanțe de tipul *represorilor* și funcționarea lor determină stoparea activității genelor din regiunea operator a cromosomului;
- **regiunea operator** – funcționează ca receptor de semnale, sesizând prezența în mediu a represorilor și inductorilor (funcționează similar unui comutator tip *on/off*);
- **regiunea promotor** – adiacentă regiunii operator, corespunde zonei în care are loc inițierea transcrierii informației genetice realizată de ARN-polimeraza, care se leagă de această regiune.

Represia este un mecanism care diminuează sinteza enzimelor, care se manifestă când celulele sunt expuse unui produs final al unei căi metabolice, condiții în care are loc o scădere a ratei de sinteză a enzimelor implicate în sinteza unui produs final. De ex., celulele de *E. coli* cultivate pe un mediu lipsit de aminoacizi, sintetizează enzime necesare căilor de sinteză a aminoacizilor necesari sintezei proteinelor specifice. Introducerea unui aminoacid în mediu, va scădea sinteza enzimelor necesare producerii aminoacidului respectiv. Enzimele a căror sinteză este redusă în prezența produsului final se numesc *enzime represibile*, iar substanța care determină represia este numită *corepresor* (= produs final).

Inductia este mecanismul invers prin care se sintetizeaza enzimele necesare metabolizarii unui substrat prezent in mediu. Exemple de mecanisme inductibile: genele pentru sinteza enzimelor necesare pentru metabolizarea lactozei, organizate în operonul „*lac*„. Dacă bacteriile sunt cultivate pe un mediu cu lactoză, prin inducție vor produce o cantitate mare de β -galactozidază, o enzimă inductibilă, sintetizată în prezența lactozei, acest substrat nutritiv acționând ca un inductor al genei structurale. Similar, se produce sinteza penicilinazei (β -lactamaza) la bacteriile rezistente la penicilină.

Există modalități de reglare a exprimării genelor, care reglează și metabolismul celulei, prin transcrierea și traducerea genelor ce codifica enzime metabolice; se realizează astfel direcționarea sintezei proteice. Prin mecanisme de control (inducție și represie) este reglată sinteza și nu activitatea enzimelor dintr-o cale metabolică. Represia prin produs final nu acționează asupra unor enzime preexistente, ci produsul final inhibă sinteza de noi molecule de enzime, **deci controlul se realizează la nivel genetic**, aceasta fiind deosebită de inhibiția tip *feed-back*, cu care se aseamănă parțial.

Inducția și represia reprezintă mecanisme adaptative, cu rol în supraviețuirea celulei care nu consumă energie pentru sinteza unor enzime care nu sunt necesare în momentul respectiv, astfel că reglarea exprimării genelor este esențială pentru economia energetică a celulei, fiind o cale de conservare a energiei.

Există gene care nu sunt supuse represiei, acestea fiind răspunzătoare de sinteza enzimelor necesare indiferent de cantitatea de nutrienți din mediu. Aceste gene și enzimele a căror sinteză o codifică se numesc *constitutive* – enzimele respective fiind necesare celulelor în cantități constante pentru desfășurarea proceselor vitale (de ex., respirație celulară).

Funcțiile materialului nuclear :

- 1) Conține informația genetică esențială existenței bacteriilor în mediul natural (pentru arhitectura celulei, metabolism, sinteza enzimelor ce intervin în reacțiile de biositeză și în metabolismul energetic);
- 2) Codifică structura mecanismelor de reglare prin structuri operaționale de tip operon;
- 3) Conține informația necesară pentru replicare și ereditate, cu asigurarea potențialului de creștere și diviziune celulară;
- 4) Asigură potențialul de variabilitate și evoluție prin căi complexe: capacitatea de mutagenză, de reparare a erorilor, prin mecanisme de transfer de material genetic și de integrare a plasmidelor (prin conjugare), a genelor fagice (prin transducție), a fragmentelor de ADN cromozomal /plasmidial (transformare) și a elementelor genetice transpozabile (secvențe de inserție și transpozoni).

Plasmidele sunt structuri intracitoplasmice, invizibile la microscopul optic, care pot fi evidențiate la M.E.T. Conțin **informație genetică extracromosomală, accesorie**, de confort sau de lux, îmbunătățind condițiile de viață ale bacteriilor și adaptarea la mediu; reprezintă 1-5 % din cromosom, fiind numite și minicromosomi. Sunt structuri moleculare fizic independente de cromosom, constituite din molecule de ADN d.c.c.c.î., cu dimensiuni mai mici, cu excepția plasmidelor lineare ale unor specii de actinobacterii.

Semnificația biologică generală a plasmidelor

Plasmidele (F, R, col, de patogenitate și virulenta, metabolice) conferă proprietăți noi celulelor bacteriene și posibilitatea adaptării rapide la mediu. În același timp reprezintă o sursă de variabilitate genetică, cu implicații în evoluția bacteriilor, deoarece plasmidele integrate în cromosom sunt transmise prin diviziune descendenților, împreună cu genele cromosomale. O semnificație deosebită au plasmidele cu caracter de conjugon, care pot fi transferate interspecific și intergeneric. Datorită acestor plasmide conjugative există un flux genetic, prin care se pierd și se câștigă continuu noi proprietăți, proces controlat cromosomal și cu implicații în variabilitatea genetică și evoluția bacteriilor.

Adaptarea genetică la un mediu variabil poate fi interpretată ca o strategie de supraviețuire mediată de plasmide. Bacteriile „împrumută gene” sub presiunea selectivă a mediului. Se poate vorbi deci de o evoluție pe orizontală, responsabilă de marea variabilitate genetică și plasticitate metabolică a bacteriilor.

Ribozomii

Sunt structuri esențiale, invizibile la microscopul optic, vizibile doar la microscopul electronic cu transmisie (MET), fiind uniform dispersate în citoplasma care are un aspect granular și prezentându-se ca formațiuni sferic-ovalare cu $\varnothing = 20 - 25\text{nm}$, aspect care s-a dovedit a nu corespunde formei reale.

Ribozomii bacterieni au constanta de sedimentare 70 S.

Din punct de vedere chimic, ribozomii sunt structuri ribonucleoproteice, alcătuite din 2 subunități: subunitatea mică de 30S și subunitatea mare de 50S, cea mică având forma unui receptor de telefon așezat pe subunitatea mare (structura chimică și morfologia au fost determinate prin tehnici de mare finețe – biochimice, imunologice, cristalografie în raze X). **Cele două subunități pot fi asociate**, stare în care ribozomii sunt funcționali (în prezența ionilor de Mg^{2+}) **sau disociați**, fiind dispersate în citoplasmă (la scăderea concentrației de Mg^{2+}). Subunitățile ribosomale conțin:

Subunitatea mică: 1 moleculă ARNr 16S*;

21 molecule de proteine S** ($\text{S}_1\text{-S}_{21}$; S, de la engl. *Small* = mic).

Subunitatea mare: 2 molecule ARNr: 23S și 5S;

34 molecule de proteine L ($\text{L}_1\text{-L}_{34}$; L, de la engl. *Large* = mare).

* Molecula de ARNr 16S, datorită originii sale vechi și structurii înalt conservate, este considerată o moleculă semantoforetică sau *semantidă* (gr. *semantikos* = înțeles, semnificație), deci purtătoare de sens/ semnificație.

** Cele 55 de molecule de proteine au rol structural și funcțional unic; de ex., S_1 - participă la legarea ribozomilor de molecula de ARNm; S_6 - la legarea N-f-Met-ARNt; S_2 , S_3 , S_{14} - la legarea aminoacil - ARNt.

În formarea arhitecturii subunităților, moleculele ARNr au rol cheie - rol de matrită în primele faze ale asamblării, de ele atașându-se în poziții fixe proteinele ribosomale între care există interacțiuni proteină - proteină, astfel încât cele 2 subunități au o conformație sterică bine conturată și prezintă zone complementare care facilitează asocierea lor, ca și situsuri pentru atașarea moleculelor de ARN mesager și de transport. Aranjarea fixă a moleculelor constitutive, conform unor scheme de la care nu există abateri, explică asamblarea rapidă a ribozomilor, în funcție de necesitățile de moment ale celulei. Astfel, o celulă metabolic activă poate sintetiza până la 500 de ribosomi/minut, în timp ce numărul total de ribozomi variază între 15.000 - 100.000/celulă.

Funcția ribozomilor: funcția lor esențială este cea de traducere a informației genetice transcrisă în ARNm, ribozomii fiind considerați adevărate "fabrici de proteine" și puncte de întâlnire a diferiților constituenți implicați în proteosinteză. Ambele procese, transcrierea și traducerea informației genetice, la bacterii au loc în citoplasmă și sunt cuplate (datorită lipsei membranei nucleare). Biosinteza proteinelor este un proces complex în cursul căruia informația conținută în ADN, transmisă la ribosomi prin intermediul ARNm, este tradusă într-o secvență polipeptidică prin asamblarea aminoacizilor într-o ordine specifică, înscrisă în mesajul genetic (diataxie celulară). Procesul de proteosinteză decurge cu o mare fidelitate. Fiecare ribosom are două situsuri de legare: situsul A (*aminoacyl attachment*) și situsul P (*peptidil*). Moleculele de ARNt aduc aminoacizii așezându-i în pozițiile corespunzătoare (situsul A), între aminoacizi se formează legăturile peptidice rezultând molecule polipeptidice în curs de sinteză, translocate la situsul P. În ansamblu, ribozomii sunt structuri dinamice ce au rolul de a menține matrită de ARNm, cât și aminoacil-ARNt într-o orientare corespunzătoare pentru a asigura citirea corectă a informației genetice (pe baza complementarității codon-anticodon) și formarea legăturilor peptidice, sub influența enzimei peptidil-transferaza. Procesul are loc cu consum de energie, rezultată din hidroliza GTP.

În celulele cu metabolism intens, care la un moment dat necesită de ex. cantități mari ale aceleiași enzime sau alte tipuri de proteine, se formează *poliribosomi*, care sunt asociații de 5 - 50 ribosomi, la nivelul cărora are loc sinteza concomitentă a mai multor lanțuri polipeptidice. Există ribosomi liberi în citoplasmă la nivelul cărora se sintetizează proteine intracelulare, ca și ribosomi asociați cu fața internă a membranei plasmatică, la nivelul cărora se sintetizează proteinele "de export" (de ex., exoenzime și exotoxine).

Semnificație practică. Secvențierea și compararea secvențelor moleculelor de ARNr 16 S provenite de la specii bacteriene diferite sunt la ora actuală tehnici utilizate în studiile taxonomie bacteriană și filogenie la nivel molecular.

Endosporul bacterian.

Endosporul (= spor de origine endogenă) a fost considerat o formă tipică și unică de spor la bacterii. Reprezintă o structură de rezistență și adaptare a bacteriilor la condiții nefavorabile de mediu, asigurând astfel supraviețuirea speciei și fără rol în multiplicare. În prezent, se cunosc și alte tipuri de spori bacterieni, dar cu particularități și funcții diferite de cele ale endosporului (de ex., la actinobacterii se formează spori de propagare/diseminare, cu rol în multiplicarea bacteriilor).

Endosporul este considerat o formă primitivă de citodiferențiere la procarite, o celulă diferențiată în interiorul unei celule vegetative, o structură cu capacități speciale de rezistență la factori de mediu nocivi, datorită unor particularități structurale și chimice.

Sporogeneza (capacitatea de a forma endospori) este un proces foarte diferit de ciclul de viață vegetativ al celulei bacteriene, controlat genetic, prezent la anumite bacterii Gram pozitive, deoarece formarea sporului este asociată cu producerea unui înveliș gros, bogat în mureină (peptidoglican). Procesul de sporogeneză este limitat la o serie de eubacterii numite *sporogene* din grupul bacililor, proces obligatoriu prezent la speciile genului ***Clostridium* (bacterii anaerobe)**, frecvent la speciile aparținând genurilor ***Bacillus* (bacterii aerobe)**, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum* (bacili incurbați, anaerobi, din grupul fiziologic al bacteriilor sulfatreducătoare) și foarte rar întâlnit la coci (ex. *Sporosarcina*). Bacteriile sporogene sunt prezente mai ales în sol (practic, orice probă de sol conține spori) și sedimentele acvatic.

Endosporul este foarte diferit de celula vegetativă, numită și sporangie, în care se formează, fiind rezultatul unor modificări structurale, chimice, biochimice și biologice ce caracterizează *sporogeneza* sau formarea sporului; celula vegetativă este considerată celula activă metabolic, pe când sporul este o formă inertă, inactivă din punct de vedere metabolic (stare de *criptobioza*).

