

CINETICA DE CREȘTERE A MICROORGANISMELOR (CULTURI PURE)

DINAMICA MULTIPLICĂRII BACTERIILOR ÎN CULTURI

- În general microorganismele sunt cultivate pentru mai multe scopuri:
 - izolarea și identificarea lor;
 - menținerea în stare viabilă, în colecții, fără pierderea funcțiilor importante;
 - studiul structurii și funcției lor;
 - studierea rolului în natură;
 - obținerea de produși rezultați din biomasa celulară, biosinteză, fermentații, bioconversii etc.

- În prezent se cunosc puține date în legătură cu dinamica multiplicării populațiilor bacteriene în natură. Procesul este însă destul de bine cunoscut raportat la multiplicarea în condiții experimentale, de laborator, sau industriale.
 - Există două tipuri principale de culturi bacteriene:
 - **culturi discontinue** (în mediu de cultură nereînnoit), care se pot realiza în două variante
 - o *asincrone*;
 - o *sincrone*.
 - **culturi continue**, în medii de cultură reînnoite continuu.

Culturi discontinue asincrone

▪ Aceste culturi corespund cultivării în „sisteme închise”, în care un anumit volum de mediu corespunzător este „însămânțat” cu bacteriile respective („batch-culture”, eng. batch = șarjă, lot). În aceste condiții, creșterea este limitată la un volum fix de mediu, care nu este reînnoit și care de multe ori este modificat de acumularea produșilor de metabolism, putând deveni la un moment dat necorespunzător pentru creștere. Acest mod de cultivare este folosit frecvent în laborator, deși are o serie de dezavantaje de care trebuie ținut seama: numărul bacteriilor variază continuu, ritmul de creștere este impus de compoziția chimică a mediului care variază de la un moment la altul, vârsta bacteriilor individuale este variabilă, numărul de generații posibile este limitat.

▪ Prin inocularea de celule, aparținând unei culturi pure, într-un mediu nutritiv steril se poate stabili dinamica de creștere prin studiul vitezei de acumulare a biomasei sau prin creșterea numărului de celule raportat la unitatea de volum a mediului. În timp ce la mucegaiurile inferioare, la care prin creștere are loc prin diviziunea nucleilor și nu a celulei coenocitice, creșterea se apreciază prin determinarea masică a biomasei formate, la alte microorganisme, la care concomitent cu diviziunea nucleară are loc și diviziunea celulară (înmugurirea la drojdii, sciziune la bacterii, formare de pereți despărțitori la mucegaiurile superioare), creșterea se apreciază fie prin acumularea de biomasă fie prin determinarea numărului de celule.

▪ Pentru a aprecia dinamica multiplicării, la intervale regulate se recoltează probe mici de cultură, care sunt analizate, iar valorile logaritmice ale numărului de celule sunt înscrise pe curbe ale căror modificări arată tranziția de la o fază de creștere la alta. În general, se folosesc logaritmi în baza 2, deoarece fiecare unitate pe ordonată reprezintă o dublare a populației bacteriene respective. În aceste condiții procesul evoluează în șase faze succesive, în funcție de rata de creștere (notată cu r sau μ): faza de lag, faza de accelerare, faza de creștere exponențială, faza de încetinire și faza de declin.

o **Faza de lag** (eng. to lag = a întârzia), numită și de **latență**, sau de **creștere zero**, ($\mu=0$) în care nu se constată o creștere a numărului de celule, numărul celulelor din inocul rămâne neschimbat, sau chiar scade temporar. În această fază are loc o adaptare a celulelor la condițiile de mediu, biosinteza de ADN/ARN și o activizare a sistemelor enzimatice și elaborarea de enzime induse. În cazul drojdiilor, această fază poate dura 1-2 ore, durată ce depinde de compoziția mediului și de capacitatea de reglare a metabolismului propriu. Durata fazei de lag poate fi redusă la limite imperceptibile în cazurile în care se folosește un inoculum mare de cultură în fază logaritmică, iar transplantarea se face într-un mediu de cultură bogat, identic cu cel în care au fost cultivate bacteriile din inoculum.

o **Faza de inițiere a creșterii**, sau **faza de accelerare a ritmului de creștere**, când are loc o creștere în dimensiuni a celulelor prin mărirea mai rapidă a volumului în raport cu suprafața celulară, ceea ce favorizează declanșarea procesului de diviziune;

o **Faza de creștere logaritmică sau de multiplicare exponențială**, care reprezintă faza în care creșterea masei de celule poate fi determinată cantitativ prin dublarea numărului de celule în unitatea de timp (pentru drojzii și bacterii), sau ca dublare a biomasei / t pentru microorganismele filamentoase (streptomicete și fungi). Prin exprimarea acestor valori pe o scară semilogaritmică rezultă o dreaptă. Dacă unghiul pantei acestei drepte este mic aceasta se datorează condițiilor de creștere, care nu sunt din cele mai favorabile. Deși celulele produc o modificare a mediului de cultură prin asimilare de compuși nutritivi și eliberarea compușilor de catabolism, în faza logaritmică, rata de creștere rămâne constantă.

Rata de creștere este independentă de concentrația în nutrienți atâta timp cât aceștia se află în exces. **Rata de creștere în biomasă** $X(g \times dm^{-3})$ este corelată cu **rata specifică de creștere** μ , în timp ce **rata de creștere a numărului de celule** este corelată cu **rata specifică de creștere** μ și **densitatea celulelor** N .

