

MICROBIOLOGIE APLICATĂ

Cunoașterea particularităților microorganismelor permite dezvoltarea unor aplicații în diferite domenii ale agriculturii, industriei alimentare, industriei farmaceutice, industriei chimice, a pielăriei, a protecției mediului ș.a.m.d. Trebuie remarcat faptul că biotehnologia a fost multă vreme identificată cu microbiologia industrială, incluzând doar aspectele legate de cultivarea microorganismelor, conservarea, ameliorarea prin metode convenționale (mutație și selecție a mutantelor de interes) și utilizarea lor practică pentru obținerea unor produse specifice. Ulterior, domeniul biotehnologiei s-a extins, incluzând și plantele, animalele, virusurile și culturile celulare precum și tehnologia ADN recombinant aplicată în scopuri industriale. În tabelul 1 sunt redate o parte dintre principalele microorganisme utilizate în biotehnologii din diferite domenii.

Tabelul 1. Principalele microorganisme cu importanță biotehnologică și producții lor (după Hunter-Cevera și Belt, 1996)

Domeniul de aplicare	Organismul	Tipul	Produsul
Industria alimentară și a băuturilor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Drojdie	Produse de panificație, vin, bere, sake
	<i>S.carlsbergensis</i>	Drojdie	Bere slabă
	<i>S.rouxii</i>	Drojdie	Sos de soia
	<i>Candida milleri</i>	Drojdie	Pâine franțuzească din aluat acrișor („Sour bread”)
	<i>Lactobacillus sanfrancisco</i>	Bacterie	Pâine franțuzească din aluat acrișor („Sour bread”)
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Bacterie	Iaurt
	<i>Lb.bulgaricus</i>	Bacterie	Iaurt
	<i>Propionibacterium shermanii</i>	Bacterie	Brânză elvețiană
	<i>Gluconobacter suboxidans</i>	Bacterie	Oțet
	<i>Penicillium roquefortii</i>	Fung filamentos	Brânză tip „Roquefort”
	<i>P.camembertii</i>	Fung filamentos	Brânză tip „Camembert” și „Brie”
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fung filamentos	Sake
	<i>Rhizopus</i>	Fung filamentos	Tempeh
	<i>Mucor</i>	Fung filamentos	Sufu (cheag microbial)
Industria chimică	<i>S.cerevisiae</i>	Drojdie	Etanol (din glucoză)
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Drojdie	Etanol (din glucoză)
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Bacterie	Acetonă și butanol
	<i>Xanthomonas campestris</i>	Bacterie	Polizaharide
	<i>Aspergillus niger</i>	Fung filamentos	Acid citric
Aminoacizi și	<i>Corynebacterium</i>	Bacterie	L-lizină; acid 5' inozinic; acid 5' guanilic

nucleotide aromatizante	<i>glutamicum</i>		
Proteine „monocelulare” („single-cell protein”)	<i>Candida utilis</i>	Drojdie	Proteine microbiene prin cultivare de deșeuri din industria hârtiei
	<i>S.lypolitica</i>	Drojdie	Proteine microbiene prin cultivare pe alcani
	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	Bacterie	Proteine microbiene prin cultivare pe metan sau metanol
Vitamine	<i>Eremothecium asbyi</i>	Drojdie	Riboflavină
	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Bacterie	Vitamina B12
	<i>Propionibacterium</i>	Bacterie	Vitamina B12
Enzime	<i>Aspergillus oryzae</i>	Fung filamentos	Amilaze
	<i>A.niger</i>	Fung filamentos	Glucoamilaze
	<i>Trichoderma reesii</i>	Fung filamentos	Celulază
	<i>S.cerevisiae</i>	Drojdie	Invertază
	<i>K.fragilis</i>	Drojdie	Lactază
	<i>S.lipolytica</i>	Drojdie	Lipază
	<i>Bacillus</i>	Bacterie	Proteaze
	<i>Aspergillus</i>	Fung filamentos	Pectinaze și proteaze
Polizaharide	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Bacterie	Dextran
	<i>X.campestris</i>	Bacterie	Gumă xantanică
Carotenoizi	<i>Blakeslea trispora</i>	Fung filamentos	Beta-caroten
	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Drojdie	Astaxantin
Industria farmaceutică	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Fung filamentos	Peniciline
	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Fung filamentos	Cefalosporine
	<i>Streptomyces sp.</i>	Bacterie	Amfotericin B, kanamicină, neomicină, streptomice, tetraciline etc
	<i>B.brevis</i>	Bacterie	Gramicidin S
	<i>B.subtilis</i>	Bacterie	Bacitracină
	<i>B.polymyxa</i>	Bacterie	Polimixina B
	<i>Rhizopus nigricans</i>	Fung filamentos	Transformarea steroizilor
	<i>Arthrobacter simplex</i>	Bacterie	Transformarea steroizilor
	<i>Mycobacterium</i>	Bacterie	Transformarea steroizilor
	<i>Escherichia coli</i> (tulpini obținute cu ajutorul tehnologiei ADN recombinant)	Bacterie	Insulină, hormonul uman de creștere, somatostatină, interferon
Bacterii entomopatogene	<i>B.thuringiensis</i>	Bacterie	Bioinsecticide
	<i>B.popilliae</i>	Bacterie	bioinsecticide

Odată ce un microorganism a fost selectat, fie prin metode clasice fie prin folosirea tehnicilor moleculare de modificare și „screening”, este necesară cultivarea sa în condiții care

să asigure exprimarea caracteristicilor specifice, utile din punct de vedere practic. În acest fel, folosirea unui microorganism în biotehnologia modernă se bazează pe principiile clasice ale culturilor microbiene, cunoscute și elaborate de multă vreme.

În cadrul biotehnologiei este foarte mult utilizat termenul de fermentație, acesta având mai multe semnificații pentru specialiști și nespecialiști:

- se referă la orice proces ce implică cultivarea unui microorganism, în condiții de aerobioză sau de anaerobioză;
- orice proces microbiologic ce se realizează în absența oxigenului;
- contaminarea alimentelor;
- producerea băuturilor alcoolice;
- utilizarea unui substrat organic ca donor sau acceptor de electroni;
- utilizarea unui substrat organic ca reducător și a aceluiași substrat parțial degradat ca oxidant (acceptor de electroni);
- creșterea dependentă de nivelul fosforilării substratului (Prescott și col., 1996).

Pentru aplicațiile industriale, microorganismele pot fi cultivate în tuburi, în baloane de capacitate mică sub agitare sau în instalații de mare capacitate (de la 3-4l până la 100.000 l), în funcție de scopurile urmărite. Instalațiile industriale de mare capacitate (fig.8.1) necesită investiții însemnate și operatori bine instruiți. De asemenea, toate etapele de lucru, începând cu creșterea microorganismelor și până la obținerea și purificarea produsului final presupun condiții aseptice, strict controlate.

În prezent există mai multe sisteme de cultivare a micro-organismelor, în fermentatoare de diferite tipuri, în funcție de microorganismul de interes. De obicei, instalațiile de cultivare a microorganismelor sunt însoțite de unități de dializă, care asigură atât îndepărtarea compușilor toxici eliminați în cursul procesului de fermentație cât și a produșilor finali și care permit ca noi cantități de mediu proaspăt să fie introduse în instalație pentru a obține culturi continue.

Alegerea mediului de cultură pentru cultivarea microorganismelor reprezintă o etapă cheie deoarece poate influența aspectele economice ale procesului de producție; de obicei se apelează la ingrediente ieftine care să constituie sursa de carbon, azot și fosfor (tabelul 2). De cele mai multe ori, drept surse complexe de carbon, azot și fosfor sunt utilizate hidrolizatele vegetale, ca și unele subproduse rezultate în diferite industrii (melasă, zeruri etc).

Tabelul 2. Componente majore ale mediilor de cultură folosite la nivel industrial (după Prescott și colab., 1996).