Evidențierea microscopică a sporului se poate face ocazional pe preparate proaspete datorită refringentei foarte mari, pe frotiuri colorate (prin metoda coloratelor simple sau prin metoda coloratelor diferențiale Gram) ca zone incolore (învelișurile sporale fiind impermeabile pentru coloranți și alte substanțe chimice în condiții obișnuite) sau pe frotiuri colorate prin metode selective care permit colorarea sporului. Se pot observa și spori liberi, după liza resturilor celulelor vegetative. Sporii sunt structuri sferic-ovalare (cu dimensiuni cuprinse între: 0,5 – 0,9 x 1- 1,5 μm). Dimensiunile, forma și poziția sporului sunt caracteristici de specie și au un rol important în identificare.

Particularitățile structurale și de compoziție chimică explică rezistența lor la temperaturi ridicate, substanțe chimice, radiații.

Din punct de vedere structural, endosporul conține următoarele structuri:

1. *protoplastul sporul* sau citoplasma sporului, diferențiată în *nucleoplasma* (zona în care se afla materialul genetic - ADN) și *sporoplasma*;
2. *cortexul sporul* – un înveliș sporul gros, alcătuit din peptidoglican modificat în timpul procesului de sporogeneză (echivalentul peretelui celular), ce contribuie în mare măsură la marea rezistență a sporului;
3. *învelișuri sporale externe* (*intina* și *exina*) – multistratificate, în funcție de tipul de spor; sunt de natură proteică, cu un conținut bogat în aminoacizi cu sulf ce formează punți disulfidice și o structură *keratin-like*, foarte rezistentă la factorii chimici;
4. *exospor* – de natură lipoproteică; prezintă filamente suspensoare care ancorează miezul sporului de învelișul extern, provenit din celula vegetativă;
5. *apendice sporale* - prezent la unele tipuri de spori, cu rol în diseminarea acestora și în preluarea nutrienților în perioada germinării.

Din punct de vedere biochimic, sporul se caracterizează prin:

- absența unor enzime cu importanță fundamentală într-o celulă activă metabolic (enzimele ciclului Krebs și lanțului transportor de electroni);
- prezența unui număr redus de enzime ce pot fi (1) sintetizate *de novo* (formate în timpul sporularii) sau (2) provenite din celula vegetativă, caz în care derivă prin clivarea partilor laterale, cu păstrarea situsului catalitic;
- conținut mare de aminoacizi cu sulf;

- cantitate mare de ioni de Ca^{2+} și Mg^{2+} ;
- prezența acidului dipicolinic, sub forma **dipicolinatului de Ca^{2+} , marker biochimic pentru PK**;
- absența sintezei de macromolecule, inclusiv de ARNm (absent sau prezent în cantitate mică);
- starea apei – conținutul în apă este similar cu cel al unei celule vegetative, predominând însă apa legată de diferite structuri, în timp ce apa liberă este prezentă în cantitate mică (3-4%);

Prin urmare, endosporul este o celula metabolic inactivă și rezistentă la orice factori de stres.

Sporogeneza este declanșată în principal de absența nutrienților din mediul de viață, deci în condiții de înfometare sau *starvație* (C, N, P). Celula vegetativă se transformă în *sporange* în care au loc o succesiune de modificări, în 7-8 etape. Fiecare stadiu de formare a sporului este codificat de alte gene (50 – 200 de gene sporogene), iar procesul odată amorsat este ireversibil.

La revenirea condițiilor favorabile de mediu, spori germinează. **Germinarea** este procesul de reversie a endosporului la starea vegetativă și are loc în 3 stadii:

- activarea – implică deteriorarea învelișurilor sporale și se produce spontan
- germinarea propriu-zisă – necesită apă și un agent de germinare (aminoacizi, diferiți ioni) - învelișurile sporale se gelifică într-o anumită regiune sub influența unei enzime sporolitice care determină hidroliza cortexului, favorizată de un număr mic de legături încrucișate în stratul extern de peptidoglican; se pierd ioni de Ca^{2+} și încetează starea de latență și de rezistență a sporului, celula vegetativă iesind din învelișurile sporale;
- creșterea – revenirea celulei bacteriene la condiția normală, care într-un mediu nutritiv bogat are loc rapid – începe sinteza de ARNm, proteine, de ADN și celula își dublează volumul inițial; peretele celular se reface pe membrana celulei sporale.

Semnificația biologică a endosporului bacterian.

Sporogeneza reprezintă o strategie adaptativă a bacteriilor, pentru a supraviețui în condiții nefavorabile de mediu, neavând rol în multiplicare; endosporul este considerat în prezent o formă primitivă de citodiferențiere la procariote. Starea de latență metabolică sau criptobioză determină rezistența sporilor la temperaturi de peste 100 până la 180°C, uscăciune (desicatie) și radiații UV, la substanțe antimicrobiene (antiseptice, antibiotice). Deci endosporul poate fi considerat o formă de conservare a speciei, dovedită de longevitatea mare a acestor structuri; de ex., în soluri nelucrate, spori își mențin viabilitatea timp de zeci și chiar sute de ani, iar în roci sedimentare chiar mai mult; au rol și în diseminarea bacteriilor în natură, fiind omniprezenți în sol, praf și sedimente acvatic.

Importanța practică. Descoperirea și descrierea endosporilor au reprezentat momente esențiale în dezvoltarea microbiologiei experimentale, ceea ce a permis dezvoltarea unor metode adecvate de sterilizare pentru medii de cultură, alimente, produse farmaceutice și alte produse perisabile (controlul microbiologic fiind obligatoriu în cazul acestor produse); la stabilirea parametrilor fizici menționați în protocolul acestor metode s-a ținut cont în primul rând de particularitățile endosporului bacterian.

Importanța medicală este ilustrată de faptul că **unele bacterii patogene sunt sporogene**, cum ar fi: *Clostridium botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens*, aceste bacterii anaerobe prezentând **un circuit enteroteluric**, în sensul că se multiplică în intestin, fiind apoi eliminate și ajungând în apele uzate și sol, unde supraviețuiesc sub formă de spori. Aceste specii produc toxine puternice, ce determină boli specifice: botulism alimentar (intoxicatie, determinată de ingerarea de toxina preformată în alimente incorect sterilizate), tetanos și respectiv gangrena gazoasă.

Importanța industrială – mai exact, pentru *industria alimentară*, deoarece spori pot fi cauza alterării alimentelor sterilizate sau păstrate incorect, la care se adaugă și riscul de intoxicații (botulism alimentar) și T.I.A. (*C.perfringens*); pentru *industria farmaceutică* - unele proprietăți biologice ale bacteriilor sunt asociate cu anumite faze ale sporogenezei, cum ar fi producerea de antibiotice: polimixina, bacitracina, gramicidina (*Bacillus sp.*), ca și producerea de proteinaze.

În agricultură - bacteriile numite „entomocide” prezintă importanță prin capacitatea lor de a sintetiza cristale parasporale, de natură proteică, cu calitate de pretoxină; această formă inactivă poate fi activată la pH-ul alcalin = 10 din tubul digestiv al insectelor, la care determină fenomenul de paralizie, de unde imposibilitatea hrănirii și moartea consecutivă. Culturi sporulate de *B. thuringiensis* sunt folosite pentru combaterea

biologica a insectelor (larve de lepidoptere defoliatoare, țânțari), cu scopul înlocuirii insecticidelor chimice, cu remanenta mare în organismul animal/uman, dar și în sol, cu efect poluant.

Specia anaeroba sporogena *Clostridium pasteurianum* este în același timp și fixatoare de azot, cu rol important în fertilitatea /îmbogățirea în azot a solurilor profunde sau inundate.

În afară de bacteriile sporogene – bacterii Gram pozitive, prezente ca spori mai ales în sol (și la care s-a demonstrat un circuit enteroteluric), **celelalte bacterii, nesporogene**, beneficiază și de **alte mecanisme de protecție față de uscăciune, radiații** (capsulă și glicocalix, pigmenți accesorii, plasmide R etc.). În general, la schimbarea bruscă a condițiilor de mediu numărul bacteriilor se reduce drastic, dar supraviețuiește o parte (în microhabitate, sedimente, biofilme), capabilă apoi la revenirea condițiilor favorabile de mediu, să refacă populația.

La bacteriile Gram negative acvatice s-a descris un mecanism de protecție la condițiile de înfometare, reprezentat de o modificare structurală și metabolică – celulele vegetative intră într-o stare de starvație, transformându-se în celule dormante numite *ultramicrobacterii*, celule sferice cu diametrul de aprox. 0,3 μm, care pot supraviețui ca celule în suspensie timp de luni și ani de zile.

Structurile bacteriene /microbiene extraparietale (capsula, glicocalix, pili, fimbrii) sunt structuri accesorii, cu rol adaptativ, de regula de natura polizaharidică, mai rar polipeptidică, motiv pentru care sunt încadrate în conceptul integrator de E.P.S (*extracellular polymeric substances*). Aceste structuri intervin în relațiile microorganismelor cu mediul biotic și abiotic, toate fiind incluse în categoria generică a *adezinelor*, numite astfel pentru că mediaza *aderența* bacteriilor/microorganismelor la diferite suprafețe sau substraturi din mediu, vii sau neanimate și dezvoltarea de *biofilme*, comunități bacteriene/ microbiene mono- sau polispecifice, cu o semnificație deosebită din punct de vedere medical, ecologic și industrial / biotehnologic.

Biofilm = o comunitate microbială sesilă compusă din celule care sunt în mod ireversibil atașate la un substrat, la o interfață sau unele de altele, care sunt înglobate într-o matrice de substanțe polimerice extracelulare produse de către aceste celule și care prezintă un fenotip modificat, în privința ratei de creștere și a transcrierii genelor.

Biofilme microbiene = comunități mono- /multispecifice (consortii) = expresia cea mai de succes și mai competitivă a genomului procariot (celule eficiente metabolic și bine protejate ⇒ rezistența la condiții de stres (inclusiv la substanțele antimicrobiene); rezistența celulelor înglobate în biofilme (în matricea acestora, constituită din exopolizaharide microbiene) este comportamentală și numită mai nou *toleranta*, pentru a o diferenția de cea codificată genetic (gene de rezistență, plasmidiale sau cromozomale). În cadrul biofilmelor interacțiunile sunt atât celulă - substrat, cât și celulă – celulă. Acestea din urmă permit pe de o parte, o mai mare acumulare de celule, ceea ce este important mai ales pentru bacteriile cu creștere lentă, iar pe de altă parte, distribuția lor spațială poate iniția interacțiuni metabolice și schimburi de gene între diferitele celule bacteriene, ceea ce determină o *adaptare fiziologică rapidă* la mediu.

Deoarece s-a observat că celulele imobilizate au randamentul cel mai mare de producere a reacțiilor de biosinteză sau de catabolism, în prezent există metode de stimulare a aderenței microorganismelor (bacterii, levuri) la suprafața unui bioreactor, pentru producerea unor substanțe de interes cu randament sporit prin metode biotehnologice.

Flagelul bacterian. Flagelii bacterieni sunt organele de locomotie filamentoase (lat. *flagellum* = bici), unice sau multiple, care asigură mobilitatea și chemotaxia procariotelor. Sunt echivalentul cililor și flagelilor de tip eucariot, dar, spre deosebire de aceștia (care au o structură sintetizată în formula $(2 \times 9 + 2)$ tubuli), flagelii bacterieni sunt tubulari, cu lungime variabilă (20-70 μm) și constituiți dintr-o proteină specifică numită *flagelina*. Morfogeneza flagelului este un proces complex, controlat de gene numeroase (>40): *fla*, *fli*, *flg*.

Prezența/absența, numărul și aranjarea flagelilor sunt caracteristici de specie, utile taxonomiei bacteriene; astfel există bacterii neflagelate sau atriche, bacterii flagelate cu flageli polari (unici – mono- și

bipolari sau in manunchiuri, respectiv bacterii monotriche, amfitriche, lofotriche) si flageli pericelulari (celule peritriche).

Datorită diametrului mic (in medie 20 nm), la microscopul optic se evidentiaza doar prin tehnici speciale de colorare, bazate pe îngrosarea filamentului flagelar prin depunere de coloranti, dar la MET flagelul se evidentiaza ca o structura cu arhitectura complexa, fiind alcatuit din: *filament, cârlig și corp bazal*.

