CERCETĂRI PRIVIND MONITORIZAREA ACTIVĂ ŞI PASIVĂ A AEROMICROFLOREI ÎN SPAŢII DESTINATE EXPERTIZĂRII ALIMENTELOR PRIN EXAMENE DE LABORATOR

Ioan Eugen POPA [1], Gheorghe PUCHIANU [2], Dorin Valter ENACHE [2], Valentin NECULA [2]

[1]SCGryphon Filter SRL – Braşov, [2] Universitatea „Transilvania“ din Braşov

REZUMAT. Pentru monitorizarea microaeroflorei din spaţiile destinate experizării alimentelor prin examene de laborator am procedat la prelevarea de probe folosind procedeee de monitorizare activă care au devenit un instrument esenţial de monitorizare a mediului, în laboratoarele de încercări. Examenele microbiologice efectuate au fost: detecţia numărului total de bacterii aerobe (NTG) /m³ de aer şi a numărului de drojdii şi mucegaiuri /m³ de aer. Pentru realizarea monitorizării active am prelevat cantităţi definite de aer trecute printr-un dispozitiv de prelevare, direct pe un mediu de cultură solid. Prelevarea s-a realizat în două perioade diferite de timp: una în care nu s-au utilizat echipamente pentru decontaminarea microbiologică a aerului şi alta în care s-au utilizat echipamente generatoare de ozon din clasa GF - 3XO - 500.După prelevarea probelor pe parcursul celor două perioade de timp, am procedat la incubarea plăcilor la temperaturi diferite, în funcţie de organismul ţintă şi apoi am determinat încărcătura microbiologică a aerului prin estimarea numărului de microorganisme exprimat ca ufc/m³. În urma realizării experimentului am constatat că echipamente generatoar de ozon din clasa GF - 3XO - 500., realizează o îmbunătăţire semnificativă a condiţiilor de microclimat, prin dispariţia practic a riscului de contaminare microbiologică a probelor prelevate în vederea expertizării prin examene de laborator cu eventuale microorganisme patogene şi de alterare prezente în aer.

Cuvinte cheie: microaerofloră, monitorizare pasivă şi activă, NTG, drojdii şi mucegaiuri.

ABSTRACT. For monitoring microaeroflora from laboratory spaces we proceeded to taken sampling, using active monitoring procedures which have become an essential tool for environmental monitoring in testing laboratories. Microbiological examinations were performed: total number of germs (NTG / m³ of air and number of yeasts and molds / m³ air. To achieve active monitoring have taken defined amount of air passed through a sampling device directly on a solid culture medium. Sampling was carried out in two periods of time deiferite: one in which no microbiological decontamination of used equipment for air and one in which the ozone generating equipment used in class GF - 3XO - 500. After sampling during the two periods, we proceeded to incubating the plates at different temperatures, depending on the target organism and then we determined the microbiological load of air through estimating the number of microorganisms expressed as cfu / m³. Following the completion of the experiment we found that ozone generating line equipment in Class GF - 3XO - 500, achieved a significant improvement in microclimate conditions, the practical disappearance of the risk of microbiological contamination of samples to expertise by laboratory testing with any microorganisms pathogenic and spoilage present in the air.

Keywords: microaeroflora, passive and active monitoring, Number Total of Germs, Zeasts and Molds.

1. INTRODUCERE

Controlul microbiologic al aerului se adresează spaţiilor de lucru ale unităţilor de procesare, depozitare, comercializare, etc., ale produselor alimentare destinate consumului uman, precum şi spaţiilor din laboratoarele de încercări.

Pentru decontaminarea şi dezinfectarea aerului din spaţiile destinate expertizei alimentelor prin examene microbiologice se poate opta pentru mai multe variante. Cele mai frecvent utilizate în momentul de faţă sunt lămpile cu ultraviolete (UV) de mărimi variabile, fixe şi mobile şi echipamentele (nebulizatoare) care pot dispersa diferite substanţe dezinfectante sub formă de aerosoli.