Sursa	Materia primă
Carbon și energie	Melasă, zer, grăunțe, deșeuri agricole (știuleți)
Azot	Extract de porumb („corn-steep liquor), făină de soia, săruri de amoniu, amoniac, nitrați, produși solubili proveniți de la distilării
Vitamine	Extracte totale vegetale sau diverse produse de origine animală
Fier	Substanțe anorganice
Soluții tampon	Carbonați sau fosfați
Agenți antispumare	Alcooli, silicon, esteri naturali, uleiuri vegetale

Concentrația și echilibrul între elementele minerale și factorii de creștere constituie un alt punct critic al cultivării microorganismelor la nivel industrial. De exemplu, biotina și tiamina, influențând reacțiile de biosinteză, controlează acumularea produsului de interes în numeroase fermentații. Mediul de cultură trebuie astfel stabilit încât sursele nutritive, după un anumit interval de timp, să devină factori limitativi ai creșterii, procesul fiind asociat deseori cu producerea unor metaboliți de interes.

Nivelul oxigenului limitează deseori procesele fermentative aerobe sau influențează modul de creștere, așa cum se întâmplă în cazul actinomicetelor și al fungilor filamentoși.

În privința selecției microorganismelor utile pentru procesele biotehnologice, acestea provin de obicei din medii naturale (probe de sol, de apă, fructe și produse alimentare contaminate etc). Odată selectate, tulpinile interesante pentru un anumit scop pot fi supuse unor procese de ameliorare, fie prin metode „clasice” (mutageneza chimică sau cu radiații ultraviolete; fuziunea protoplaștilor) fie prin aplicarea tehnicilor moleculare (tehnologia ADN recombinant). De exemplu, tulpina de *Penicillium chrysogenum* izolată în 1943 a fost supusă unor tratamente succesive de mutație și selecție astfel că, în prezent, culturile microbiene derivate de la tulpina originală produc de 55 ori mai multă penicilină decât aceasta. De asemenea, fuziunea protoplaștilor (celule lipsite de perete celular obținute prin tratamentul cu diferiți agenți de degradare a peretelui celular) mediată de polietilenglicol (PEG) poate asigura obținerea de tulpini recombinante cu proprietăți îmbunătățite sau modificate, avantajul principal fiind acela că pot fi depășite barierele normale de specie. În ultimii ani, aplicarea tehnologiei ADN recombinant a permis obținerea unor tulpini modificate genetic capabile de

a sintetiza compuși pe care, în mod normal, nu i-ar putem produce. Tulpinile microbiene de interes selectate (naturale sau ameliorate) sunt conservate prin metode specifice (liofilizare, transfer periodic, conservare sub ulei mineral, uscare etc).

1. Producții majore ale microbiologiei industriale

Metaboliții primari sunt compuși legați de sinteza componentelor celulare ce se realizează pe parcursul fazei de creștere (trofofaza). Acest grup de metaboliți include aminoacizii, nucleotidele și anumiți compuși finali de metabolism de tipul etanolului și acizilor organici. În plus, în timpul trofofazei mai sunt sintetizate și diferite enzime, mai ales exoenzime care prezintă importanță practică deosebită.

Metaboliții secundari se acumulează în timpul fazei ce urmează etapei de creștere activă, numită idiofază. Compușii sintetizați în această fază nu au legătură directă cu materialele celulare esențiale și cu creșterea normală. De exemplu, majoritatea antibioticelor și a micotoxinelor sunt produse pe parcursul acestei faze.

Cultivate în condiții ideale, fără limitări ale mediului, microorganismele tind să formeze cantități mari de biomasă și mai puțin să acumuleze anumiți compuși. Specialiștii au elaborat o serie de metode de „păcălire” a microorganismelor de interes astfel încât acestea să producă în exces compusul util, de obicei prin inducerea de mutații.

1.1. Antibioticele

Reprezintă un grup special de metaboliți secundari, sintetizați în cea mai mare parte de bacteriile din genul *Streptomyces* dar și de specii de fungi filamentoși (3). Majoritatea antibioticelor cu semnificație în practica medicală includ antibioticele β -lactamice de tipul penicilinei și cefalosporinei, aminoglicozidele și tetracilinele.

Penicilina este primul antibiotic descoperit de Fleming în 1929; ea este sintetizată de tulpini de *Penicillium chrysogenum*, iar producerea sa la nivel industrial este un foarte bun exemplu de fermentație în care ajustarea compoziției mediului asigură obținerea unor cantități maxime de antibiotic.

Tabelul 3. Principalele antibiotice sintetizate de microorganisme

Grupul de microorganism e producătoare	Antibioticul	Specia producătoare	Spectru de acțiune
Actinomicete	Amfotericina B	<i>Streptomyces nodosus</i>	Fungi
	Carbomicina	<i>S.halstedii</i>	Bacterii Gram pozitive
	Clortetraciclina	<i>S.aureofaciens</i>	Spectru larg
	Cloramfenicolul	<i>S.venezuelae</i>	Spectru larg
	Cicloheximida	<i>S.griseus</i>	Drojdii patogene
	Eritromicina	<i>S.erythaeus</i>	Majoritatea bacteriilor Gram pozitive
	Kanamicina	<i>S.kanamyceticus</i>	Bacterii Gram pozitive
	Oleandomicina	<i>S.antibioticus</i>	Stafilococi
	Oxitetraciclina	<i>S.rimosus</i>	Spectru larg
	Neomicina B	<i>S.fradiae</i>	Spectru larg
	Novobiocina	<i>S.niveus</i>	Bacterii Gram pozitive
Nistatin	<i>S.noursei</i>	Fungi	
Streptomicina	<i>S.griseus</i>	Bacterii Gram negative, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
Alte bacterii	Polimixina B	<i>Bacillus polymyxa</i>	Bacterii Gram negative
	Bacitracina	<i>B.licheniformis</i>	Bacterii Gram pozitive
Fungi	Cefalosporina	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Spectru larg
	Fumigilina	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Amoebă
	Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Fungi
	Penicilina	<i>P.chrysogenum</i>	Bacterii Gram pozitive

Cultivarea fungului în mediu bogat în glucoză stimulează creșterea vegetativă dar nu și producerea de penicilină; în schimb, utilizarea drept sursă de carbon a lactozei și limitarea concentrației surse de azot determină o acumulare însemnată a antibioticului după ce procesul de creștere a fost stopat. Atunci când se dorește sinteza unui anumit tip de penicilină, la mediul de fermentație sunt adăugați precursorii corespunzători. Fermentația este completă după 6-7 zile de cultivare după care biomasa micelială este separată de mediul de cultură, acesta din urmă fiind apoi prelucrat prin adsorbție, precipitare și cristalizare pentru a obține produsul de interes. Materialul brut obținut poate fi apoi supus unor tratamente chimice în urma cărora au loc anumite transformări ale penicilinei inițiale, cu formarea penicilinelor semisintetice.

Streptomicina este un metabolit secundar sintetizat de tulpini de *S.griseus* în condiții de mediu strict controlate. Utilizarea făinii de soia atât ca sursă de carbon cât și de azot, asigură producerea unor cantități mari de antibiotic în timpul fazei staționare de creștere. De asemenea, trebuie remarcat faptul că, în prezent, există adevărate programe de identificare a noi tulpini de streptomicete sau de fungi producătoare de antibiotice sau de alte substanțe biologice active, cum ar fi cele cu acțiune antitumorală.

1.2. Aminoacizii

Aminoacizii, așa cum sunt lizina și acidul glutamic, sunt utilizați în industria alimentară drept suplimente nutriționale în producerea pâinii sau ca stimulatori ai aromelor (așa cum este glutamatul de sodiu). Biosinteza aminoacizilor este realizată, în scopuri industriale de mutante reglatorii la care, calea metabolică de biosinteză a anumitor compuși este blocată într-o anumită etapă, corespunzătoare celei ce asigură producerea aminoacidului de interes. De exemplu, lizina este produsă de tulpini mutante de *Corynebacterium glutamicum* care prezintă blocată calea de biosinteză a homoserinei în etapa ce permite acumularea de lizină. În acest fel, pe parcursul unei fermentații ce durează trei zile se obțin 44g lizină/l cultură.