- (1) **Filamentul** este o structura semirigida helicala si tubulara ($\text{Ø} = 3\text{nm}$). Unitatea structurala de baza a filamentului este o proteina specifica globulara, respectiv monomerii de flagelina, sintetizati in celula si depusi la extremitatea libera a flagelului, dupa o simetrie helicala, prin autoasamblare.
- (2) **Carligul** este tubular, curbat, are rol de articulatie flexibila universala (denumirea sugereaza ca aceasta structura are echivalent in tehnica). Flexibilitatea permite filamentului sa aiba o asezare perpendiculara pe suprafata peretelui celular si rotirea in asociatie a flagelilor multipli. Cârligul face legatura intre filament si corpul bazal al flagelului. Mecanismul articulatiei cârlig - filament permite rotatia cu 360° a filamentului, care se mișcă asemenea unei elice, aceasta miscare rotatorie fiind un caz unic in biologie.
- (3) **Corpul bazal** consta dintr-un ax conectat la carlig si o serie de discuri care ancoreaza flagelul de peretele celular si membrana plasmatica; are rol determinant in mobilitatea bacteriilor prin inducerea rotatiei filamentului. Corpul bazal are o structura diferita la bacteriile Gram-pozitive (2 discuri suprapuse) si Gram-negative (4 discuri suprapuse).

Toate discurile sunt strabatute de piesa centrala cilindrica numită *ax*, care se continua cu carligul.

In jurul discurilor MS-C se ataseaza lateral molecule de proteine *Mot*, formând un manson in jurul discurilor, care functioneaza generând cuplul motor pentru rotatia flagelului, pus in miscare de forta proton motrice (rezultata din procese chemo-osmotice). Fluxul de H^+ din membrana plasmatica strabate canalul dintre proteinele *Mot* si discurile bazale si le incarca electrostatic, proteinele *Mot* având rol de stator al motorului rotativ si imprimând rotatia corpului bazal. Proteinele *Fli* actioneaza ca un comutator al motorului care imprima flagelului fie o miscare de rotatie in sensul acelor de ceasornic, fie invers, ca si oprirea rotatiei flagelului si deplasarii celulei bacteriene. Fluxul de ioni dintre stator si rotor este de regula un flux de H^+ , dar poate fi si un flux de ioni de Na^+ la bacteriile care traiesc in medii alcaline. Filamentul se roteste ca o elice, cu pâna la 40.000 rotatii/minut, propulsând celula. Viteza relativa de deplasare a bacteriilor (raportata la lungimea corpului lor) este foarte mare, fiind de 20-80 $\mu\text{m}/\text{sec}$, de 50 ori sau mai mult fata de lungimea corpului, depasind viteza oricarui animal terestru sau acvatic.

In functie de semnalele receptionate din mediu (substante atractante si repelente) si prelucrate intracelular, este elaborat un raspuns comportamental, discurile MS-C imprimând rotatia flagelului intr-un sens sau celalalt.

Functia flagelului este asociata fenomenului de **chemotaxie**, de deplasare orientata a bacteriilor in functie de gradientul de concentratie al diferitelor substante din mediu. Nutrientii, O_2 (pentru bacteriile aerobe) reprezinta substante atractante, determinând apropierea bacteriilor, iar substantele potential daunatoare, repelente, determina indepartarea bacteriilor.

Chemotaxia la bacterii asigura raspunsuri comportamentale specifice actionate chimic, al caror suport structural este asigurat de prezenta *chemoreceptorilor* din membrana plasmatica – proteine senzoriale metil-acceptoare ce actioneaza ca transductori de semnale (proteine transmembranare). Semnalele ajung la o proteina *transductor* din membrana plasmatica si apoi la o proteina citoplasmatica *reglator* a raspunsului, care influenteaza activitatea flagelului.

S-a demonstrat ca flagelul este un organit care percepe contactul cu o suprafata datorită încetinerii sau opririi rotației sale, mecanismul transmiterii acestui semnal fiind inca necunoscut, dar implicat in semnalizarea intracelulara si reglarea exprimarii genelor. Asa se explica de exemplu, modificarea exprimarii genelor la celulele aderente la un substrat (celular sau inert). Pentru intelegerea acestui mecanism de semnalizare este esențiala identificarea parametrilor interfeței solid- lichid care să fie suficient de diferiți în raport cu mediul lichid, pentru a informa bacteria de contactul cu suprafata, cum ar fi osmolaritatea mediului sau pH-ul extracelular, pentru receptionarea carora se utilizează aceleași căi.

Functiile flagelului:

- mobilitatea și chemotaxia sunt supuse reglării și au valoare adaptativă; flagelul și chemoreceptorii/senzorii au capacitatea de a converti stimulii senzoriali în răspunsuri comportamentale;
- fototaxia bacteriilor fotosintetizante poate fi considerată ca un precursor al sistemelor vizuale;
- factor de virulență la bacteriile patogene:
 - rol antifagocitar (prin evitarea contactului cu membrana fagocitelor și înglobării de către acestea);
 - rol în aderența la substratul celular sensibil, indirect, prin faptul că favorizează străbaterea stratului de mucus, bacteriile ajungând astfel în contact cu celulele epiteliale ale mucoaselor și aderând la receptorii specifici (de ex., *Helicobacter pylori*).
- rol de Ag în identificarea serologică.

Metabolismul microbial

Reprezintă totalitatea reacțiilor biochimice implicate în activitățile biologice ale microorganismelor, prin care acestea preiau din mediu energie și elemente chimice biogene (ca atare sau sub forma unor combinații) și le utilizează în reacții de biosinteză, în reacții de biodegradare și producere de energie, ca și pentru creștere și alte activități fiziologice (transport transmembranar, mobilitate, bioluminescență etc.).

Substanțele sunt preluate din mediu prin procese de *transport pasiv* sau *activ* (cu consum de energie) și după natura lor, sunt transformate în constituenți celulari, produși de metabolism ce pot fi secretați), energie. Aceste reacții metabolice se desfășoară la microorganisme în general și la bacterii în special, cu respectarea unui principiu fundamental în biologie, respectiv principiul economiei și optimalității sau al eficienței maxime, însemnând că reacțiile decurg cu consum minim de energie și utilizarea sa maximă pentru biosinteze, din care rezultă un număr mare de celule în unitatea de timp. Multiplicarea rapidă și consecutiv existența în număr foarte mare reprezintă condiția fundamentală pentru supraviețuirea în natură, fiind principalul mecanism de competiție cu alte organisme asociate, ca și de rezistență față de condițiile nefavorabile de mediu.

Metabolismul este un proces ciclic autoreglat, datorită unor reacții chimice speciale de reglare a ritmului de producere a reacțiilor diferitelor căi metabolice, cu rol în menținerea stabilității celulelor.

Căile metabolice

Sunt secvențe de reacții metabolice în mai multe trepte, fiecare treaptă fiind catalizată de o enzimă specifică. În cadrul unei căi metabolice, substratul metabolic este transformat în produși intermediari și aceștia în produs final. O cale metabolică individuală se poate manifesta în mai multe moduri: linear, ciclic sau ramificat.

Metabolismul microbial se realizează pe 2 căi metabolice principale:

- ✓ reacții de *catabolism* = *biodegradare*, cu eliberarea de energie = reacții exergonice;
- ✓ reacții de *anabolism* = *biosinteză*, realizate cu consum de energie = reacții endergonice.

Din punct de vedere funcțional, cele 2 tipuri de căi metabolice sunt interconectate, deoarece energia și o parte din produșii rezultați din reacțiile de catabolism sunt folosiți ca energie și produși intermediari în reacțiile de anabolism. Prin urmare, căile metabolice centrale care eliberează energie, pot furniza și precursori pentru alte căi metabolice, aceste căi fiind numite *căi amfibolice* (auxiliare).

Căile anaplerotice sunt tot căi auxiliare ce apar atunci când desfășurarea unei căi metabolice principale este blocată datorită utilizării produșilor intermediari în alte căi metabolice. Căile anaplerotice au o semnificație deosebită fiind căi de reprovizionare cu produși intermediari, rezultați dintr-o altă cale, a unei căi metabolice principale, evitând blocarea acesteia.

Funcționarea și interacțiunea celor patru tipuri de căi sunt perfect coordonate în celulă, astfel încât aceasta să funcționeze cu randament optim.

I. Căile catabolice = Catabolismul = Metabolismul energetic

Căile catabolice = de dezsimilație = catabolismul reprezintă o succesiune de reacții biochimice implicate în degradarea nutrienților și eliberarea de energie necesară pentru funcționarea celorlalte căi metabolice și altor activități fiziologice ale celulei.

Căile catabolice au loc în 3 faze succesive (Kornberg, 1965):

Faza 1: macromoleculele sunt descompuse enzimatic în unități de bază: proteinele → AA, lipidele → acizi grași și glicerol, glucidele → monoglucide;

- are loc frecvent la exteriorul celulei bacteriene, fiind realizată de exoenzime. Din aceste reacții se eliberează ~1% din energia totală a macromoleculii, inaccesibilă celulei, fiind eliberată sub formă de căldură.

Faza 2: moleculele rezultate în faza precedentă sunt degradate incomplet, eliberând 1/3 din E totală, cu producerea, în afară de $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, a unui număr mic (12) de produși de importanță esențială în metabolism, numiți *intermediari metabolici ai căilor metabolice centrale*. Acești compuși sunt aceiași la toate organismele, o dovadă a unității metabolice în lumea vie. De ex., aminoacizii sunt utilizați pe căi diferite și catabolismul lor conduce la formarea de acetyl-CoA sau intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici = ciclul Krebs.

Faza 3: se derulează diferit, în funcție de tipul respirator al microorganismului considerat, astfel:

- la microorganismele aerobe, care pot degrada substratul integral până la $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, calea majoră de desfășurare și eliberare de energie este ciclul Krebs, cuplat cu fosforilarea oxidativă și eliberarea unei mari cantități de energie, stocată în ATP.

- microorganismele anaerobe (sau în lipsa relativă a O_2 molecular), urmează calea fermentației (alcoolică, lactică, butirică, propionică etc.) ai cărei produși de degradare servesc ca donori sau acceptori de electroni și H^+ în reacții de oxido-reducere cuplate, care eliberează o cantitate mică de energie (η mic). Degradarea se face printr-o serie de reacții în care o substanță D cu rol de donator de e^-/H^+ se oxidează și o altă substanță A cu rol de acceptor de e^-/H^+ se reduce.

Procesul de degradare a nutrienților prin reacții de oxidoreducere biologică se numește *respirație celulară*.

II. Căile anabolice = Anabolismul = Metabolismul de asimilație sau de biosinteză

Căile anabolice sunt căi a căror evoluție este în direcție inversă celor catabolice. Reprezintă totalitatea reacțiilor biochimice prin care microorganismele își sintetizează din molecule simple constituenții celulari proprii. Pot fi utilizați și intermediari ai căilor metabolice centrale.

Se sintetizează 2 categorii de macromolecule:

- de rezervă (depozit) alcătuite din monomeri de același tip (glicogen, amidon s.a.);
- macromolecule esențiale pentru sistemele biologice, specifice, codificate genetic (proteine, acizi nucleici).

Sinteza macromoleculor este foarte eficientă și se face sub acțiunea informației genetice codificată în ADN. Celula bacteriană sintetizează mai întâi monomeri (AA, baze azotate) pe care îi aranjează ulterior într-o ordine specifică, dictată genetic, care determină structura primară a macromoleculor respective, prin procesul de *diataxie celulară*; procesul este realizat cu mare fidelitate. Periodic, apar accidente de tipul mutațiilor care pot determina formarea de molecule nefuncționale, dar în momentul diataxiei sunt recunoscute și se evită legarea lor. Sinteza macromoleculor din molecule mici, asigură o mare eficiență a sintezelor.

Specificitatea biologică constă în aranjarea diferită a unui număr limitat de monomeri (unități de structură: 20 AA, 5 baze azotate) pentru a forma un număr impresionant de macromolecule biologice cu structuri și funcții diferite.

Particularități specifice metabolismului microbial

Înainte se considera, pe baza dimensiunilor mici și a relativei simplități structurale, că metabolismul ar fi rudimentar. Cercetările moderne de biochimie au demonstrat caracterul asemănător al căilor metabolice centrale la toate formele de viață, microorganismele folosind căi metabolice comune. Majoritatea căilor metabolice principale au fost descoperite întâi la microorganismele și ulterior au fost extrapolate la organismele superioare. Cu toate acestea, la bacterii se manifestă căi metabolice unice în lumea vie: fixarea biologică a N_2 atmosferic, respirația anerobă, sinteza anumitor antibiotice, fotosinteza anoxică.