Aceste metode prezintă unele incoveniente dintre care cele mai importante sunt: lămpile UV sunt de obicei fixe, motiv pentru care decontaminarea aerului este parţială, limitându-se la o suprafaţă reletiv redusă în jurul acesteia, în timpul funcţionării lămpilor cu UV peronalul implicat în activitatea analitică nu poate să îşi desfăşoare activitatea, datorită efectului nociv

al UV asupra sănătăţii omului, timpul maxim de funcţionarea a unei lămpi cu UV este de maxim 9000 ore, dispersarea substanţelor dezinfectante sub formă de aerosoli se poate efectua numai în anumite condiţii care presupun lipsa personalului din spaţiile de lucru şi posibila afectare a mecanismelor de funcţionare a unor echipamente, prin deteriorarea în timp a acestora.

Ca metodă alternativă propunem utilizarea unor exhipamente generatoare de ozon care s-a dovedit a fi unul din cei mai eficienti antioxidanţi şi dezinfectanti, putându-se produce usor chiar şi din aer cu echipamente care nu consumă multă energie electrica. Cu o tehnologie bine pusă la punct spaţiile din interiorul laboratoarelor se pot dezinfecta foarte uşor şi în acelaşi timp eficient.

Există două tipuri de echipamente. Unele care pot fi utilizate în spaţiile de lucru în care este prezent personal şi altul care nu poate fi utilizat în prezenţa perosnalului implicat în activitatea de diagnostic.

Echipamentele din clasa GF 3XO-500 (fig. 1) au un computer care are presetate mai multe programe de lucru: echipamentul produce o cantitate de ozon apoi face o pauza ca ozonul sa se transforme în oxigen, apoi porneşte din nou să producă ozon ş.a.m.d.

Fig. 1. Echipamentele din clasa GF 3XO-500.

Echipamentele din clasa GF3XO1000 pana la GF3XO8000 (fig. 2), produc cantităţi mari de ozon şi nu pot sa functioneze in prezenţa oamenilor. Ele sunt indicate pentru a fi utilizate numai în spaţiil cu dimensiuni mari.

Fig. 2. Echipamentele din clasa GF3XO1000.

Pentru o mai mare eficienţă se recomandă îmbinarea celor doua tipuri de echipamente, folosind o tehnologie şi un program de lucru stabilit de experti in utilizarea ozonului.

În ţări mai avansate cum este USA, există norme precise pentru utilizarea ozonului. OSHA (Occupational Safety and Health Administration) recomandă ca limita legală permisă pentru muncă continuă de 8 ore să fie de 0,1 ppm, NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health), recomandă ca expunerea maximă la ozon sa nu depăşească 0,1 ppm, iar EPA (Environmental Protection Agency) şi National Ambient Air Quality, recomandă o expunere de maximum 8 ore la 0,08ppm. Studiile au demonstrat că o expunere la o concentraţie mai mare de 5ppm este periculoasă.

Există două mijloace principale de monitorizare a microaeroflorei: monitorizarea pasivă şi monitorizarea activă. Ambele sunt la fel de importante, devenind în momentul de faţă un instrument esenţial de monitorizare a mediului.

În funcţie de modul de recoltare a probelor se pot utiliza două metode – a sedimentării şi a aspiraţiei.

Metoda sedimentării este adecvată pentru a detecta particulele microbiene care se depun pasiv, datorită forţei gravitaţionale. Pentru monitorizarea pasivă se pot utiliza două metode: metoda sedimentării Koch, conform standardului polonez PN 89/Z-04008/08 şi metoda sedimentării conform „Metodelor microbiologice pentru examenul de laborator al produselor alimentare de origine animală”, Bărzoi şi colab., 1977.

Dezavantajele sedimentării sunt: metoda este nonvolumetrică (nu oferă informaţii asupra volumului de aer din care se colectează particulele), nepermiţând o determinare cantitativă exactă, aplicabilitatea plăcuţelor este limitată, poate monitoriza doar particule biologice viabile care sedimentează din aer şi se depun pe o suprafaţă într-un anumit timp de expunere, nu poate detecta particulele mici suspendate în aer, sunt influenţate de interferenţa şi contaminarea altor surse, agarul din plăcuţe se poate deteriora în cazul unei expuneri prea îndelungate, plăcuţele pot deveni foarte încărcate în medii puternic contaminate şi interpretarea datelor devine dificilă

Avantajele sedimentării sunt: plăcuţele sunt ieftine şi uşor de folosit, nu necesită echipamente speciale, se folosesc mai mult pentru analiza calitativă a microaeroflorei, datele furnizate pot detecta tendinţele şi pot oferi o avertizare timpurie a problemelor. Într-un mediu cu risc scăzut (ex. spaţii de producţie alimente), plăcuţele pot oferi un mijloc adecvat de monitorizare microbiologică a calităţii aerului.