1.3. Acizii organici

Producerea acestor substanțe de către microorganisme prezintă o mare importanță practică și ilustrează efectele urmelor de metale asupra proceselor de sinteză și excreție. Cei mai importanți acizi produși prin fermentație microbiană sunt: acidul citric, acidul acetic, acidul lactic, acidul fumaric și acidul gluconic. Până la descoperirea biosintezei microbiene, o principală sursă de acid citric era reprezentată de fructele citrice (de obicei din Italia). În prezent, cea mai mare parte a acidului citric este de origine microbiană, el fiind utilizat în proporție de 70% în industria alimentară și a băuturilor și de 20% în industria farmaceutică.

Caracteristic procesului de fermentație pentru producerea acidului citric prin utilizarea tulpinilor de *Aspergillus niger* este limitarea concentrației de mangan și fier pentru a împiedica creșterea vegetativă peste un anumit punct. Succesul unei asemenea fermentații depinde de reglarea și funcționarea căii glicolitice și a ciclului acizilor tricarboxilici.

Producerea acidului citric se realizează în mod similar cu orice metabolit secundar: în trofofaza fermentației, o parte a substratului glucidic este utilizată pentru producerea de miceliu fungic iar o alta este convertită la CO₂ în cursul procesului respirator. În timpul idiofazei, restul substratului glucidic determină creșterea activității citrat sintetazei și scăderea activității aconitazei și a izocitrat dehidrogenazei, ceea ce conduce la acumularea și excreția de acid citric de către microorganismul aflat în condiții de stress. Din punct de vedere istoric, producerea acidului citric prin proces submers reprezintă primul exemplu de fermentație industrială aerobă.

Acidul acetic este un alt acid obținut prin fermentații microbiene, utilizările sale fiind mai ales în domeniul industriei alimentare, ca oțet. Obținerea și utilizarea oțetului se cunosc de aproximativ 10.000 de ani. Oțetul este produsul rezultat din conversia alcoolului etilic din vin la acid acetic cu ajutorul bacteriilor acetice din genurile *Acetobacter* și *Gluconobacter*. Producerea la nivel industrial a oțetului se realizează în instalații speciale, printr-o fermentație continuă (substratul se adaugă continuu în fermentator pentru a susține dezvoltarea bacteriilor, iar în aceeași măsură se îndepărtează produsul de fermentație). Concentrația maximă de acid acetic obținută prin acest procedeu este de 13-14%, fermentația realizându-se la 30°C timp de 35 de ore. Cele mai utilizate sortimente de oțet sunt: oțetul alb obținut din etanol distilat (etanolul folosit ca materie primă este fie de origine fermentativă fie chimică); oțet din cidru (produs din suc de mere fermentat); oțet din vin (produs din vin de calitate scăzută supus oxidării aerobe); oțet din malț (produs din alcool obținut prin fermentația porumbului sau a orzului, pretratate cu enzime pentru eliberarea glucidelor necesare dezvoltării bacteriilor acetice).

1.4. Enzimele

Așa cum s-a prezentat pe parcursul capitolelor anterioare, microorganismele produc o gamă largă de enzime, dintre care unele prezintă importanță practică deosebită. Între cele mai utilizate enzime microbiene se numără proteazele și amilazele. Proteazele, de exemplu, sunt utilizate în industria detergenților; multe dintre acestea sunt sintetizate de tulpini alcalifile aparținând mai ales speciei *B.licheniformis*. Asemenea enzime au pH optim de acțiune între 9,0 și 10,0, rămânând astfel active în condițiile alcaline ale soluțiilor de detergenți.

Un alt grup important de enzime îl reprezintă amilazele și glucoamilazele implicate în procesele industriale de obținere a glucozei pornind de la amidon. Majoritatea enzimelor de

acest tip, utilizate în diferite procese industriale, sunt de origine fungică. Glucoza produsă în urma acțiunii enzimatică poate fi apoi folosită pentru producerea fructozei prin utilizarea glucozo-izomerazei, rezultând în final un îndulcitor foarte eficient (sirop de glucoză și fructoză). Materia primă utilizată este reprezentată de amidonul din porumb, grâu sau cartof. Amidonul este supus unor procese de prelucrare secvențiale ce presupun utilizarea mai multor tipuri de enzime microbiene: mai întâi α -amilaza care fragmentează amidonul; urmează glucoamilaza care asigură formarea glucozei și apoi glucozo-izomeraza care convertește glucoza la fructoză, iar produsul final este un sirop cu concentrație mare de fructoză utilizat mai ales pentru îndulcirea băuturilor răcoritoare.

O categorie mai nouă de enzime dar cu aplicații practice deosebite este reprezentată de enzimele produse de microorganismele extremofile, discutate într-un capitol anterior. Dintre acestea, sunt de menționat enzimele cu rezistență la temperaturi foarte mari, așa cum este pululanaza produsă de *Thermococcus litoralis* a cărei activitate enzimatică optimă se desfășoară la 118°C, sau feredoxina sintetizată de *Pyrococcus furiosus* care nu este denaturată la 140°C. Aplicațiile practice ale enzimelor sintetizate de bacteriile termofile au fost prezentate într-un capitol anterior.

1.5. Bioinsecticide microbiene

O serie de specii microbiene manifestă proprietăți inhibitorii față de diferite categorii de insecte sau de nematode. Biopreparatele insecticide obținute pe bază de bacterii, fungi sau virusuri pot înlocui cu destul succes tratamentele cu diferite substanțe chimice toxice.

Cele mai cunoscute bioinsecticide au la bază utilizarea bacteriei *Bacillus thuringiensis* capabilă să producă, în cursul sporulării, o proteină cu efecte toxice pentru insecte. Studiile efectuate asupra acestei specii au dovedit că există mai multe varietăți cu acțiune specifică față de anumite tipuri de insecte: *B.thuringiensis var.kurstaki* activă pe coleoptere și lepidoptere, *B.thuringiensis var.israeliensis* activă pe diptere, *B.thuringiensis var.tenebrionis* cu efect specific împotriva gândacului de Colorado etc (Schnepf și col., 1998). Pentru obținerea biopreparatului bacteriile sunt cultivate în fermentatoare până în faza în care sunt eliberați sporii prin liza celulară, moment în care în mediu este eliminată și proteina cristal (δ -endotoxina) (aproximativ 30 de ore). După depunerea prin centrifugare a sporilor și a

cristalelor proteice, sedimentul este uscat și inclus într-un material inert astfel încât se obține o pulbere umectabilă care poate fi aplicată pe plante.

O serie de biopreparate se bazează pe virusuri patogene pentru insecte (baculovirusuri), existând o mare specificitate față de insecta combătută. Cele mai moderne folosesc baculovirusuri de tip sălbatic sau variante modificate genetic care acționează foarte eficient mai ales pe larvele de insecte.

1.6. Biopolimerii

Biopolimerii (de tipul polizaharidelor) sunt produși de numeroase microorganisme, ei având numeroase utilizări în industria farmaceutică și alimentară datorită capacității lor de gelificare și de a modifica caracteristicile de curgere ale lichidelor. Avantajele utilizării polizaharidelor microbiene este aceea că producerea lor este independentă de scăderea resurselor naturale, de condițiile climatice sau de evenimente politice care influențează de obicei aprovizionarea cu materii prime. În acest caz utilajele de producție a biopolimerilor pot fi localizate în apropierea surselor de substraturi nutritive ieftine (de exemplu, în apropierea zonelor agricole). Cel puțin 75% dintre polizaharidele microbiene sunt utilizate ca stabilizatori, pentru dispersia particulelor, drept agenți de formare a filmelor sau pentru a reține apa din produse variate (tabelul 4).