Deși asemănător cu metabolismul organismelor superioare, metabolismul bacterian (microbian în general) prezintă câteva particularități generale:

- **Natura și diversitatea nutrienților folosiți** – ceea ce diferențiază microorganismele (M.O.) în general și bacteriile în special este capacitatea lor de a folosi o gamă imensă de substanțe, mergând de la cele anorganice simple, la substanțe organice complexe, inclusiv unele chiar cunoscute ca fiind inhibitorii ale creșterii. Ex.: acizi (formic, oxalic, sulfuric), lignină, chitină, celuloză, antibiotice, fenoli, asfalt, petrol, parafine, materiale plastice, de sinteza chimică în general. Deci pot folosi chiar substanțe de sinteză chimică sau așa-numitele substanțe xenobiotice. Astfel că M.O. sunt considerate *organismele cele mai tipic omnivore cunoscute*. Această particularitate explică faptul că, deși în natură s-au depus cantități imense de substanță organică moartă, produși de excreție, ca și deșeuri ale activității umane, acestea nu s-au acumulat ci, după descompunerea lor de către M.O., au fost reintroduse în circuitul elementelor biogene. S-a dovedit că substanțele organice greu biodegradabile, pot fi degradate mai ales de către M.O. în asociații de tipul biofilmelor polispecifice, aderente la suprafețe (inclusiv sedimentelor acvatic), a căror activitate metabolică este mai diversă și mai eficientă, comparativ cu cea a celulelor planctonice.

La bacterii apar diferențe individuale, unele specii bacteriene pot utiliza foarte mulți nutrienți (ex. *Pseudomonas fluorescens*), iar altele sunt specializate în utilizarea numai unui anumit substrat; există și grupuri fiziologice de bacterii: celulozolitice obligate – utilizează ca sursă de C doar celuloza, bacterii fixatoare de N₂ atmosferic, b. metilotrofe – utilizează doar compuși C₁.

- **Plasticitatea metabolismului bacterian** – se referă la capacitatea bacteriilor de a folosi surse alternative de nutrienți. Bacteriile utilizează preferențial anumite surse de carbon, azot, dar în lipsa acestora utilizează substraturi alternative, sinteza enzimelor necesare fiind indusă de prezența acestor substraturi. Plasticitatea conferă microorganismelor capacitatea de a se adapta la tipul și cantitatea nutrienților, mergând pe principiul maximei economii și având la baza existența unui echipament enzimatic foarte complex. Ex.: *E.coli* folosește preferențial Glu și AA dacă acestea există în mediu. În cazul în care în mediu există simultan AA și NH₄⁺, atunci folosește AA ca sursă de N și NH₄⁺ ulterior.
- **Diversitatea mecanismelor enzimatică și a produșilor rezultați** – bacteriile, microorganismele în general, nu au o cale metabolică pentru un produs, ci au căi alternative multiple pentru a se adapta condițiilor de mediu variate; apar și căi metabolice ocolite sau șunturi, fiecare cale conducând la producerea altor compuși. Ex.: degradarea glucozei se face pe mai multe căi: EMP, HMP, ED și FC, în funcție de condițiile de mediu:

(a) calea Embden-Meyerhoff-Parnas (E.M.P.) = ciclul glicolizei;

(b) calea hexozomonofosfaților (H.M.P.);

(c) calea Entner-Doudoroff;

(d) calea fosfocetolazei.

Primele două sunt prezente și la organismele superioare, iar ultimele 2 doar la bacterii. În toate aceste căi piruvatul ocupă poziția unui intermediar cheie, deoarece este situat la punctele de intersecție a căilor metabolice.

a. Calea EMP – calea majoră de degradare a glucozei la majoritatea microorganismelor, ca și la organismele eucariote vegetale și animale. Este o cale anaerobă, prezentă însă nu doar la bacteriile strict anaerobe, ci și la organismele aerobe, în lipsa parțială a oxigenului molecular (așa se explică utilizarea termenului de glicoliză, în loc de fermentație). Cuprinde o secvență de 10 reacții enzimatică prin care o moleculă de glucoză este degradată la 2 molecule de piruvat. Spre deosebire de celulele animale la care glucoza este transformată în acid lactic, la microorganismele acest mod de evoluție este prezent doar la bacteriile lactice homofermentative, în timp ce alte microorganismele folosesc calea până la piruvat, apoi se formează acetaldehida și în final etanol. Această cale nu explică modul de sinteză și utilizare a pentozelor ca sursă de E, ca și pentru sinteza acizilor nucleici. Din punct de vedere al randamentului energetic, este calea majoră de sinteză de ATP, prezentă la microorganismele aerobe și anaerobe crescute pe medii complexe.

b. Calea HMP = suntul hexozofosfaților sau calea pentozofosfaților, este o cale aeroba de degradare a Glu și de ocolire a EMP. Mai puțin eficientă (se produce ½ din cantitatea de ATP rezultată din calea glicolizei), este o cale folosită pentru sinteza precursorilor acizilor nucleici (pentozofosfații necesari sintezei nucleotidelor) și pentru obținerea de NADPH₂ ca putere reductoare, folosit în alte cai metabolice.

c. Calea ED – este prezentă doar la bacteriile strict aerobe și la unii viermi paraziti, fiind legată parțial de șuntul HMP, dar poate funcționa și independent. A fost descrisă la *Pseudomonas sp.*. Cale independentă de EMP, prin care rezultă ATP + NADPH₂. Se obțin intermediari de degradare ai glucidelor care pot fi utilizați și în calea EMP sau HMP. Furnizează precursori pentru biosinteza ADN, ARN, vitamine, acizi aromatici. Aceste 3 cai pot funcționa alternativ sau în combinații.

d. Calea FC – descrisă la *Leuconostoc mesenteroides* (bacterie lactica heterofermentativă). Rezultă 1 ATP, primele 3 reacții sunt comune cu HMP, fiind o variantă a acestei cai. Enzima implicată = fosfoacetolază, ce scindează acetil-fosfatul din compusi C₅ sau C₆.

La majoritatea MO există a,b,c,d alternativ, în funcție de necesități. Caile sunt interconectate și au o serie de enzime, etape sau produși intermediari comuni. Unele MO, folosesc în mod normal, preferențial, anumite cai, în timp ce altele în funcție de condițiile de cultivare folosesc cai alternative de degradare.

- **Intensitatea metabolismului bacterian (microbian în general)** – este excepțional de mare, în raport cu cea a activităților omologe ale organismelor superioare. Această proprietate decurge dintr-o proprietate structurală, respectiv din raportul mare dintre suprafață și volum (S/V>). Suprafața mare de contact cu mediul și de absorbție a nutrienților determină intensitatea mare a reacțiilor metabolice (de biosinteză și de biodegradare) și implicit viteza mare de multiplicare, aceasta fiind însăși strategia de supraviețuire a M.O. în natură, respectiv existența în număr foarte mare, pentru a putea compensa pierderile datorate variației factorilor abiotici, ca și relațiilor antagoniste cu alte specii.

Alte cauze incriminate: a) varietatea mare a reacțiilor pe care le pot realiza; b) raportul mic dintre cantitatea de material genetic/citoplasmă; c) activitatea enzimatică foarte ridicată a unor sisteme enzimatic bacteriene, comparativ cu cele provenite din țesuturile vegetale sau animale.

Intensitatea se manifestă atât în reacțiile de biodegradare a nutrienților, cât și în reacțiile de biosinteză. Capacitatea enormă de biosinteză, în special de proteine, explică și capacitatea mare de creștere și multiplicare a microorganismelor, cu aplicații practice în biotehnologie: drojii și bacterii producătoare de proteine monocelulare (produse de organisme unicelulare): S.C.P. (engl. *Single Cell Proteins*) sau S.C.B. (engl. *Single Cell Biomass*).

De ex., randamentul sintezei proteice la diferite organisme, apreciat comparativ (val. arbitrării):

bovine = 1, soia = 10, drojii = 10⁵, bacterii = 10¹¹.

Această intensitate mare se datorează mai multor cauze, între care și raportului S/V>.

Alte avantaje: - 1) valoare nutritivă crescută, proteine cu aminoacizi esențiali; 2) se produc în spații mici, sinteza este continuă în bioreactoare; 3) nu blochează terenuri agricole; 4) folosesc substraturi nutritive ieftine, uneori reziduuri ale diferitelor industrii.

Nutriția microorganismelor

Microorganismele au nevoie pentru creștere și multiplicare, ca și pentru alte manifestări ale activității lor biologice, de aceleași elemente biogene întâlnite în structura oricărui sistem biologic, diferențiate în:

Bioelemente majore: C, O, H, N, S, P, K, Mg, Ca, Fe – primele 6 elemente reprezintă 95% din greutatea uscată a bacteriilor și au roluri esențiale, din punct de vedere structural și funcțional, celelalte sunt cofactori enzimatici; Ex.: S – intră în structura aminoacizilor cu S, a endosporului, a unor coenzime;

P – intră în structura nucleotidelor, acizilor nucleici, a fosfolipidelor, a acizilor teichoici;

Bioelemente minore: Zn, Mn, Na, Cl, Mo, Se, Co, Cu, W, Ni- necesare în cantități reduse;

ex:- Zn și Mn intră în structura ADN și ARN –polimerazelor, fosfatazei alcaline;

- Zn intră în structura SOD la celulele EK + cofactor enzimatic;
 - Mo – intră în structura nitrogezei (enzima ce catalizează reacția de reducere a N₂ atmosferic de către bacteriile fixatoare de azot).
-

Pentru anabolism, microorganismele trebuie să găsească în mediu nutrienți, respectiv sursa de C (energie) și o sursă de N, elemente esențiale pentru sinteza moleculelor specifice: proteine, acizi nucleici. Deoarece mediul înconjurător nu poate furniza întotdeauna toți compușii necesari, microorganismele folosesc o serie de compuși intermediari rezultați din metabolismul energetic: acid piruvic, acetyl-CoA, α -cetoglutarat, gliceraldehid-3-P. Microorganismele realizează procesul de nutriție prin asimilarea surselor de C și N.

Nutriția MO după natura sursei de C utilizate

In funcție de acest criteriu, nutriția microorganismelor poate fi:

- nutriție autotrofa – CO₂ este utilizat ca unică sau principală sursă de C celular;
- nutriție heterotrofă (organotrofă) – substanțele organice = sursă de C și E.

Autotrofia = în concepția clasică reprezintă tipul de metabolism caracteristic organismelor capabile să crească în absența oricărui compus organic. Corespunde capacității de biosinteză a tuturor metabolitelor esențiale (având un echipament enzimatic complex) pornind de la substanțe anorganice simple (CO₂ – folosit ca unică sau principală sursă de C celular și N sub formă de NH₃, NO₃⁻, NO₂⁻, N₂), săruri minerale și apă.

Se diferențiază după natura sursei de energie utilizate în:

- fotoautotrofe – utilizează E luminoasă și oxidează compuși anorganici reduși ai S și H₂;
- chimioautotrofe – obțin E necesară din oxidarea unor compuși anorganici reduși ca: NH₃, NO₂⁻, compuși ai sulfului, fierului sau hidrogen.

Sub raportul capacității lor de biosinteză, autotrofele sunt cele mai complete, având enzime ce asigură producerea constituenților celulari de la CO₂ pe seama oxidării unor substraturi anorganice.

Microorganismele autotrofe au fost clasificate în:

- **autotrofe obligate** – care fixează CO₂ ca principală sursă de C, pe calea ribulozodifosfatului (ciclul Benson-Calvin), utilizând o substanță anorganică redusă ca sursă de E dacă sunt chemotrofe sau ca donori de e⁻, dacă sunt fototrofe, deci pot fi:
 - **chemolitotrofe** – obțin toată E necesară prin oxidarea unor compuși anorganici ai S, NH₃, ionilor de NO₂⁻, Fe²⁺ sau hidrogenului molecular;
 - **fotolitotrofe** – utilizează E luminoasă, asociată cu oxidarea compușilor reduși ai S sau H₂.
- **autotrofe facultative** – au o adaptabilitate metabolică mai mare, mergând de la creșterea autotrofă, până la cea heterotrofă.

Conceptul actual de autotrofie (Schlägel, 1975) consideră că definitiv pentru autotrofe este faptul că sunt capabile de a sintetiza substanța celulară de la CO₂ ca sursă principală de C, putând utiliza ocazional și substanțe organice.

Deci, în prezent, conceptul de autotrofie este mult mai larg, incluzând printre autotrofi atât microorganismele care asimilează CO₂ pe calea ciclului Calvin, dar și microorganismele care pot asimila compuși cu 1 atom de C (CH₄, CH₃-OH, CH₃-NH₂) = microorganismele metilotrofe, pe care îi asimilează pe calea ciclului ribulozo-monofosfatului și ciclului serinei. În realitate, microorganismele sunt facultativ autotrofe, iar heterotrofele, la rândul lor, au capacitatea de a se adapta la utilizarea unor compuși anorganici atunci când cei organici lipsesc.

Heterotrofia – este caracteristică microorganismelor incapabile de a folosi molecule simple și C anorganic pentru sinteza metabolitelor esențiale, astfel încât este necesar să îi obțină din mediu. Microorganismele heterotrofe nu se pot dezvolta decât pe medii cu substanțe organice folosite ca sursă de C și N, fiind numite și organotrofe.