Metoda aspiraţiei se poate realiza prin: impact, conform ISO 16000-18 - adecvată pentru cazurile în care sunt de aşteptat doar concentraţii microbiene scăzute, de ex. spaţii curate, instalaţii de producţie

alimente, etc; filtrare, conform ISO 16000-16 - adecvată pentru medii extrem de contaminate, în care tehnica de impactare poate determina supra-ăncărcarea plăcuţei. Metoda permite folosirea diluţiilor zecimale pentru determinarea unui număr real de microorganisme.

Este o metodă activă, volumetrică (oferă informaţii asupra volumului de aer din care se colectează particulele) şi deci permite determinarea cantitativă exactă, necesitând utilizarea unui echipament care absoarbe un volum cunoscut de aer.

Există două tipuri de dispozitive de prelevare disponibile comercial: cu fantă şi cu sită. În dispozitivele cu fantă, aerul este tras printr-o fantă îngustă şi particulele sunt depuse pe o plăcuţă cu agar aflată în rotaţie. În dispozitivele cu sită, aerul este tras printr-o placă perforată (sită) cu găuri, cu diametru cunoscut şi particulele sunt depuse pe o plăcuţă cu agar fixată dedesubt. Există posibilitatea grupării mai multor site cu dimensiuni diferite.

Pentru metoda prin filtrare, membranele filtrante obţinute după recoltare sunt resuspendate în 5 ml ser fiziologic cu 0,01% polisorbat 80 (Tween), aceasta reprezentând suspensia iniţială, din care se prepară diluţii zecimale. 0,1 ml din aceste diluţii se dispersează pe suprafaţa plăcuţelor cu agar.

Indiferent de procedeul de recoltare (prin impact sau prin filtrare), numărul de germeni se calculează raportând numărul de colonii dezvoltate pe suprafaţa mediului de cultură la volumul de aer. Modul de calcul pentru cele două metode este prevăzut în standardul ISO 16000-17.

2. MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru a studia care este efectul bactericid al ozonului în spaţiile destinate expertizei alimentelor prin examene microbiologice, am procedat la prelevarea de probe de aer pe parcursul a două perioade distincte a câte 5 zile fiecare – în care nu am utilizat echipamentul generator de ozon şi în care am utilizat echipamentul din clasa GF 3XO-500. Perioada de funcţionare a echipametului generator de ozon a fost permanentă pe paecursul celor 7 ore de lucru cu menţiunea că echipamentele din clasa GF 3XO-500, produce o cantitate de ozon apoi face o pauza ca ozonul sa se transforme în oxigen, după care automat porneşte din nou pentru a produce ozon, poperaţiunea derulându.se în mod automat.

Metodologia de diagnostic s-a efectuat în conformitate cu prevederile SR EN ISO 4833-1/2009 - metodă orizontală pentru enumerarea microorganismelor, partea 1, tehnica de numărare a coloniilor la 30° C şi SR ISO 21527-2:2009, metodă orizontală pentru numărarea drojdiilor şi mucegaiurilor, partea 2, tehnica de numărare a coloniilor în produse cu activitatea apei mai mică sau egală cu 0,95.