Tabelul 4. Caracteristicile și utilizările biopolimerilor microbieni (după Prescott și col., 1996)

Tipul de biopolimer	Organismul producător și aplicații	Stadiul de aplicare
Dextran	Produs de specii ale genurilor <i>Klebsiella</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Leuconostoc</i> ; este un glucan cu legături de tip α utilizat în medicină ca absorbant și ca diluant pentru sânge („blood expander”); poate forma un strat hidrofilic la suprafața țesuturilor arse	P
Xantan	Produs de <i>Xanthomonas campestris</i> ; folosit în industria alimentară și în programele de recuperare secundare a țițeiului	P
Microfibrile de celuloză	Produs de o tulpină de <i>Acetobacter</i> ; utilizare în industria alimentară	D
Pululan	Sintetizat de drojdia <i>Aureobasidium pullulans</i> ; poate servi drept material biodegradabil util pentru împachetarea alimentelor, putând înlocui amidonul în anumite aplicații	D
Alginat microbial	Principalul producător este <i>Azotobacter vinelandii</i> ; poate înlocui alginatii produși de alge; poate fi folosit pe scară largă ca stabilizator alimentar	D
Poliesteri	Tulpini de <i>Pseudomonas oleovorans</i> produc poliesteri optic activi în condițiile limitării sursei de azot; folosit pentru obținerea unor materiale plastice speciale	D
Scleroglucan	Produs de fungi din genul <i>Sclerotium</i> ; formează un gel vâscos ce manifestă pseudoplasticitate fiind utilizat în industria petrolului	D

P = producție; D = dezvoltare

1.7. Biosurfactanții

Numeroși surfactanți care sunt utilizați în scopuri comerciale sunt produși de sinteză chimică. În prezent există un interes crescut în utilizarea biosurfactanților mai ales în domeniul protecției mediului unde biodegradarea constituie o condiție esențială. Biosurfactanții sunt folosiți pentru emulsifiere, umezire și dispersia fazelor ca și pentru solubilizare, proprietăți esențiale în bioremediere și recuperarea țițeiului.

Majoritatea biosurfactanților microbieni sunt glicolipide care prezintă regiuni hidrofobe și regiuni hidrofile dar structura finală și caracteristicile lor depind de condițiilor speciale de creștere și de sursa de carbon folosită. Dintre cele mai cunoscute specii producătoare sunt de menționat *Pseudomonas aeruginosa* (sintetizează ramnolipidul R3) și *B.subtilis* (produce surfactin)(fig.1).



Fig.1. Acțiunea la nivel de laborator a unui surfactant de tip glicolipidic (EM) produs de *P.aeruginosa* asupra petrolului aflat într-o soluție (după Prescott și col., 1996).

O aplicație importantă a biosurfactanților este aceea de agenți de dispersare ai unor compuși, așa cum este petrolul, ea fiind probată în cazul poluării cu petrol ca urmare a avariei tancului petrolier Exxon Valdez. poluării cu petrol ca urmare a avariei tancului petrolier Exxon Valdez.

2. Procese de bioconversie microbiană

Una dintre cele mai spectaculoase descoperiri din domeniul microbiologiei industriale a fost aceea a faptului că microorganismele pot realiza o serie de reacții chimice care nu pot fi realizate de chimia organică. Utilizarea microorganismelor pentru realizarea unor asemenea reacții poartă denumirea de bioconversie sau biotransformare și implică creșterea unui microorganism (bacterii, actinomicete, drojdii și fungi filamentoși) la nivel de fermentator. În mediul de cultură se adaugă, la anumite intervale de timp, compusul (sau compușii chimici) ce se dorește a fi modificat.

În anumite variante, biotransformarea poate fi realizată prin utilizarea enzimelor izolate din celulele microbiene, libere sau imobilizate pe diferite suporturi.

Cel mai cunoscut proces de bioconversie mediat de microorganisme este cel al producerii steroizilor, compuși cu semnificație medicală deosebită. Astfel, în producerea hidrocortizonului și cortizonului, steroizi utilizați în tratarea anumitor afecțiuni (cum ar fi unele ale pielii), sunt folosiți fungii filamentoși din specia *Rhizopus nigricans* care realizează hidroxilarea stereospecifică a unui precursor al cortizonului. Majoritatea bioconversiilor steroizilor implică hidroxilări de acest tip, ele putând fi realizate de diferite specii de fungi, astfel că producția anuală a unor asemenea compuși steroidici ajunge la peste 800 t/an.

3. Biodegradarea și biodeteriorarea

Biodegradarea este un proces ce acționează în sens pozitiv atât în natură cât și în economia societății umane. Pe plan global, procesele biodegradative au o contribuție majoră în circuitul elementelor chimice în natură, împiedicând acumularea compușilor reziduali sau contaminanți în mediu. Biodeteriorarea constituie un termen general ce se referă la efectul nedorit al acțiunii microorganismelor asupra diverselor produse agroalimentare sau a altora nealimentare, cum ar fi: hârtia, picturile, metalele, textilele, betoanele și a alte materiale. În acest caz, acțiunea microorganismelor poate determina asupra substratului diferite alterări fizice (modificarea consistenței vopselei, sfărâmarea lemnului, perforarea conductelor metalice etc), modificări chimice, impurificări (pătarea țesăturilor prin producerea unor pigmenți) sau modificări funcționale.

Biodeteriorarea produselor agroalimentare prezintă o mare importanță practică prin pagubele pe care le generează. Efecte negative asupra acestor produse au atât bacteriile cât și fungii.

Astfel, fungii cresc rapid pe produsele cerealiere atunci când acestea sunt ținute în condiții de umezeală. De exemplu, infectarea boabelor de orz cu ascomiceta *Claviceps purpurea* este asociată cu acumularea unor alkaloidi cu efecte halucinogene, alterarea stării generale și chiar cu moartea organismului animal, inclusiv uman, care a consumat produse contaminate.

Carcinogenii de origine microbiană includ aflatoxinele și fumosinelor. Aflatoxinele au fost descoperite în 1960 când 100.000 de pui de curcă au murit datorită consumului de făină de arahide contaminată cu fungul filamentos din specia *Aspergillus flavus*. Microorganismele de acest tip produc toxine ce acționează asupra ADN al celulelor contaminate (de obicei celule din ficat), efectul fiind mutagen și carcinogen. Aflatoxinele pot fi separate cromatografic și evidențiate în lumină UV datorită fluorescenței lor caracteristice. Asemenea compuși toxici au fost identificați nu numai în grâne ci și în lapte, bere, cacao, stafide și făină de soia etc.

Mai recent, în 1988 a fost identificată o altă toxină cu efect carcinogen, numită fumosină. Ea este sintetizată de *Fusarium moniliforme* și determină efecte grave la animalele și la oamenii care consumă produse contaminate (de obicei porumb sau produse derivate de la acesta).

Carnea și produsele lactate, datorită valorii nutriționale ridicate și a prezenței unor compuși ușor metabolizabili constituie un mediu ideal pentru diverse microorganisme contaminante care determină, în principal, procese de proteoliză și putrefacție.

Microorganismele de degradare pot fi atât bacterii cât și fungi: ele descompun acidul lactic produs de bacteriile lactice, astfel că aciditatea este treptat eliminată ceea ce permite dezvoltarea bacteriilor proteolitice. Acestea determină apariția unui miros putrid și a gustului amar al produsului contaminat.

Degradarea se produce și în cazul alimentelor procesate minimal sau concentrate. În primul caz, principalele efecte nedorite sunt determinate de bacteriile din genurile *Lactobacillus* și *Leuconostoc* care produc un gust sau un miros caracteristic, nedorit. Sucurile concentrate pot fi alterate prin contaminarea cu drojdiile din genurile *Saccharomyces* și *Candida*.