Metabolismul prototrof – un tip de nutriție primordial, caracteristic bacteriilor de tip sălbatic, cu capacități de sinteză normale, ce presupun un echipament enzimatic complex și un grad mare de independență față de mediu. În laborator se dezvoltă pe medii minimale. Bacteriile prototrofe pot suferi mutații, devenind **auxotrofe**, respectiv defective pentru o cale metabolică, astfel că nu mai pot sintetiza un

anumit compus și nu mai pot crește decât dacă acesta este adăugat în mediu. Substanțele care compensează incapacitățile de sinteză ale auxotrofelor sunt numite factori de creștere sau vitamine microbiene și sunt necesare în cantități mici. De ex., aminoacizi, purine și pirimidine, grupări prostetice ale unor enzime.

Practica a demonstrat că aceste criterii de clasificare nu epuizează marea varietate a modalităților de nutriție la microorganisme, care nu trăiesc izolat ci în asociații. Populațiile microbiene nu sunt decât foarte iar monospecifice (în condiții de mediu cu variații extreme, cum ar fi temperaturi foarte mari, presiuni hidrostatice mari, condiții de pH extreme etc.), ci polispecifice, condiții care determină și asocierea unor procese metabolice.

Heterotrofia implică grade diferite, la limita extremă fiind cele care nu mai pot folosi decât substanțe organice specifice, pe care le iau din organisme vii, pe care le parazitează.

În toate ecosistemele naturale există fluctuații ale concentrației nutrienților și energetice, față de care microorganismele își modulează permanent rata reacțiilor producătoare de energie (prin reglajul genetic al sintezei enzimelor implicate – inducție/represie) pentru a fi în acord cu reacțiile consumatoare de energie și a asigura supraviețuirea celulelor.

Oxigenul – Tipurile de respirație celulară la microorganisme (MO)

Clasificarea MO pe baza efectului direct al O₂ asupra creșterii și metabolismului

Oxigenul este un alt constituent universal al celulelor vii, furnizat în primul rând de nutrienți și de apă din mediul natural/de cultură. Din cauza solubilității sale reduse, oxigenul molecular aflat în soluție este utilizat repede de bacteriile aerobe, astfel că densitatea atinsă de o cultură este limitată de rata de difuzie a O₂ prin interfața aer/apă. Pentru necesități de ordin practic, pe baza efectului pe care O₂ îl exercită asupra metabolismului și creșterii MO-lor, acestea se diferențiază în 4 tipuri:

- 1) **MO strict sau obligat aerobe** – care au nevoie absolută de O₂ atmosferic și sunt incapabile să trăiască în anaerobioză. Respirația celulară = respirația aerobă.

Ex.: *Bacillus sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, mucegaiuri.

- 2) **MO strict sau obligat anaerobe** – care nu se pot dezvolta în prezența O₂ și care pot fi cultivate doar în medii sărace în O₂, deoarece chiar la presiuni jase, O₂ poate avea efect inhibitor, toxic. Respirația celulară = respirație anaerobă.

Ex.- **exclusiv bacterii** - *Clostridium* (*C. botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens*), *Bifidobacterium sp.*, *Bacteroides sp.*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* etc.

- 3) **MO aerobe, facultativ anaerobe** – care își pot orienta metabolismul în funcție de disponibilitatea O₂ în mediu, spre respirație sau fermentație. Unele (bacteriile lactice) desfășoară un metabolism de tip fermentativ chiar în prezența O₂, altele își orientează metabolismul spre respirație sau fermentație, în funcție de condițiile de mediu; de ex., *E.coli* (ca și toate speciile incluse în Fam. *Enterobacteriaceae*), *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, levurile (*Saccharomyces sp.*, *Candida sp.* etc.).

- 4) **MO microaerofile** – au nevoie de cantități extrem de mici de O₂. Această particularitate reflectă prezența unor enzime ce sunt inactivate în condiții de oxidare puternică și care pot fi menținute în stare funcțională numai la presiuni relative ale O₂ reduse (~0,2 atm). Respirație aerobă, cu tendință spre respirație anaerobă/ fermentație.

Ex.: *Spirochaetales*, *Thiobacteriales*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*.

Nevoia de O₂ reflectă mecanismul molecular prin care microorganismele își satisfac nevoile energetice, reflectă deci tipul de metabolism energetic.

Metabolismul energetic al microorganismelor

Sistemele biologice sunt dependente de obținerea energiei prin cuplare chimică cu reacțiile oxidative. Reacțiile metabolice, ca toate reacțiile chimice, se împart în cele 2 mari categorii:

- reacții exergonice;
- reacții endergonice .

Reacțiile exergonice, producătoare de E, sunt reacții potențial spontane și corespund tranziției de la o stare mai instabilă, cu un conținut mai mare de energie chimică, la o stare mai stabilă, cu conținut de E mai mic.

Reacțiile endergonice, consumatoare de E, au loc numai cu un aport de E și nu sunt spontane; în celule, reacțiile endergonice au loc datorită cuplării lor cu reacții exergonice care conferă sistemului, în ansamblu, un caracter exergonic. În unele cazuri această cuplare necesită prezența unui purtător intermediar obligatoriu, cum ar fi cazul cuplării reacțiilor de dehidrogenare cu cele de hidrogenare. De multe ori însă, cuplarea se realizează prin sinteza în reacțiile exergonice a unui compus cu potențial macroergic și utilizarea sa în cele endergonice. Acest intermediar, reprezentat de regulă de ATP, poate servi ca transductor de E, practic pentru cele mai multe reacții, endergonice și exergonice. În cursul metabolismului lor, microorganismele realizează o serie de transformări de energie, care condiționează activitățile lor biologice esențiale, ca de ex.:

- conversia E luminoase în E chimică;
- „ E chimice în E chemoosmotică (a unui gradient de H⁺)= protonmotrice;
- „ E chimice (ATP) în alte forme de E: calorică, mecanică, electrică.

Tipurile de metabolism energetic

Importanța generală a metabolismului energetic în viața microorganismelor, a surselor de E, a donozilor de H și e-, a acceptorului final de e-, în procesele producătoare de E, a determinat utilizarea acestora drept criterii de clasificare și nomenclatură a principalelor tipuri de metabolism energetic.

I. Clasificarea microorganismelor după natura sursei de E folosite:

- microorganismele fototrofe sau fotosintetizante;
- microorganismele chemotrofe sau chemosintetizante.

Fototrofia - energia folosită în reacțiile de biosinteză este energia fonică, datorită capacității microorganismelor de a o converti în E chimică, sub forma legăturilor macroergice din ATP.

Chemotrofia – energia folosită în biosinteză este cea eliberată din reacții biochimice de oxidoreducere. Microorganismele sunt numite chemosintetizante = chemotrofe.

Bacteriile chemotrofe aparțin **grupului *Scotobacteria*** (gr. *scotos* = întuneric), fiind bacteriile care nu depind de energia luminoasă.

II. Clasificarea microorganismelor în funcție de natura donozilor de e- și H⁺

În funcție de donozii de e-/H⁺ microorganismele pot fi:

- **litotrofe** – donozii de e- și H⁺ sunt substanțe anorganice simple oxidabile, cum ar fi H₂, H₂S, ionii ferosi, nitrit sau NH₃ pe care îi oxidează la H₂O, SO₄²⁻, Fe³⁺, NO₃⁻, în reacții exergonice cuplate cu sinteza de ATP;

- **organotrofe** – donozii de e- și H⁺ sunt substanțe organice oxidabile.

În definiția completă a tipului de metabolism se ține cont și de sursa de C. Prin combinarea criteriilor de clasificare (surse de C, E și natura donozilor de e- și H⁺) rezultă tipurile de metabolism (tabel nr. 2).

Tabel nr. 2. Principalele tipuri de metabolism la microorganismele.

Tip de metabolism energetic/nutriție	Sursa de E	Sursa de C	Donor de e ⁻ și/sau H ⁺	Exemple
Foto-lito-autotrofă	E luminoasă	CO ₂	H ₂ O, H ₂ S, S ⁰ , H ₂	Cianobacterii, anoxifotobacterii: <i>Chromatium</i> <i>Chlorobium</i>
Foto-organo-heterotrofă	E luminoasă	Substanțe organice, rar CO ₂	Substanțe organice	<i>Rhodospirillum</i> sp.
Chemo-lito-autotrofă	Oxidarea substanțelor anorganice	CO ₂	NH ₃ , NO ₂ ⁻ , H ₂ S, S ⁰ , Fe, H ₂	Bacterii nitrificatoare, sulfooxidante, ferobacterii, H-bacterii
Chemo-organo-heterotrofă	Oxidarea substanțelor organice	Substanțe organice	Substanțe organice	-majoritatea bacteriilor, -microfungi(levuri, mucegaiuri), -protozoare

Clasificarea microorganismelor în funcție de natura acceptorului final de e-

În funcție de natura acceptorului final de e-, microorganismele pot avea 3 tipuri de metabolism energetic, respectiv de respirație celulară:

- 1) Respirație aerobă - acceptorul final de e- este O₂;
- 2) Respirație anaerobă - acceptorul final de e- -alte substanțe, cu excepția O₂.
- 3) Fermentație - acceptorii finali de e- sunt substanțele organice.

Respirația celulară

Procesul de degradare a nutrienților prin reacții redox = respirație celulară.

Respirația celulară se caracterizează prin 2 mecanisme:

- eliberarea fracționată a E – are loc în mai multe trepte, prin intermediul unor reacții redox succesive catalizate de enzimele respiratorii din membrana plasmatică = **sistem transportor de e⁻ = catena de respirație celulară**. Aceste enzime transportă e⁻ și H⁺ de la substanțele Donor la cele Acceptor pe calea unui lanț de reacții cuplate.
- E eliberată în reacții redox este înmagazinată într-un produs din care, la nevoie, poate fi eliberată. Acest produs este un compus organic cu P, iar înmagazinarea E se face sub forma unei legături cu E mare = legătura macroergică; cel mai important stocator de E= ATP (2 legături asemănătoare), dar mai există și alți compuși: ADP, UTP, GTP, acetilfosfat, acetil CoA, fosfoenolpiruvat.

Reacțiile de oxidoreducere și rolul lor în metabolismul energetic

Microorganismele își procură energia necesară pentru creștere și alte activități biologice prin reacții de oxidare, care sunt de 3 tipuri principale:

- Reacții de oxidare prin simplă pierdere de e- (de ex., Fe²⁺ → Fe³⁺ + e⁻ + E);
- Reacții catalizate de dehidrogenaze, care comportă în același timp, pierdere de e- și H⁺, ca de ex., oxidarea alcoolilor la aldehide :
$$R-CH_2-OH \rightarrow R-CHO + 2H^+ + 2e^- + E$$
- Reacții de oxidare cu câștig de O₂ de către substrat, ca de ex., oxidarea aldehydelor la acizi : R-CHO + H₂O → R-COOH + 2H⁺ + 2e⁻ + E.

1. Respirația aerobă

Este un tip de respirație celulară în care **acceptorul final de e- este O₂**.

Este un proces metabolic exergonic, de oxidare completă a substratului cu ajutorul O₂, din care se eliberează o cantitate mare de energie. Substratul donor de e⁻ și H⁺ poate fi reprezentat de substanțe anorganice (în cazul litotrofelor) sau organice (în cazul organotrofelor), acestea din urmă fiind oxidate complet la CO₂ + H₂O. Prin respirație se realizează degradarea oxidativă a compușilor cu un potențial energetic ridicat, de ex. glucoza. Electronii și H⁺ rezultați din degradarea substratului sunt transportați la O₂ prin intermediul unui sistem de enzime localizate la nivelul membranei (la PK) sau mitocondiilor (la EK), cu rol de transportori ce alcătuiesc sistemul transportor de e⁻ = catena de respirație celulară (mai multe oxido-reduceri succesive în urma cărora se eliberează E și se stochează ATP). Modul de formare a ATP prin cuplarea cu reacții redox = **fosforilare oxidativă**.

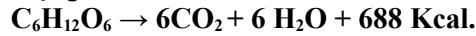
Sistemul transportor de e⁻ este alcătuit dintr-o serie de enzime: dehidrogenaze, quinone, citocromi; de ex., dehidrogenazele – coenzimele acestora servesc ca acceptori tranzitorii (temporari) de H⁺ și e⁻, de la un substrat donor, pe care îl oxidează, la un alt substrat acceptor, pe care îl reduce.

Calea biochimică de degradare în respirația aerobă este ciclul Krebs = ciclul acizilor tricarboxilici, care continuă glicoliza sau căile sale alternative și asigură oxidarea terminală a substraturilor și degradarea piruvatului la CO₂ și H₂O.