Echipamentele de diagnostic utilizate pentru realizarea diagnosticului au fost: etuvă, incubator (25 ± 1° C), incubator (30 ± 1° C sau 37 ± 1° C), baie de apă (45 ± 1° C), cabinet de protecţie cu flux laminar, echipament de numărare a coloniilor, *p*H- metru cu acurateţea de 0,1 unităţi de *p*H la 25° C, microscop, arzător cu gaz, plăci Petri cu diametrul de 90 – 100 mm, de unică folosinţă, aparat pentru prelevarea probelor de aer;

Pentru efectuarea monitorizării active am utilizat plăci Petri standard, conţinând medii de cultură (PCA şi DG18), câte 2 plăci cu mediu pentru numărul total de germeni şi câte 2 plăci cu mediu pentru drojdii şi mucegaiuri. Echipamentele utilizate, au permis prelevarea unei cantităţi definte de aer, particulele din aer fiind colectate direct pe mediul de cultură solid. Echipamentele sunt prevăzute cu dispozitive cu sită, care permit ca aerul să fie tras printr-o placă perforată (sită) cu găuri, iar particulele sunt depuse pe mediul de cultură turnat în placa Petri fixată dedesubt (fig. 3).

După recoltare plăcile au fost identificate în funcţie de locul prelevării, după care au fost introduse în termostate la temperaturi diferite, în funcţie de organismul ţintă (NTG sau DM), în vederea determinării încărcăturii microbiologice a aerului prin estimarea numărului de microorganisme exprimat ca UFC/m^3.

Fig. 3. Dispozitiv pentru prelevarea prin aspiraţie a probelor de aer.

3. REZULTATE ŞI DISCUŢII

Probele au fost prelevate pe parcursul a 2 perioade de câte 5 zile fiecare, din cele 6 încăperi, numărul total de probe fiind de 60, fiecare probă fiind constituită din 4 plăci (2 pentru NTG şi 2 pentru D+M) (tabelul 1 şi graficul 1). Pentru prelevarea probelor de aer am utilizat plăci Petri standard, conţinând medii de cultură - PCA pentru NTG şi DG18 pentru D+M. Mediile de cultură au fost preparate conform instrucţiunilor şi apoi au fost turnate în plăci Petri cu diametrul de 9 cm.

Pentru efectuarea monitorizării active am prelevat o cantitate definită de aer şi anume 100 litrii (0,1 m^3).

După recoltare plăcile au fost identificate, ambalate şi introduse la termostat la temperatura de 37°C în cazul NTG şi 25°C în cazul D+M. Perioada de incubat a fost de 72 de ore în cazul NTG şi 4-5 zile în cazul D+M, după incubare mediile de cultură au fost examinate în vederea identificării eventualelor colonii dezvoltate.

În cazul probelor prelevate în perioada în care nu s-a utilizat echipamentul din clasa GF 3XO-500, numărul probelor cu contaminare microbiologică a fost ridicat, chiar dacă rezultatele se încadrează în general în limitele nivelului ţintă stabilit de LSVSA Braşov. Doar un număr de 6 probe, reprezentând un procent de 5% s-au încadrat în nivelurile de alertă stabilite, 4 în cazul D şi M şi 2 în cazul NTG. (tabelul 2.)

Nivelurile de tintă stabilite conform Procedurii Generale elaborată de LSVSA Braşov în conformitate cu prevederile SR EN ISO 17025/2005, sunt de 100 ufc/m³, nivelurile de alertă de 200 ufc/m³, iar nivelurile de acţiune de 300 ufc/m³ în cazul ambilor parametrii. Exemplificăm mai jos situaţiile în care s-au obţinut valori care se încadrează în nivelurile ţintă şi alertă (fig. 4, 5. 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Tabelul 1. **Numărul de probe prelevate prin metoda sedimentării**

Nr. crt.	Denumirea spaţiului	Total	Din care:			
			Fără utilizare echipament generator de ozon		Cu utilizare echipament generator de ozon	
			NTG	D + M	NTG	D + M
1.	Receptie probe	10	5 x 2	5 x 2	5 x 2	5 x 2
2.	Examen organoleptic	10	5 x 2	5 x 2	5 x 2	5 x 2
3.	Boxă însămânţare	10	5 x 2	5 x 2	5 x 2	5 x 2
4.	Transplantare	10	5 x 2	5 x 2	5 x 2	5 x 2
5.	Termostatare	10	5 x 2	5 x 2	5 x 2	5 x 2
6.	Citire şi interpretare rezultate	10	5 x 2	5 x 2	5 x 2	5 x 2
	Total	60	60	60	60	60