Fructele pot fi contaminate cu o mare varietate de microorganisme. Sursele posibile de contaminare pot fi aerul, insectele, animale sălbatice și cele domestice, omul, solul și apa. Datorită compoziției chimice, fructele reprezintă un mediu propice pentru creșterea și multiplicarea mai ales a drojdiilor și mucegaiurilor și mai puțin a bacteriilor (doar cele rezistente la valori scăzute ale pH se pot dezvolta și în fructe).

Dintre mucegaiurile care determină reducerea duratei de conservabilitate a fructelor și produselor din fructe pot fi amintite genurile: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*,

Phomopsis, Diplodia, Phytophthora, Sclerotinia, Fusarium, Gleosporium, Aspergillus, iar dintre genurile de drojdii: *Saccharomyces, Hanseniaspora, Torulopsis, Torula, Mycoderma, Candida, Pichia, Kloeckera, Hansenula, Debaromyces* etc.

Dintre bacteriile care se pot găsi în fructe (genurile *Bacillus, Staphylococcus, Enterobacter, Escherichia și Lactobacillus*) cel mai frecvent se întâlnesc lactobaciliile datorită toleranței lor la pH scăzut.

Procesul de contaminare și degradare a produselor agroalimentare, inclusiv a fructelor, poate fi prevenit prin utilizarea unor metode variate de conservare (tabelul 5).

Tabelul 5. Principalele metode de conservare a produselor alimentare

Tehnica generală	Exemple de procesare și conservare
Asepsie, îndepărtarea microorganismelor	Prevenirea contaminării microbiene prin filtrare sau centrifugare
Scăderea temperaturii	Refrigerare, congelare
Temperaturi înalte	Inactivarea termică parțială sau totală a microorganismelor (pasteurizare și conservare în cutii)
Îndepărtarea apei	Liofilizare sau uscare în dispozitive speciale
Scăderea accesibilității apei	Adăugarea unor soluții ce conțin concentrații ridicate de sare sau zahăr pentru a scădea valoarea a_w
Conservarea chimică	Adăugarea unor substanțe inhibitoare specifice (de exemplu, acizi organici, azotați, dioxid de sulf, bacteriocine)
Radiații	Utilizarea radiațiilor ionizante (radiații gamma) sau neionizante (UV)

Pentru a micșora cât mai mult influențele negative pe care le pot avea microorganismele asupra fructelor este necesar ca prin aplicarea tehnologiilor frigorifice, să se ia măsuri, dacă nu de reducere a numărului de microorganisme, cel puțin de micșorare a posibilităților de multiplicare a acestora. Din acest punct de vedere, tratamentele preliminare (de exemplu spălarea cu apă clorinată) și eliminarea surselor de contaminare au o importanță deosebită. De asemenea este esențială prerăcirea, mai ales atunci când fructele urmează a fi congelate în ambalaje de dimensiuni mari. De asemenea, adăugarea de zahăr reprezintă o cale de a se reduce acțiunea microorganismelor în timpul congelării și depozitării unor fructe.

Ca temperaturi minime de creștere, citate în literatura de specialitate, se menționează cele de -12°C ... -18°C în cazul mucegaiurilor, -10°C ... -15°C în cazul drojdiilor și -5°C ... -12°C în cazul bacteriilor. În fructele congelate se pot găsi totuși spori de mucegaiuri, celule de drojdii și unele bacterii rezistente în medii acide. După decongelare, acestea pot influența

negativ calitatea fructelor dacă nu are loc o depozitare în mod corespunzător până la utilizare (Niculiță și Popa, 2002).

Legumele, ca și fructele pot fi contaminate cu o mare diversitate de microorganisme, având aproximativ aceleași surse de contaminare. Dintre microorganismele prezente pe și în legume pot fi amintite: bacterii (genurile *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Xanthomonas*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* precum și bacterii lactice), mucegaiuri (genurile *Botrytis*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichothecium*, *Cladosporium*) și drojdii (genurile *Saccharomyces*, *Pichia* etc).

Pentru inactivarea microorganismelor, operația de blanșare are o mare importanță în tehnologia de congelare a legumelor. Răcirea cât mai rapidă după blanșare, precum și eliminarea surselor de recontaminare cu microorganisme sunt elemente tehnologice de mare importanță. Tratamentul termic de fierbere cu o durată de cel puțin câteva minute la care sunt supuse legumele congelate, înainte de a fi consumate, distruge aproape toate microorganismele rămase în stare vegetativă după congelare (Niculiță, 2000).

Contaminarea microbiană se produce chiar și în cazul alimentelor conservate (a conservelor), fenomenul realizându-se de obicei în cursul prelucrărilor din timpul conservării (materia primă sau apa au fost contaminate). Alimentele conservate alterate prezintă culoare, textură, miros și gust modificate datorită fermentației acide și a producerii de CO₂ și H₂S. În anumite cazuri, contaminarea cu anaerobi determină un aspect caracteristic al conservelor (bombarea lor) datorită producerii și acumulării de gaze, iar dacă în acest proces de contaminare a fost implicată bacteria *Clostridium botulinum* atunci în produsul alimentar conservat se acumulează și toxina botulinică ce poate determina moartea persoanelor care o ingerează accidental.

De asemenea, prin intermediul alimentelor contaminate cu microorganisme pot fi transmise diverse boli, unele produse de microorganismele din alimente („food-borne infections”) iar altele de tipul intoxicațiilor alimentare. În primul caz este vorba de ingerarea unui microorganism patogen aflat la nivelul unui produs alimentar: de exemplu, salmonelioza determinată de ingerarea de bacterii din genul *Salmonella*, listerioza produsă de *Listeria monocytogenes*, gastroenteritele produse de contaminarea cu *Campylobacter jejuni* sau colitele hemoragice (unele mortale) determinate de tulpina *E.coli* 0157:H7, etc. Toate aceste

exemple de boli sunt asociate cu nerespectarea unor măsuri de igienă. În privința intoxicațiilor alimentare acestea sunt produse de toxinele acumulate în alimentele alterate și sintetizate de diferite specii bacteriene, cum ar fi: *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *C.perfringens* sau *Bacillus cereus*.

Elaborarea unor mijloace eficiente și rapide de detectare a microorganismelor patogene din produsele alimentare prezintă o importanță majoră în domeniul controlului calității produselor agroalimentare și o cerință esențială pentru comercializarea anumitor produse perisabile. Metodele clasice de cultivare a eventualelor patogeni necesită un timp îndelungat pentru a obține rezultate iar identificarea este deseori complicată. În ultimii ani au fost puse la punct metode moderne ce se bazează, pe de o parte, pe tehnici imunologice și, pe de altă parte, pe cele moleculare. Tehnicile imunologice presupun utilizarea anticorpilor specifici marcați fluorescent, ca în cazul tehnicii ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay”) sau radioactiv ca în cazul tehnicilor de radioimunodetecție.

Metodele moleculare sunt utile pentru:

- detectarea prezenței unui singur patogen specific;
- detectarea virusurilor care nu pot fi cultivate în mod corespunzător;
- identificarea patogenilor ce cresc greu pe medii de cultură sau a celor care nu pot fi cultivați „in vitro”.

Patogenii pot fi identificați în prezent prin utilizarea unor fragmente de ADN sau ARN specifice (numite probe), complementare cu anumite secvențe din genomul unor anumitor patogeni. Probele pot fi formate din 10-10.000 pb marcate radioactiv sau neradioactiv, ele fiind specifice pentru fiecare tip de patogen în parte.

În alte variante, folosirea tehnologiei PCR (reacția de polimerizare în lanț prin folosirea unor ADN polimeraze termostabile și a unor primeri specifici) permite amplificarea unor fragmente de ADN specifice pentru un anumit tip de patogen și apoi evidențierea lor electroforetică.

Biodeteriorarea altor produse, nonalimentare. Așa cum s-a arătat mai sus, în afară de alterarea produselor agroalimentare, microorganismele pot să determine modificări nedorite și asupra altor categorii de produse.