Glucidele sunt degradate în prealabil prin ciclul glicolizei → acid piruvic → ciclul Krebs → cuplarea cu lanțul transportor de e⁻ → CO₂ + H₂O.

**Bilanț energetic: PK 38moli ATP /mol Glu degradată
EK 36 moli ATP /mol Glu degradată**

La majoritatea MO-lor, aerobe în special, metabolismul energetic este un proces catabolic linear, cu eficiență termodinamică invariabilă și un câștig constant de ATP.



Acest tip de metabolism este prezent la numeroase grupuri fiziologice de bacterii litotrofe:

1) Bacterii care oxidează $\text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ – (*Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*);

2) Bacterii nitrificatoare:

a) care oxidează $\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$ (*Nitrosomonas sp.*, *Nitrosocystis sp.*);

b) „ „ „ $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ (*Nitrobacter sp.*, *Nitrococcus sp.*);

3) Bacterii sulfooxidante - oxidează S și derivații săi: H_2S , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3 \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$

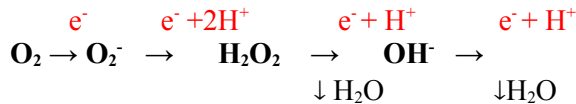
ex.: *Thiobacillus sp.*, *Thiothrix sp.*, *Beggiatoa sp.* etc.

4) Bacterii care oxidează $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$

ex.: *Thiobacillus ferrooxidans*, *Gallionella ferruginea*.

Cercetări relativ recente au demonstrat că deși O_2 molecular este indispensabil pentru viața organismelor aerobe, utilizarea lor conduce la apariția unor compuși foarte toxici pentru celula vie. De asemenea, concentrații de O_2 mai mari decât cele din aer, sunt toxice pentru cele mai multe microorganisme aerobe. Aceste observații demonstrează că deși respirația aerobă este avantajoasă, este în același timp, foarte primejdioasă. Compusul cel mai toxic este radicalul superoxid, ce se formează ușor și are o mare stabilitate. Superoxiddismutazele (SOD) sunt efectori esențiali ai reacțiilor celulare de apărare față de acest efect.

S-a demonstrat că reducerea completă a unei molecule de O_2 la apă, necesită intervenția a 4 e- și că în cursul procesului secvențial univalent care asigură această reducere se formează obligatoriu mai mulți compuși intermediari: radicalul anionic superoxid (O_2^- , H_2O_2 , radicalul hidroxil (OH^-)), compuși care sunt prea reactivi pentru a fi tolerați de sistemele biologice. H_2O_2 este descompus de către catalaze și peroxidaze, utilizând reducători din celulă. Ionul superoxid este inactivat de superoxid-dismutaze și transformat în H_2O_2 . Îndepărtarea eficientă a primilor doi intermediari ai procesului de reducere a oxigenului, împiedică formarea celui de-al treilea, care este foarte reactiv și a cărui degradare enzimatică nu este posibilă.



SOD-ele sunt prezente la toate organismele aerobe, catalaza fiind un mecanism de protecție suplimentar. SOD-ele diferă prin natura metalului din structura lor, astfel : FeSOD – la bacteriile Gram negative, MnSOD la bacteriile Gram pozitive, CuZnSOD la celulele eucariote.

2. Creșterea în absența O_2 și respirația anaerobă

Capacitatea de a crește indefinit în condiții anaerobe este prezentă aproape exclusiv la anumite procariote, la eucariote fiind un proces tranzitoriu, în condiții de activitate intensă și relativă hipoxie, cu excepția protozoarelor ciliate din rumen, a celor lipsite de mitocondrii (*Giardia sp.*, *Blastocystis hominis* – creșterea lor fiind inhibată de Metronidazol, un antibiotic specific pentru bacteriile anaerobe) și a unor specii de mucegaiuri capabile să crească slab în anaerobioză (*Fusarium sp.*, *Mucor sp.*).

Energia pentru creșterea anaerobă poate fi obținută pe 3 căi:

- Fotosinteză anoxigenică
- Respirație anaerobă
- Fermentație

Respirația anaerobă. Conversia E în anaerobioză este asemănătoare respirației aerobe în privința donatorilor de electroni (compuși organici sau anaorganici), deosebirea fundamentală fiind natura acceptorilor finali de electroni, diferite substanțe, cu excepția O_2 , dar și natura produșilor finali, care permit clasificarea bacteriilor anaerobe în grupuri fiziologice.

Transportori de e- - la bacteriile anaerobe există transportori specifici: ferredoxina – rol de formare a H₂, Fe nehemic; rubredoxina – substituie Fd, Fe nehemic; flavodoxina – cofactor enzimatic FMW, rol în fixarea N₂ și eliberarea H₂.

Grupe fiziologice de bacterii anaerobe:

1) **bacterii denitrificatoare** – NO₃⁻ și/sau NO₂⁻ ca acceptori de e- → NO (oxid nitric) → N₂O (oxid nitros) → N₂ eliberat în atmosferă.

Ex.- bacterii din genurile *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas denitrificans*, *Micrococcus*, *Rhizobium*.

Sunt bacterii **facultativ anaerobe**, deoarece pot transfera electroni și la oxigen, dacă este prezent. Denitrificarea este ultima etapă a circuitului azotului în natură (fixarea N₂ → amonificare → nitrificare → denitrificare), dăunător pentru sol, dacă este foarte intens, deoarece conduce la o pierdere a compușilor azotați, asimilabili de către plante și deci la reducerea fertilității solului.

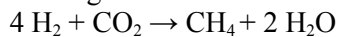
2) **bacterii SO₄-reducătoare** – folosesc SO₄²⁻ și S⁰ ca acceptor de e- → H₂S.

- sunt bacterii **obligat anaerobe** (nu au catenă de respirație celulară);

Ex.: *Desulfovibrio sp.*, *Desulfuromonas sp.*, *Clostridium sp.*;

- conținut ridicat de citocrom C3 cu rol în reducerea SO₄²⁻ și ferredoxina - rol de transportor de e-.

3) **bacterii metanogene** – folosesc CO₃ sau CO₂ ca acceptor final de e- → CH₄. Un grup mic de bacterii, numite metanogene, folosesc CO₂ ca acceptor final de electroni, reducându-l la metan, folosind ca donor de electroni hidrogenul.



- **obligat /strict anaerobe**, nu conțin citocromi, dar au conținut ridicat de vitamina B12 și acid folic cu rol în procesul de reducere (sunt coenzimele unor enzime cu rol de reductaze).

Ex.: dom. *Archaea* – genurile *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina* – utilizate în biotehnologii de producere a biogazului.

3) Fermentația

Este procesul biologic de oxido-reducere producătoare de E în care Donorii și Acceptorii de e- și H⁺ sunt substanțe organice. A fost definită în 1861 de către Pasteur ca „viață fără aer”. Microorganismele pot fi aerobe facultativ anaerobe (unele bacterii, levurile: *Saccharomyces sp.*, *Candida sp.* etc.) sau obligat anaerobe (unele bacterii).

Compușii organici cu funcție de D și A sunt metaboliți derivați dintr-un substrat fermentabil. Compușii organici sunt oxidați parțial și numai o parte din E este eliberată, restul rămânând în produsul de fermentație. În cursul fermentației substratului se formează amestecuri de produși finali, din care unii sunt oxidați iar alții sunt reduși (conținând și o parte din E).

Ex. fermentația alcoolică:



Energia rezultată în fermentație nu se pierde în totalitate prin căldură, ci 20-30% din aceasta este stocată în ATP, care se formează prin transferul la ADP a unei grupări fosfat (P) înalt energetică de la un intermediar fosforilat rezultat din degradarea substratului. **Modul de formare a ATP în timpul fermentației = fosforilare la nivelul substratului.**

Fermentația este modalitatea de procurare de E la bacteriile anaerobe și la drojii, glucidele reprezentând principalul substrat de fermentație, glucoza fiind forma sub care glucidele sunt utilizate de către microorganisme. Fermentațiile sunt clasificate și denumite după natura produsului final major: alcoolică, lactică, butirică, acetică, propionică etc.

Multe microorganisme, capabile de respirație și fermentație, „preferă” fermentația (în prezența unui substrat fermentabil), în ciuda randamentului scăzut de producere de ATP (36 moli ATP/1 mol hexoză- în respirația aerobă, fata de 2 moli ATP – prin fermentație), acest comportament, determinat de o represie a enzimelor respiratorii în prezența zaharurilor, demonstrând că fermentația este o cale metabolică principală.

Cunoasterea efectului Pasteur = „respirația inhibă fermentația„, este importanta pentru diferitele biotehnologii microbiene; de ex. in conditii de aerare – au loc procesele de respirație, de crestere si de multiplicare a celulelor si respectiv a biomasei; in anaerobioza (nu se mai barboteaza cu aer mediul inoculat) - se produce fermentarea substratului si rezulta produși de fermentație; aceasta tehnologie in trepte, in conditii diferite, asigura cresterea randamentului reactiilor de fermentatie si de obtinere de produși utili.

Importanța cunoașterii particularităților metabolice: biotehnologica, medicală, ecologica.

Cresterea si multiplicarea bacteriilor

Cresterea si multiplicarea reprezinta rezultatul metabolismului microbial. Aceste procese au o serie de particularitati marcate de intensitatea deosebita si de reglarea perfecta a metabolismului microbial.

Cresterea, in sens biologic, este definita ca procesul de marire coordonata a tuturor constituintilor unui organism ca rezultat al producerii sau adaugarii de substanta noua. Pornind de la nutrientii din mediu, cresterea se realizeaza prin sinteza specifica si echilibrata a unor compusi de baza care sunt asamblati ulterior pentru a forma copii fidele ale constituintilor celulari si ulterior noi celule, prin multiplicare. Cresterea nu se realizeaza la infinit deoarece este un proces controlat genetic iar dimensiunile bacteriilor sunt caracteristice in conditii normale. Atunci când este atins un volum critic, cresterea inceteaza si este urmata de *diviziunea celulara*. Mecanismul molecular declansator al diviziunii celulare nu este bine cunoscut. In mod obisnuit exista un raport echilibrat, controlat genetic, intre suprafata si volumul celulei (S/V) astfel ca un rol important il are dezechilibrul S/V aparut ca rezultat al cresterii, care declanseaza diviziunea, prin care se restabileste raportul echilibrat S/V. Mecanismul de multiplicare cel mai raspandit si caracteristic bacteriilor tipice este **diviziunea simpla = binara, izomorfa** (mai rar, heteromorfa, cu aparitia de minicelule).

Dinamica procesului de multiplicare a bacteriilor. In mod obisnuit, cresterea bacteriana se refera nu la dimensiunea unei celule, ci la numarul acestora in populatia bacteriana rezultata, la masa totala (biomasa) care este proportionala cu numarul de celule bacteriene. Baza cresterii populatiei este **diviziunea binara**. Prin diviziunea unei celule sunt produse doua celule-fiice, iar acestea vor genera 4 celule-fiice. Apoi diviziunile devin asincrone. Pornind de la o singura celula se ajunge la un numar de celule ce creste in progresie geometrica.

Viteza de sporire a masei populatiei corespunde vitezei de multiplicare, ce se masoara prin **durata** sau **timpul de generatie (DG=TG)** care reprezinta perioada de timp necesara pentru ca o celula sa se divida si deci populatia sa se dubleze, sau timpul dintre doua diviziuni succesive. Durata de generatie variaza considerabil intre bacterii. De ex., majoritatea bacteriilor au o DG de 1-3h, dar exista si exceptii. In conditii favorabile, o celula de *E. coli* se divide si formeaza 2 celule la fiecare 20/25min. Potentialul de multiplicare nu este atins niciodata, nici *in vitro*, si cu atât mai putin in mediul natural datorita unor factori limitanti, cum ar fi: competitia pentru nutrienti, relatiile interspecifice de tip antagonist, variatiile conditiilor de mediu abiotic (t° , pH, pres.osmotica, pres.hidrostatica, umiditate, radiatii). DG este influentata de conditiile de mediu, totusi chiar in prezenta unei concentratii mari de nutrienti nu poate sa scada sub o durata minima, necesara replicarii cromosomului bacterian; diviziunea este declansata de cresterea concentratiei peste o valoare prag a unei proteine initiator a replicarii.