Rata specifică de creștere μ , este dependentă de trei parametri:

- concentrația substratului limitativ S ;
- rata maximă de creștere μ_m ;
- constanta specifică dependentă de substrat K_s ,

conform ecuației stabilită de Jaques Monod:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$$

Constanta K_s este concentrația substratului la care se obține $\frac{1}{2}$ din rata specifică maximă de creștere ($\mu = 0,5 \mu_m$) și este echivalentă cu constanta Michaelis în cinetica enzimatică.

Dacă există un exces al tuturor nutrienților, atunci $\mu = \mu_m$ și cultura se află deci în faza logaritmică la rata maximă de creștere.

Dacă unul dintre nutrienții preferați, de exemplu glucoza, s-a epuizat, în prezența altor surse de carbon se observă așa-numitul fenomen de **diauxie** când se poate, după o nouă fază lag, să aibă loc metabolizarea noului substrat și creșterea exponențială a celulelor.

La sfârșitul fazei logaritmice se acumulează o cantitate maximă de biomasă, substratul este rapid epuizat și cultura trece în **faza staționară de creștere**. Rata specifică de creștere maximă μ_m , are o importanță considerabilă în procesele industriale în care se urmărește obținerea de celule și este dependentă de natura microorganismului și de condițiile de cultivare. De exemplu, pentru mucegaiuri, aceasta poate să varieze între 0,090 și 0,61 h⁻¹.

La cultivarea lui *Aspergillus niger* pe un mediu cu glucoză la 30°C s-au obținut o rată maximă de creștere $\mu_m = 0,2$ și un timp de dublare al biomasei de 3,46 h.

Bacteriile aflate în faza logaritmică au o citoplasmă omogenă, nu conțin substanțe de rezervă și au o mare afinitate pentru coloranții bazici, datorită conținutului lor mare de ARN. Mărimea lor este constantă, depășind însă dimensiunile caracteristice speciei.

o **Faza de încetinire a creșterii** corespunde perioadei în care, ca urmare a epuizării treptate a nutrienților, reducerea concentrației în oxigen și acumularea de compuși de catabolism ce pot avea efect inhibitor asupra celulelor, creșterea ia toate valorile intermediare între creșterea cu o rată maximă și 0.

o **Faza staționară de creștere**, când se stabilește un echilibru între numărul de celule care se formează prin reproducere și cel al celulelor care se autolizează. Cantitatea de biomasă poate rămâne constantă, deși se schimbă compoziția celulelor. Datorită lizei unor celule se eliberează noi substraturi care vor servi drept nutrienți pentru celulele viabile. Această fază poate fi prelungită atunci când urmărim păstrarea culturii pure, prin modificarea unor factori care scad viteza de metabolism celular;

o **Faza de declin** sau **curba de distrugere și inactivare metabolică a celulelor**, are loc ca urmare a următorilor factori:

- o lipsa surselor de nutriție și energie;
- o denaturarea componentelor celulare în prezența substanțelor acumulate (alcooli, acizi, ș.a.);
- o procentului de celule autolizate.

Consecința acestor acțiuni conduce, în final, la **sterilizarea mediului** și, deci, la moartea tuturor celulelor, respectiv la pierderea culturii.

Culturi discontinue sincrone

▪ În cazul culturilor bacteriene obișnuite diviziunile celulelor individuale urmează ritmuri proprii, în așa fel încât rezultă o populație eterogenă, formată din indivizi aflați, practic, în toate fazele ciclului lor de creștere și multiplicare. Chiar în cazuri speciale, în care pornim de la o singură celulă, se constată că la descendenții acesteia, după o perioadă de diviziune sincronă apar diferențe decurgând din timpul diferit necesar celulelor progene să se dividă.

▪ Culturile cu creștere sincronă sunt selecționate din culturi asincrone și conțin organisme foarte asemănătoare deoarece aparțin aceleiași categorii de vârstă și/sau de dimensiune și ca urmare se divid aproape simultan.

▪ Procesul de diviziune sincronă durează numai câteva generații (2-3) deoarece diferențele individuale determină procese de defazare în ritmul de creștere, chiar între descendenții unei singure celule.

▪ Tehnicile de obținere ale culturilor sincrone pot fi grupate în două categorii:

A. Tehnici bazate pe selecție după dimensiuni de vârstă:

- *filtrarea prin teanc de hârtii de filtru suprapuse;*
- *separarea prin centrifugare în gradienti de densitate nemetabolizabili de microorganismul studiat;*
- *separarea prin filtrare pe filtre de membrană.*

B. Tehnici bazate pe modificări ale mediului, pot fi utilizate în numeroase variante:

- *expunerea microorganismelor auxotrofe la o perioadă de înfometare, în medii fără un factor de creștere esențial, înainte de a fi trecute într-un mediu complet;*
- *expunerea la doze subletale de radiații;*
- *expunerea la acțiunea unui antibiotic care inhibă sinteza proteinelor;*
- *expunerea microorganismelor fotosintetizante alternativ la întuneric și lumină;*
- *expunerea alternativă, unică sau repetată, la temperaturi optime și supra- sau suboptimale pentru creștere.*