O acțiune nedorită exercitată de microorganismele este asupra combustibililor pentru avioane. Astfel, în rezervoarele și în instalațiile de păstrare a kerosenului pot exista urme de

apă care, acumulându-se, pot forma o interfață apă-hidrocarburi la nivelul căreia se dezvoltă microorganismele. Cea mai frecventă specie întâlnită în asemenea condiții este *Cladosporium resinae*, numită și „fungul de kerosen” care, prin formarea de biomasă poate bloca orificiile instalațiilor de pompare. Depășirea acestor inconveniente provocate de creșterea unor microorganisme poate fi realizată prin utilizarea unor inhibitori și prin măsurile de curățare frecventă a rezervoarelor de depozitare a combustibililor.

Degradarea materialului vegetal din depozitele fabricilor de hârtie conduce la pagube însemnate deoarece acțiunea microorganismelor poate determina scăderea calității hârtiei, îngălbenirea sa și chiar deteriorarea produsului final. Microorganismele care cresc la nivelul soluțiilor utilizate în procesarea materiei prime lemnoase formează un strat mucos la nivelul instalațiilor și scad eficiența tratamentelor chimice, afectând cantitatea și calitatea produsului final. Folosirea unor compuși chimici pe bază de mercur, denumiți biocide, poate limita pagubele din domeniu dar, în același timp, poate avea efecte poluante asupra apelor ce primesc deversările de la asemenea fabrici.

Una dintre cele mai spectaculoase provocări pentru specialiștii în biodeteriorare este controlul creșterii microorganismelor de la nivelul operelor de artă și al picturilor în mod special. Originea microorganismelor contaminante se află în vopseaua utilizată: ele pot infecta vopseaua atât înainte cât și după folosire. Dintre microorganismele implicate în asemenea proces sunt de menționat diverse specii de bacterii și fungi:

- bacterii: *Alcaligenes sp.*, *Bacillus cereus*, *B.mycooides*, *Flavonobacter invisibile*, *Micrococcus albus*, *Sarcina flava*
- fungi: *Alternaria dianthicola*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Pullularia pullulans etc.*

Pentru a elimina posibilitatea contaminării se utilizează o serie de compuși toxici cu efect antibiotic, de cele mai multe ori pe bază de mercur, dar care sunt poluante.

Coroziunea microbiană a metalelor ridică o serie de probleme economice deoarece pot fi afectate diverse instalații industriale sau rețele de țevi. Microorganismele implicate în asemenea procese sunt de obicei anaerobe, ele aparținând genurilor *Desulfovibrio* (arhebacterie metanogenă capabilă să utilizeze fierul drept sursă de electroni în metabolismul ei), *Enterobacter* și *Clostridium* (bacterii sulfat reducătoare sau producătoare de acizi

organici). Microorganismele implicate în procesele de coroziune determină mai întâi formarea unor umflături la nivelul metalului și apoi perforarea țevelor de fier. Până în prezent, metodele de prevenire a contaminării microbiene a instalațiilor nu s-a dovedit a fi eficientă fiind necesară elaborarea de noi strategii de acțiune.

În privința betoanelor, și acestea pot fi degradate în urma acțiunii unor microorganisme. Majoritatea problemelor de biodeteriorare de la nivelul autostrăzilor sau a conductelor de ape reziduale sunt datorate bacteriilor din specia *Thiobacillus concretivorus* (redenumită ca *T.thiooxidans*).

3.1. Aspecte pozitive ale proceselor de biodegradare

În ciuda numeroaselor probleme pe care microorganismele le pot produce ca urmare a capacităților degradative, unele specii prezintă interes practic deoarece pot conduce la îndepărtarea unor compuși poluanți sau xenobiotici din mediu, restabilind calitatea mediului. Acest fenomen a primit denumirea de **bioremediere**.

Este cunoscut faptul că deversările accidentale de țiței cauzează grave probleme mediului înconjurător. Țițeiul este un amestec foarte complex de hidrocarburi însumând sute de compuși individuali cu structură chimică și greutate moleculară diferite. Clasele de hidrocarburi atacabile de microorganisme sunt:

- fracțiunea alifatică (saturată) alcătuită din alcani, izoalcani și cicloalcani. Se consideră că hidrocarburile cu lanțul lung sunt cel mai ușor degradate de microorganisme;
- fracțiunea aromatică reprezentată de compuși aromați nesaturați, așa cum este benzenul. Aceștia sunt greu atacați de microorganisme deși au fost identificate unele specii de bacterii capabile să degradeze compuși de tipul benzenului sau toluenului;
- fracțiunea asfaltică include componenți cu structură complexă, foarte greu de degradat (Zarnea, 1994).

De aceea, realizarea unui amestec corespunzător de microorganisme capabile să degradeze compuși aromatici, policiclici și alifatici din petrolul poluant constituie un scop major al cercetărilor în domeniu. De exemplu, în 1974, A.M.Chakrabarty a brevetat primul microorganism, o tulpină de *Pseudomonas* care conținea mai multe plasmide la nivelul cărora

erau localizate gene implicate în degradarea hidrocarburilor. Această bacterie prezenta unele avantaje în privința degradării unor reziduuri petroliere. Adăugarea în mediu a unui asemenea microorganism și funcționarea sa optimă depinde de o serie de factori:

- factori ce țin de particularitățile microorganismului: capacitate de a degrada hidrocarburile; capacitate de a fi menținută în culturi în laborator; supraviețuire și activitate în condițiile mediului marin (temperatură scăzută și salinitate ridicată); participare la procesul de bioemulsifiere; absența unor efecte secundare toxice etc;
- factori de țin de condițiile de mediu: prezența alături de hidrocarburi a unor surse suplimentare de nutrienți (surse de N, P, K sau Fe); absența unor compuși toxici (fenoli, metale grele) care pot afecta microorganismele; existența unei aerări corespunzătoare care să permită desfășurarea normală a proceselor metabolice; posibilitatea ca microorganismele de interes să intre în contact cu hidrocarburile de degradat.

În prezent s-a stabilit că microorganismele capabile să degradeze hidrocarburile aparțin la 30 de genuri și 100 de specii diferite, dintre acestea cele mai frecvente fiind:

- bacterii: *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Vibrio* etc;
- cianobacterii: *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*;
- levuri: *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*;
- fungi filamentoși: *Aspergillus*, *Acromonium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* etc.

Chiar dacă în laborator tehnologiile de utilizare a culturilor pure de microorganisme de degradare au dat rezultate foarte bune, utilizarea lor în condiții „in vivo” nu s-a ridicat la nivelul așteptărilor. Cea mai importantă testare de acest tip a fost realizată în 1989 cu ocazia accidentului tancului petrolier Exxon Valdez care a determinat poluarea cu petrol a coastelor peninsulei Alaska. Ulterior au fost realizate și alte testări care au presupus o serie de variante ale tehnologiei, incluzând adausul de nutrienți, de dispersanți chimici, de biosurfactanți etc (Scragg, 1999).

Biodegradarea microbiană a petrolului poate asigura decontaminarea unor soluri poluate sau a unor sedimente; în acest caz se utilizează populații mixte de microorganisme (consorții) capabile să realizeze degradarea eficientă a mai multor compuși poluanți. De

asemenea, spargerea unor conducte de petrol pot determina pagube însemnate prin deversările ce se produc. Solurile conțin în mod natural aproximativ 1% bacterii sau fungi ce pot utiliza hidrocarburi, alături de cianobacterii sau unele alge. În cazul solurilor contaminate cu hidrocarburi s-a dovedit că numărul micro-organismelor din respectivul habitat crește, dar diversitatea acestora este redusă (Mesarch și Nies, 1997).

Biodegradarea hidrocarburilor este asociată cu creșterea microbiană, cu metabolismul acestora și, prin urmare cu factorii ce afectează creșterea și metabolismul microbian. Dacă microorganismele nu pot utiliza hidrocarburi drept unică sursă de carbon, este necesară adăugarea unor substanțe care să poată fi folosite drept sursă nutritivă. În asemenea situații se utilizează tratamente mixte, cu inocul microbian și cu diferite substanțe chimice (cum ar fi sulfatul de amoniu și fosfatul mono- și disodic).