In conditii aritificale de crestere pe medii de cultura, multiplicarea bacteriilor poate fi studiata pe populatii omogene de bacterii, folosind **2 tipuri principale de culturi**:

1. culturi discontinue sau asincrone – corespund modalitatii de cultivare in sistem inchis (ex. flacoane sau eprubete) in care cultivarea are loc intr-un volum fix de mediu nutritiv. Cultivarea discontinua se caracterizeaza prin particularitati legate de:

- volumul fix de mediu, cu influența asupra compoziției chimice a mediului, care se modifică pe parcursul cultivării sub raportul conținutului în nutrienți, valorii pH și a produsilor de metabolism rezultați (acumularea de cataboliți, dintre care unii toxici);
- numărul celulelor viabile -variabil: crește progresiv și ulterior începe să scadă prin moartea celulelor și autoliza;
- ritmul de diviziune inegal: mai mare la început când populația este tânără și mediul optim, pentru ca apoi să scadă progresiv; vârsta diferită a celulelor;
- nr. de generații este limitat datorită limitării procesului de multiplicare în anumite condiții de mediu.

2. culturi de tip continuu – obținute în condiții speciale utilizând sisteme de tip *chemostat* sau *turbidostat* în care mediul de cultura este permanent reînnoit printr-un mecanism dublu: adăugare de mediu proaspăt cu același ritm cu care se recoltează și îndepărtează cultura microbiană rezultată. Culturile de tip continuu furnizează celule cu proprietăți uniforme și activități fiziologice optime, fiind utilizate în procese biotehnologice industriale.

Curba de creștere a unei culturi bacteriene discontinue asincrone

Pentru studiul dinamicii unei populații bacteriene într-o cultura discontinuă asincronă se analizează curba de creștere a bacteriilor = evoluția unei populații bacteriene care se multiplică prin diviziune simplă în funcție de timp. Modalitatea de reprezentare grafică este pe o scară semilogaritmă, de evoluție a numărului de celule bacteriene în timp (fig. 1).

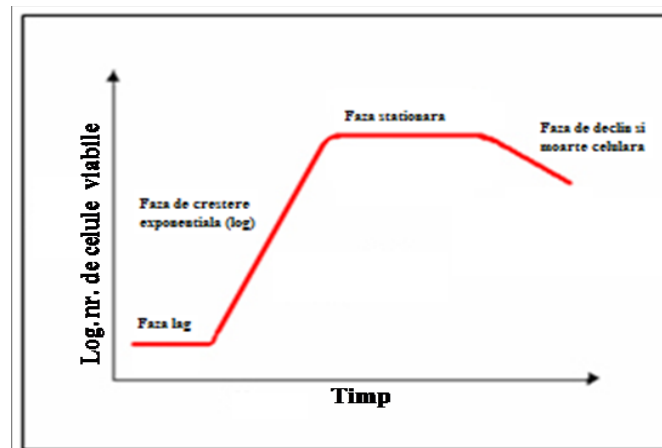


Fig 1. Curba de creștere a unei culturi bacteriene discontinue asincrone

Curba de creștere bacteriană prezintă 4 faze esențiale: faza de *lag*, faza de creștere logaritmică, faza staționară și faza de declin și moarte celulară.

Faza de lag (de creștere zero; engl. “to lag” = a întârzia) – începe din momentul introducerii inoculului în mediu de cultura. Numărul celulelor bacteriene rămâne neschimbat sau se modifică foarte puțin. În această fază celulele nu sunt latente ci au un metabolism activ (sinteza de enzime inductibile), celulele pregătindu-se de multiplicare. La sfârșitul fazei celulele bacteriene cresc în dimensiuni și are loc faza de inițiere a creșterii.

Faza de log (de creștere **logaritmică**) – caracterizată printr-un ritm exponențial de creștere. La fiecare diviziune populația bacteriană se dublează. DG are durată constantă minimă astfel încât reprezentarea

grafica este o line dreapta. Celulele au dimensiuni mari, continut omogen, nu prezinta incluzii, au afinitate mare pentru colorantii bazici (bazofilie intensa) si la sfarsitul acestei perioade si inceputul urmatoarei se diferentiaza optim prin coloratia Gram. Celulele au cea mai intensa activitate metabolica si sunt sensibile la conditiile nefavorabile (radiatii, substante antimicrobiene). Capacitatea de crestere exponentiala dureaza o perioada redusa de timp, datorita factorilor de mediu limitanti (ex.: lipsa nutrientilor, relatii antagoniste etc).

Faza stationara de crestere (“platou”) - perioada de echilibru in care numarul de celule bacteriene ramâne constant, astfel ca numarul de celule care mor este compensat de numarul celor ce se divid. Celulele sunt mature, dimensiuni si morfologie normale (ca in atlasele de bacteriologie), apar primele incluzii si primii spori (la speciile sporogene) si au o activitate metabolica redusa. La sfarsitul fazei numarul celulelor incepe sa scada progresiv.

Faza de declin si moarte celulara – are loc o regresie exponentiala care continua pâna ramâne o fractiune mica de celule rezistente sau pâna moare toata populatia celulara. Durata fazei depinde de durata de viata a speciei. Celulele prezinta alterari morfologice, se coloreaza anormal, au substante de rezerva, devin acidofile. La speciile sporulate se intalnesc numerosi spori maturi.

Cunoasterea evolutiei populatiei microbiene este foarte importanta pentru stabilirea perioadelor optime de recoltare a metabolitilor primari si secundari, in cursul proceselor biotehnologice.

Metabolitii primari sunt substante produse de bacterii pe parcursul cailor metabolice majore si care sunt esentiale pentru viata celulei (enzime, AA, acizi organici). Sunt sintetizati in faza de log. **Metabolitii secundari** sunt substante biochimice neesentiale bacteriilor (vitamine, antibiotice, alcoolii) si care sunt sintetizati in faza stationara.

VIRUSURILE: CARACTERISTICI DEFINITORII SI CLASIFICARE

Conceptul actual de “VIRUS”

Virusurile sunt *entitati infectioase acelulare, nevii*. Reprezinta o categorie de agenti infectiosi de natura nucleoproteica (acizi nucleici si proteine), de dimensiuni mici, submicroscopice, filtrabili (~20-300 nm).

Sunt agenti infectiosi de temut, luând in considerare faptul ca infectiile virale au o incidenta mare in populatie, agentii chemoterapeutici antivirali sunt mai putini si prezinta o specificitate de actiune mai redusa comparativ cu antibioticele utilizate in infectiile microbiene si in plus, unele virusuri au potential cancerigen.

Virusurile sunt paraziti obligat intracelulari la toate tipurile de celule, apartinand tuturor regnurilor. Natura parazitismului lor este diferita de parazitismul obligat intracelular al grupelor de procariote cu aceasta particularitate (*Rickettsiaceae, Chlamydiaceae, Bartonellaceae*), aceste bacterii de dimensiuni mici, cu un genom de dimensiuni reduse, avand insa un metabolism propriu (desi simplificat, rudimentar) si fiind capabile de multiplicare autonoma. **Parazitismul virusurilor este absolut**, deoarece, desi prezinta un genom viral ce codifica o informatie genetica, nu contin enzime metabolice si implicit nu au un metabolism propriu, fiind astfel incapabile de crestere si multiplicare autonoma.

Prezinta si alte particularitati unice atat din punct de vedere structural si biochimic, cat si sub raportul relatiilor cu sistemele biologice.

Unicitatea lor structurala, care se refera in primul rand la **organizarea acelulara si la simetria la nivel molecular**, reiese indirect si din faptul ca virusurile nu sunt incluse in nici unul din sistemele de clasificare a lumii vii, fiind doar asociate conventional microorganismelor si domeniului *Microbiologiei*. La inceput un subdomeniu al microbiologiei, *Virologia* este in prezent o stiinta de sine statatoare care studiaza virusurile la nivel structural, biochimic, genetic, ca si relatiile virusurilor cu celulele gazda, infectiile determinate si evolutia acestora.

Virusurile prezinta o structura si un mod propriu de multiplicare, prin disocierea in componente dupa patrunderea in celula-gazda, utilizarea echipamentului enzimatic al celulei-gazda pentru sinteza propriilor componente si formarea de noi particule virale prin procesul de autoasamblare. Datorita utilizarii echipamentului enzimatic si a componentelor structurale (aminoacizi, nucleotide) din celula-gazda parazitata pentru sinteza de noi particule virale, sinteza directionata de genomul viral, nu este recomandata utilizarea termenului de multiplicare, ci cel de **replicare a virusului**, de formare de noi replici sau copii ale acestuia.

Particularitatile definitorii ale virusurilor

Conceptul de virus a fost definit prin comparatie cu celula bacteriana (considerata de Fr. Jacob a reprezenta un "minimum vital" sau treapta cea mai rudimentara a viului) si a fost elaborat de catre A. Lwoff (1957) care a stabilit o serie de caractere discriminatorii ale virusurilor:

- 1) Tipul de organizare: **acelular** (nu sunt PK);
- 2) Unitatea de structura si functie este **virionul** = particula virala matura, completa din punct de vedere morfologic, cu caracter infectios;
- 3) Virusurile au **3 stari posibile de existenta**:
 - **virion** = particula virala matura asa cum este eliberata din celula-gazda;
 - **virus vegetativ** = genomul viral liber in celula, pregatit pentru initierea procesului de replicare;
 - **provirus** = genomul viral integrat in genomul celulei-gazda, astfel ca determina infectii latente si pot declansa transformarea maligna a celulelor (ex.: retrovirusurile).
- 4) Modelul general de structura se refera la virion, constituit din:
 - *componente esentiale*:
 - (a) *genom viral ADN/ARN*, care impreuna cu capsida}
 - (b) *capsida* = invelis proteic; } impreuna formeaza *nucleo-capsida*;

! Caz unic: numai la virusuri exista informatie genetica inscrisa in: ARN si ADNm.c.

 - *componente accesorii*:
 - (a) *invelis viral = peplos = anvelopa virala*;
 - (b) *spicule* glicoproteice implantate in anvelopa.

Virusurile constituite doar din nucleocapsida sunt numite *virusuri nude*, iar cele care prezinta si un invelis sau anvelopa sunt denumite *virusuri anvelopate*.

5. Simetria la nivel molecular – aceasta particularitate a virusurilor se refera la capsida; la organismele vii simetria este prezenta la nivel macroscopic (simetrie bilaterala, radiara) si nu la nivel molecular cum se intampla la virusuri, aceasta caracteristica fiind un caz unic si o conditie absolut necesara deoarece capsida este alcatuita dintr-un numar fix de monomeri proteici = *capsomere*, care se asambleaza automat in functie de tipul de simetrie. Exista 3 tipuri de simetrie la nivel molecular:

a) helicala – capsomerele sunt dispuse in spirala, sub forma tubulara, in interior existand genomul viral. Ex.: virusul mozaicului tutunului - VMT, virusul gripal – capsida flexibila anvelopata etc.;

b) cubica (icosaedrica) – cu forma de poliedru = icosaedru cu 20 fete, 30 muchii, 12 vârfuri; ex.: poliovirus, adenovirus, herpesvirus, HIV etc.

c) binara (mixta) – capul cu simetrie icosaedrica si coada cu simetrie helicala.

Ex. bacteriofagii (virusurile care paraziteaza bacteriile).

6. Compozitia chimica - virusurile sunt constituite din acizi nucleici si proteine. La virusurile anvelopate, invelisul viral este de natura fosfolipidica, pentru ca deriva din membrana celulei-gazda din care particulele virale nou formate sunt eliberate prin procesul de inmugurire. Spiculele sunt constituite din proteine sau glicoproteine (partea proteica este codificata de genomul viral).

Lipseste echipamentul enzimatic de biosinteza si catabolizare, de aceea virusurile sunt incapabile sa-si sintetizeze constituintii proprii si deci sa creasca si sa se multiplice autonom.

In structura unor virusuri **pot fi prezente si enzime, dar acestea nu au rol in metabolism ci in infectiozitatea virusurilor sau in propria lor replicare** ex.: *neuraminidaza* - unul din cele 2 tipuri de

spicule ale virusului gripal, cu actiune degradativa asupra mucoproteinelor din secretia mucoasei respiratorii, care va fi fluidificata favorizand diseminarea virusurilor si adsorbtia lor la nivelul receptorilor de virus de pe celulele sensibile; *reverstranscriptaza* - enzima din structura virusului HIV (engl. *human immunodeficiency virus* = virusul imunodeficientei umane), enzima ce realizeaza transcrierea inversa a genomului viral de tip ARN, la o molecula de ADN monocatenara, ce devine apoi dublu catenara si se integreaza in genomul celulei gazda, fiind replicata odata cu acesta.

7. Multiplicarea virusurilor- formarea de noi particule virale se realizeaza **prin procesul de replicare** (copierea informatiei genetice), care are loc obligatoriu intr-o celula vie. Cele 2 genomuri, viral si al celulei-gazda, pot coexista, independent sau genomul viral poate fi integrat in genomul celulei gazda sub forma de *provirus*.

Informatia genetica virala perturba metabolismul celulei-gazda (diataxia celulara) indreptandu-l spre sinteza de virus (diataxia virala). Se disting doua faze:

1) **faza de sinteza a componentelor virale** - dependenta de celula-gazda;

2) **faza de diataxie a componentelor virale** pentru constituirea particulelor virale mature, dependenta de informatia genetica virala. Din aceasta particularitate functionala decurge parazitismul genetic absolut al virusurilor, motiv pentru care se considera ca virusurile nu se multiplica, ci sunt replicate.

Detalii structurale - componentele virale

Genomul viral - poate fi constituit din ADN (ADN-virusuri) sau ARN (ARN-virusuri), raportul dintre genom si proteinele capsidale fiind in general mic, cu exceptia virusurilor de dimensiuni mai mari (Pox virusurile: v. variolei, v. vaccinei, v. varicelei).

ADN-virusurile pot avea genom constituit dintr-o molecula monocatenara liniara sau circulara, dublu catenara liniara sau circulara, suprahelicla, dublu catenara cu brese monocatenare.

ARN-virusurile pot avea genom constituit dintr-o molecula monocatenara liniara sau circulara, dublu catenara segmentata. Genomul segmentat este prezent la virusurile gripale (8 segmente), la reovirusuri (10 segmente), la virusul HIV (2 segmente identice de ARN liniar) etc.

Exista probabilitatea ca 2 tipuri de virus (de ex. virus gripal uman si aviar sau porcine) sau 2 tulpini virale sa infecteze concomitent aceeasi celula, iar segmentele genomice libere, dupa replicare, sa se reasorteze si sa rezulte o noua tulpina virala, diferita din punct de vedere genetic, dar si antigenic.

Capsida (denumire derivata din gr. *capsa* = cutie); este de natura proteica, unitatile de constructie fiind numite capsomere; acestea pot fi monomere la virusurile cu simetrie helicala si oligomere (pentoni si hexoni) la virusurile cu simetrie icosaedrica.

Invelisul viral numit si **peplos** sau **anelopa virala** - componenta accesorie.

Virusurile care au nucleocapsida invelita de peplos sau anelopa virala sunt denumite **virusuri anvelopate**. Prezenta sau absenta anvelopei virale influenteaza rezistenta sau persistenta virusurilor in mediul natural si implicit caile de transmitere a virusurilor la o noua gazda sensibila. Astfel, virusurile anvelopate, desi prezinta o structura suplimentara, sunt mai fragile; fragilitatea lor deriva din fragilitatea anvelopei virale, provenita din membrana celulei-gazda din care particulele virale nou formate prin procesul de replicare sunt eliberate prin procesul de inmugurire. Fiind constituita din fosfolipide, anelopa va imprima virusurilor anvelopate termolabilitate si sensibilitate la solventii ai lipidelor, ca si la actiunea enzimelor digestive; ori pentru a fi infectioase, virusurile trebuie sa aiba o structura intacta.

Virusurile nude (lipsite de anelopa) se pot transmite la distanta, pe cale digestiva sau hidrica, avand o rezistenta mare in mediul extern

Spiculele sunt structuri accesorii, de natura proteica sau glicoproteica, cu rol in prima faza a infectiei virale, respectiv in adsorbtia virusurilor la nivelul receptorilor de virus prezenti pe suprafata celulelor sensibile. De ex., hemaglutininele prezente pe suprafata multor virusuri animale (virusuri gripale, virusul urlian sau al oreionului, virusul rubeolic, virusul rujeolic etc.) au afinitate si se adsorb la suprafata hematiilor umane sau animale, fiecare virus avand un spectru de gazda specific.

Acesti receptori celulari au alte functii originare, dar agentii infectiosi (virusuri, dar si microorganisme patogene), printr-un proces de "mimetism molecular", au dezvoltat in cursul coevolutiei gazda-parazit structuri de suprafata complementare din punct de vedere stereochimic, mentinandu-se astfel in gazda si totodata in natura.

Spiculele influenteaza si virulenta virusurilor, unele avand capacitatea de a anihila anumite mecanisme de aparare nespecifice ale gazdei care determina asa-numita rezistenta naturala sau innascuta a organismului, cum ar fi mucusul produs de epiteliul mucoasei respiratorii si fluxul acestuia, eliminand particulele straine (praf, agenti infectiosi) patrunse odata cu aerul. Un exemplu in acest sens este *neuraminidaza* - unul din cele doua tipuri de spicule ale virusului gripal, cu actiune degradativa asupra mucoproteinelor din secretia mucoasei respiratorii, care va fi fluidificata favorizand diseminarea virusurilor si adsorbtia lor la nivelul receptorilor de virus de pe celulele sensibile.

La anumite virusuri, spiculele intervin in virulenta in alt mod: fiind codificate de genomul viral, sunt supuse fenomenului de variatie antigenica (determinata de variabilitatea genetica a unor virusuri, prin mutatii punctiforme sau prin pseudorecombinari - reasorarea in celula gazda infectata a segmentelor genomice ale virusurilor cu genom multipartit); din aceasta particularitate a unor virusuri rezulta dificultatea de a obtine vaccinuri eficiente (fata de virusul HIV), ca si reinfectarea cu acelasi virus de mai multe ori in cursul vietii (virusurile gripale), aparent datorita unei stari de imunitate de scurta durata (in realitate imunitatea antigripala este de lunga durata, doar ca in fiecare an sunt in circulatie alte tulpini virale).

Fazele ciclului de evolutie la virusuri

- ☞ Adsorbtia virionilor la receptorii de virus de pe membrana celulei gazda;
- ☞ Patrunderea in celula-gazda (infectia virala), urmata de decapsidare si disocierea componentelor virale, ce vor fi folosite in metabolismul celulei-gazda;
- ☞ Replicarea materialului genetic viral cu sinteza unui numar mare de copii;
- ☞ Transcrierea informatiei genetice virale in ARNm;
- ☞ Traducerea informatiei genetice virale (sinteza de proteine capsidale +/- spicule);
 - aceste ultime 2 procese sunt sustinute de masinaria de biosinteza a celulei-gazda (este utilizat echipamentul enzimatic, moleculele de ARNt, aminoacizi, nucleotide);
- ☞ **Asamblarea componentelor (proteine capsidale si genomul viral ADN/ARN) si eliberarea particulelor virale nou-formate = virusuri progene** (eliberarea prin liza celulei gazda sau prin inmugurire, fara citoliza).

* aceste faze valabile in general la toate virusurile, prezinta si aspecte particulare, in functie de tipul de virus.

Clasificarea virusurilor

Clasificarea acestor agenti infectiosi de tip special s-a realizat in functie de mai multe criterii, cum ar fi:

1) dupa spectrul de gazda:

- virusuri care infecteaza bacteriile = bacteriofagi;
- virusuri " " fungii = micofagi;
- virusuri " " plantele = v. ale plantelor;
- virusuri " " animalele = v. ale animalelor;

2) dupa tropismul fata de diferite celule gazda si simptomatologie: unele virusuri determina boli generalizate, altele infecteaza organe specifice: virusuri hepatitice, virusuri respiratorii, virusuri enterice, virusuri encefalitice etc.

3) criterii stiintifice de clasificare:

- dupa tipul de acid nucleic genomic: virusuri ADN si virusuri ARN;
- dupa conformatia capsidei;
- dupa prezenta/absenta invelisului extern si complexitatea acestuia;
- dupa criteriile furnizate de biologia moleculara, aplicabile virusurilor animalelor (si uneori la bacteriofagi si virusuri ale plantelor): se porneste de la premisa ca in centrul ciclului de existenta al virusurilor se afla etapa de replicare a genomului viral si sinteza moleculelor de ARNm. In functie de aceste criterii, exista 6 clase de virusuri; primele 2 clase au genom ADN (dublu si respectiv monocatenar), iar celelalte 4 clase de virusuri

au genom ARN (1 clasa cu genom ARN dublu catenar si 3 clase cu genom monocatenar, dar cu polaritate diferita). Un caracter cu totul deosebit au virusurile din clasa a VI-a, numite *Retrovirusuri*, datorita prezentei in structura virusului a enzimei numita *reverstranscriptaza* - RT, enzima ce realizeaza transcrierea inversa a genomului viral de tip ARN, la o molecula de ADN m.c., ce devine apoi dublu catenara si se integreaza in genomul celulei gazda, fiind replicata odata cu acesta; ex. de retrovirus - virusul HIV (engl. *human immunodeficiency virus* = virusul imunodeficientei umane). Retrovirusurile au capacitate transformanta. Recent s-a adaugat și o a VII-a clasa de virusuri cu genom de tip ADN dublu catenar, cu brese monocatenare (HBV).

Identificarea virusurilor se realizeaza prin metode directe si indirecte. Metodele directe se utilizeaza mai ales in cercetare: microscopie electronica, metode de biologie moleculara, respectiv tehnici de hibridizare, de secventializare a genomului viral; foarte mult utilizate in practica medicala curenta sunt metodele imunologice, foarte sensibile si specifice (de evidentiere si cuantificare fie a virusurilor sau componentelor virale - serotipizare, fie a anticorpilor specifici antivirali- serodiagnostic); pentru studiul virus -celula gazda este utilizata microscopia optica pentru evidentierea efectului citopatogen pe culturi de celule.

Infectiile virale, dupa relatia virusului cu celula gazda si evolutia acesteia, pot fi: productive, persistente, latente, unele având efect de transformare maligna.

Bacteriofagii (fagii) se clasifica in 2 categorii:

- **fagi litici sau virulenti** - *caracterizati printr-un ciclu litic*; dupa infectie si replicarea fagilor, acestia determina liza celulei respective; prototip bacteriofagul T4, din seria T par, a carei gazda specifica este colibacilul (*Escherichia coli*);

- **fagi lizogeni / temperati** - *caracterizati printr-un ciclu lizogen*; dupa infectia unei celule permissive, genomul fagic se poate integra in cromozomul bacterian (starea de profag), replicandu-se odata cu acesta si fiind transmis pe verticala; spontan sau indus genomul fagic poate trece din starea integrata in starea de virus vegetativ, liber in citoplasma si capabil sa initieze un ciclu litic; excizia profagului poate fi corecta (exact la situsurile de integrare) sau incorecta, preluând gene cromozomale si lasând aici gene fagice, proces prin care acesti fagi pot transmite genele cromozomale preluate la alte celule bacteriene pe care le infecteaza; fenomenul este denumit transductie, fagii respectivi sunt transductori si reprezinta o modalitate de variabilitate genetica si evolutie a bacteriilor. Prototip al fagilor temperati este bacteriofagul λ , a carei gazda specifica este tot colibacilul (*Escherichia coli*). Bacteriile purtatoare de fagi integrati in cromozom, deci in stare lizogena, pot manifesta proprietati diferite fata de celula normala, fenomen denumit *conversie fagica* (de ex. sinteza unor toxine bacteriene, codificate de informatia virala - profagi).

Cultivarea virusurilor in laborator. O caracteristică definitorie a virusurilor este **parazitismul intracelular absolut** datorat absenței unui metabolism propriu, din care decurge incapacitatea virusurilor de a se multiplica autonom, în afara celulelor vii. Ca urmare a acestui fapt, nici un virus nu a putut fi cultivat pe un substrat artificial, acelular, oricât de complex ar fi fost acesta.. Metodele de cultivare trebuie sa furnizeze ca substrat de cultivare celule vii, implicit tehnici de cultivare mai complexe, care difera in functie de tipul de virusuri: bacteriofagi, virusuri ale plantelor, virusuri ale animalelor.

Cultivarea bacteriofagilor - bacteriofagii se cultiva in laborator prin inocularea unei culturi bacteriene cu o suspensie de particule virale, care vor determina ca urmare a ciclului litic moartea celulelor bacteriene = liza celulelor bacteriene infectate cu bacteriofagi, care se manifesta prin limpezirea unei culturi pe mediu lichid sau aparitia unor zone clare sau *plaje de liza* pe o cultura bacteriana insamantata in panza pe suprafata unui mediu solid.

Cultivarea virusurilor animalelor - cu puține excepții (de ex. virusurile hepatitelor B, C, D și HIV), majoritatea virusurilor pot fi obținute în cantități suficient de mari (pt. reactii de serodiagnostic, obtinere de vaccinuri, studiul relatiei virus – celula -gazda etc.), prin metode de:

- ✓ cultivare *in vivo* prin:
 - ✓ infectarea experimentală a unor animale de laborator sensibile;
 - ✓ infectarea experimentală a embrionilor de găină;
- ✓ cultivare *in vitro* pe diferite tipuri de culturi de celule (HeLa, Hep-2 etc.).