Un microorganism cu proprietăți degradative speciale este fungul din specia *Phanaerochaete chrysosporium*. Denumit și fungul putregaiului alb datorită faptului că este capabil să degradeze lignina din lemn, această specie manifestă în plus și capacități de degradare enzimatică a numeroși compuși xenobiotici (benzen, toluen, etilbenzen, compuși clorurați cum ar fi triclorfenolul etc). În afara acestei specii, în procesele de degradare a compușilor xenobiotici mai pot fi implicate bacterii din genurile *Flavobacterium*, *Arthrobacter* sau *Rhodococcus* (Lo și col., 1998) În asemenea procese degradative intervin enzime extracelulare de tipul lignin-peroxidazelor, mangan-peroxidazelor, glioxal oxidazelor ș.a.m.d.

Un exemplu de compus xenobiotic larg utilizat este atrazina, erbicid folosit de peste 40 de ani pentru distrugerea buruienilor. De-a lungul timpului s-a dovedit că acest erbicid este rezistent la degradare dar, în ultimii ani, au fost izolate conștii microbiene și chiar culturi bacteriene pure capabile să distrugă atrazina până la CO_2 și NH_2 , pe parcursul mai multor etape, (Mandlebaum și col., 1995). La procesul de degradare al atrazinei pot participa bacterii din genurile *Clavibacter* (acționează în primele două etape ale procesului) și *Pseudomonas* (conțin gene plasmidiale ce codifică enzimele implicate în ultimele etape de degradare).

O altă aplicație importantă a capacităților degradative ale microorganismelor este recuperarea metalelor din minereuri sărace sau din deșeurile miniere (depozitele de steril).

Biosolubilizarea se referă la ansamblul de procedee tehnice și tehnologice care duc la eliberarea metalelor de interes, acestea incluzând sfărâmarea minereului, extracția și selecția

categoriilor de minerale și de concentrate, solubilizarea propriu-zisă și extracția metalelor. Procedeele respective se încadrează în domeniul hidrometalurgiei microbiene. Printre microorganismele implicate în realizarea acestor procese de biosolubilizare sunt de menționat speciile de bacterii chemolitotrofe: *Thiobacillus ferrooxidans*, *T.thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Thermothrix thioparus* etc.

Una dintre aplicațiile majore ale acestui fenomen este reprezentată de recuperarea cuprului din minereurile sărace cu ajutorul populațiilor naturale de *T.ferrooxidans*. Deși procedeul este foarte lent, biosolubilizarea bacteriană constituie o alternativă biotehnologică eficientă pentru recuperarea metalelor prețioase din minereuri sărace, din sisteme acvatice sau care sunt rezistente la alte metode de îndepărtare. Utilizat în diferite țări pentru recuperarea cuprului, uraniului sau aurului, procedeele de biosolubilizare pot fi adaptate și pentru alte metale, cum ar fi zincul (din blendă – ZnS), plumbul (galenă – PbS), nichelul sau cobaltul.

Deseori, celulele microbiene pot fi utilizate pentru concentrarea unor metale prețioase din ape reziduale diluate. Acesta este cazul celulelor algei *Chlorella vulgaris* care sunt folosite în tehnologii de recuperare a aurului sau argintului, alga fiind capabilă să acumuleze intracelular respectivele metale.

4. Produse alimentare obținute cu ajutorul microorganismelor

Obținerea de produse alimentare prin utilizarea microorganismelor poate îmbrăca diferite aspecte: pe de o parte microorganismele ca atare pot constitui un produs alimentar (de exemplu, macromicetele), iar pe de altă parte, acestea realizează convertirea unor materii prime de origine vegetală sau animală (lapte, carne, legume etc) pentru realizarea unui produs caracteristic.

Folosirea **biomasei microbiene** ca sursă nutritivă pentru animale sau om este cunoscută de multă vreme, existând chiar practici tradiționale în diferite zone ale lumii de utilizare a unor microorganisme drept sursă de hrană. Acesta este cazul unor populații africane pentru care cianobacteria *Spirulina platensis* reprezintă o sursă de hrană. În prezent, în numeroase țări ale lumii se produce biomasă de *Spirulina* care, datorită conținutului în proteine, vitamine sau alți factori nutritivi, este folosită la supliment nutritiv sau chiar ca medicament. De asemenea, biomasa de drojdii („single cell protein”) obținută în instalații speciale prin cultivare pe diverse substraturi ieftine (metanol, deșeuri vegetale etc) poate fi utilizată drept supliment nutritiv mai ales pentru animale, iar în unele situații, chiar și pentru om (tabelul 5). Obținerea biomasei microbiene se

realizează în fermentatoare de mare capacitate (40.000-200.000 litri) care permit asigurarea condițiilor optime de cultivare.

Tabelul 8.5. Utilizările industriale ale drojdiilor și produsele obținute

Domeniul de utilizare	Produsul
Producerea de biomasă de drojdii	Drojdie pentru panificație
	Produs liofilizat folosit ca supliment nutritiv
	Produs liofilizat utilizat în hrana animalelor
Derivate din drojdii	Extract de drojdii pentru mediile de cultură
	Vitamine din complexul B; vitamina D
	Enzime pentru industria alimentară (invertază, galactozidază)
	Substanțe chimice pentru cercetare (ATP, NAD ⁺ , ARN)
Produse de fermentație	Etanol
	Glicerol
Băuturi alcoolice	Bere
	Vin
Băuturi distilate	Whiskey
	Vodka
	Coniac
	Rom

Macromicetele sunt fungi filamentoși capabili de a forma corpi de fructificație comestibili, cunoscute și folosite în alimentația umană de foarte multă vreme. Cele mai cunoscute specii de macromicete cultivate în condiții controlate sunt *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* și *Lentinus edulus*. Ciupercile comestibile au valoare nutritivă relativ redusă dar ele furnizează anumite cantități de proteine, de grăsimi libere și chiar vitamine din complexul B.

Produsele lactate sunt variate atât în privința particularităților fizico-chimice și nutriționale cât și a tipurilor de microorganisme implicate în obținerea lor (tabelul 6).

Brânzeturile sunt cunoscute de foarte multă vreme (există informații despre obținerea brânzeturilor încă de acum 8000 ani), în prezent existând aproximativ 2.000 de sortimente răspândite în întreaga lume, grupate în 20 de categorii majore. Fabricarea brânzeturilor presupune o serie de etape succesive: coagularea laptelui în prezența cheagului de origine animală sau microbială; separarea zerului de laptele încheagat; introducerea în forme speciale care să permită producerea de acid și dobândirea consistenței specifice; „maturarea” preparatului pentru

dobândirea aromei și texturii caracteristice. În diferitele etape ale procesului de fabricație sunt utilizate tulpini selecționate de bacterii, iar în anumite cazuri de fungi.

Tabelul 6. Principalele produse lactate fermentate și microorganismele care le produc

Produsul fermentat	Microorganismele implicate	Descriere
Lapte acidulat	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lapte sterilizat și apoi inoculat cu tulpinile microbiene corespunzătoare
Kefir	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lb.bulgaricus</i> , <i>Saccharomyces sp.</i>	Produs în urma fermentației mixte, lactice și alcoolice; conține 1% alcool
Kumiss	<i>Lb.bulgaricus</i> , <i>Lb.leichmanii</i> , <i>Torula sp.</i>	Produs din lapte de iapă; conține 2% alcool
Smântână fermentată	<i>Lactococcus sp.</i> , <i>Leuconostoc sp.</i>	Smântâna este inoculată și incubată pentru dezvoltarea acidității corespunzătoare
Iaurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lb.bulgaricus</i>	Produs obținut din lapte degresat sau cu conținut scăzut în grăsimi; conține stabilizatori de tipul gelatinei
Unt	<i>Lactococcus lactis</i>	Smântâna este incubată până când se obține un grad de aciditate corespunzător după care este bătută, iar produsul obținut este spălat și sărat
Brânza proaspătă de tip Mozzarella	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lb.bulgaricus</i>	Nu se utilizează cheagul
Brânza fermentată de tip cașcaval	<i>L.lactis</i> , <i>L.cremoris</i>	Laptele este inoculat cu tulpinile bacteriene și se adaugă cheagul, iar în fazele finale se pot adăuga alte tulpini bacteriene, pentru aromă și aspect (<i>Lb.casei</i> , <i>Lb.plantarum</i> , <i>Propionibacterium sp</i>)
Brânza tip Brie sau Camembert	<i>L.lactis</i> , <i>L.cremoris</i>	În fazele finale ale preparării se adaugă tulpini specifice de fungi (<i>Penicillium sp.</i>) și de bacterii (<i>Brevibacterium linens</i>) pentru aspect și aromă
Brânza tip Roquefort	<i>L.lactis</i> , <i>L.cremoris</i>	În fazele finale ale preparării se adaugă tulpini specifice de fungi (<i>Penicillium roquefortii</i>) pentru aspect și aromă.

Dintre speciile bacteriene folosite sunt de menționat *Lactococcus lactis*, *L.cremoris*, *L.diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, ele fiind implicate mai ales în etapa de acidifiere și de maturare, iar dintre fungii utilizați în industria brânzeturilor cele mai importante specii sunt *Penicillium roquefortii* și *P.camemberti*. În cazul fungilor, adăugarea lor determină un aspect caracteristic (sporii de *P.roquefortii* asigură formarea unor zone de culoare albastră în interiorul produsului) sau o textură specială (*P.camemberti* produce proteaze care determină o consistență cremoasă preparatului și o aromă specifică). În cazul unor sortimente speciale de brânză, așa cum este cea de tip Switzer, găurile și aroma caracteristice sunt produse în urma inoculării cu tulpini bacteriene din speciile *Propionibacterium shermanii* și *P.freundenreichii*.

Iaurtul și alte produse lactate fermentate sunt obținute prin utilizarea unui amestec de bacterii aparținând speciilor *Streptococcus thermophilus* și *Lb.bulgaricus*, prima asigurând aciditatea corespunzătoare iar cea de-a doua conferind gustul și aroma specifică a produsului. Numărul optim de bacterii din produs variază: de exemplu, iaurturile proaspete conțin 10^9 bacterii per gram. De asemenea, în ultimii ani, firmele de prestigiu utilizează pentru obținerea iaurturilor tulpini bacteriene capabile să formeze polizaharide; prezența acestora reduce fenomenul de sinerezis, polizaharidele immobilizând apa, iar consistența iaurtului este în acest caz mult mai cremoasă.

De asemenea, în multe țări ale lumii, este foarte apreciat de consumatori un sortiment de lapte fermentat, obținut prin utilizarea unor tulpini de *Lb.acidophilus* asociate uneori și cu tulpini de *Bifidobacterium sp.* Un asemenea produs poate modifica flora intestinală, îmbunătățind starea de sănătate, el fiind recomandat în diferite diete.

Produsele fermentate din carne, așa cum sunt cârnații, salamurile sau unele preparate din pește sunt obținute prin utilizarea unor tulpini de *Pediococcus cerevisiae* și *Lb.plantarum* sau a unor tulpini alcalifile de *Bacillus sp.* Uneori, în cazul unor specialități tradiționale japoneze pot fi folosite și tulpini de *Penicillium* sau de *Aspergillus (A.glaucus)*.

Obținerea pâinii și a altor produse de panificație se bazează pe utilizarea microorganismelor, în special a drojdiilor aparținând speciei *S.cerevisiae*. Pâinea ca aliment este cunoscută de foarte multă vreme, existând dovezi că ea se producea încă din anul 2100 î.C. În procesul tehnologic de producere a pâinii, creșterea drojdiilor se realizează în condiții de aerobioză ceea ce determină creșterea concentrației de CO_2 și reduce producerea și acumularea de etanol. Fermentația se realizează în mai multe etape: mai întâi amidonul este hidrolizat sub acțiunea α și β -amilazelor, eliberându-se maltoză și sucroză, după care sunt adăugate drojdiile care produc enzime specifice (maltază și invertază) cu ajutorul cărora metabolizează glucidele eliberate. În cursul procesului de fermentație se produce CO_2 și o serie de alți produși implicați în aroma pâinii.

Utilizarea unui amestec de microorganisme a permis obținerea unor sortimente specifice de pâine așa cum este cea obținută din aluat acru (în acest caz se folosesc tulpini de *Saccharomyces exiguus* și de *Lactobacillus sp.*). În afara produselor fermentate menționate, sunt de amintit și altele așa cum sunt: murăturile (proces realizat de bacterii cum ar fi *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb.plantarum*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lb.brevis*), varza murată (în acest caz, fermentația lactică este produsă de intervenția bacteriilor *Leuconostoc mesenteroides*, *Lb.brevis* și

Lb.plantarum), tofu (obținută din lapte de soia prin fermentație cu ajutorul fungilor din speciile *Actinimucor elegans* și *Mucor sp.*) etc.

Băuturile alcoolice fermentate sunt produse, în întreaga lume, pornindu-se de la diverse materii prime vegetale ce conțin cantități însemnate de glucide.

Producerea vinului reprezintă o adevărată știință, oenologia (de la cuvintele grecești oenos = vin și logos = știință), cunoscută de mii de ani. Procesul de producere a vinului presupune parcurgerea mai multor etape, pe parcursul cărora sunt utilizate diverse microorganisme: drojzii din speciile *S.cerevisiae* și *S.ellipsoideus* care fermentează mustul și determină acumularea de alcool și bacterii lactice care fermentează acidul malic rezidual la acid lactic și CO₂. În cazul șampaniei, procesul de fermentație este continuu și se realizează direct în sticlă, pe parcursul mai multor luni.

Deseori însă vinurile se pot deprecia datorită contaminării cu diverse microorganisme. Astfel, contaminarea vinului cu bacterii din genurile *Acetobacter* sau *Gluconobacter* conduce la oxidarea alcoolului etilic la acid acetic și obținerea oțetului din vin.

O altă băutură alcoolică produsă cu ajutorul microorganismelor este berea. Materia primă este de obicei orzul dar, pentru anumite sortimente de bere se mai poate folosi grâul sau orezul. Amidonul conținut în materia primă este degradat cu ajutorul malțului (obținut în cursul procesului de încolțire al orzului) după care se adaugă hameiul, amestecul obținut fiind apoi inoculat cu drojdiile corespunzătoare. Astfel, majoritatea tipurilor de bere se obțin prin inocularea cu tulpini de *S.carlsbergensis* care realizează fermentația la baza vasului de fermentație (procesul se desfășoară la 6-12°C), în timp ce tulpinile de *S.cerevisiae* care produc fermentația la suprafață (timp de 5-7 zile la o temperatură de 14-23°C) sunt utilizate la obținerea berii englezești. Si în acest caz poate apărea contaminarea cu tulpini microbiene nedorite (bacterii lactice și acetice), inclusiv levuri sălbatice” (*S.pasteurianus*, *S.diastaticus*).

Băuturile spirtoase (whiskey, gin, vodca etc) se obțin printr-o tehnologie ce reprezintă o extensie a tehnologiei de obținere a berii. De obicei se folosește o pastă pornind de la materie primă vegetală (orez, orz, porumb sau orz) care este inoculată cu bacterii homolactice din specia *Lb.delbreuckii* ce determină scăderea valorii pH la 3,8 în timp de 6-10 ore, ceea ce limitează dezvoltarea altor microorganisme nedorite. Lichidul de fermentație obținut este apoi supus fierberii, iar compușii volatili sunt condensați pentru a se obține un produs cu un conținut în alcool mai mare decât berea.