Tabelul 2. **Rezultatele obţinute în urma examinării probelor prelevate în perioada în care nu s-a utilizat echipamentul din clasa GF 3XO-500**

Nr. crt.	Denumirea spaţiului	Total probe prelevate	Nr. unităţi prelevate	Rezultate obţinute			
				Conforme		Neconforme	
				Nr.	%	Nr.	%
1.	Receptie probe	5	20	16	80	4	20
2.	Examen organoleptic	5	20	18	90	2	10
3.	Boxă însămânţare	5	20	20	100	-	-
4.	Transplantare	5	20	20	100	-	-
5.	Termostatare	5	20	20	100	-	-
6.	Citire şi interpretare rezultate	5	20	20	100	-	-
	Total	30	120	114	95	6	5

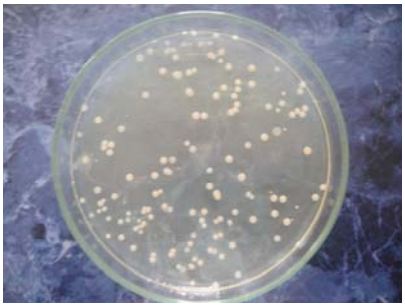

Fig. 4. Plăci Petri cu mediu PCA - NTG (Nivel de alertă).

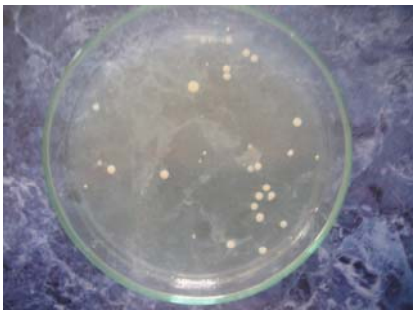

Fig. 5. Plăci Petri cu mediu PCA - NTG (Nivel de alertă).

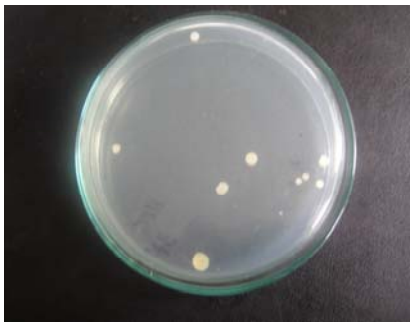

Fig. 6. Plăci Petri cu mediu PCA - NTG (Nivel de ţintă).

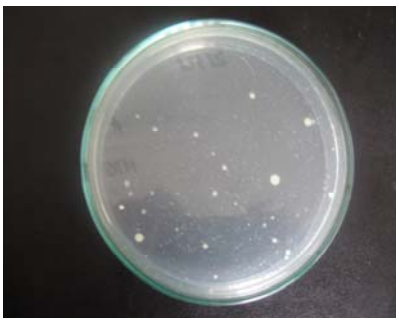

Fig. 7. Plăci Petri cu mediu PCA - NTG (Nivel de ţintă).

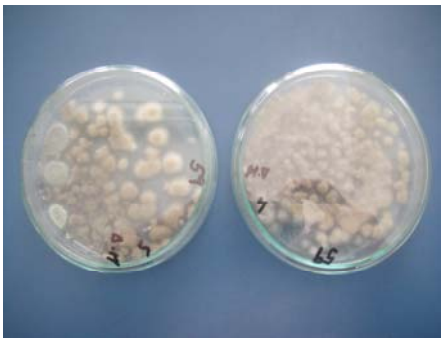

Fig. 8. Plăci Petri cu mediu DG 18 - D+M (Nivel de alertă).

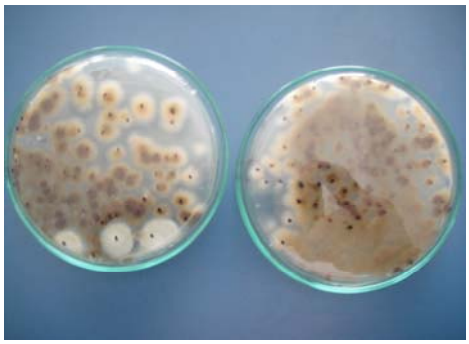

Fig. 9. Plăci Petri cu mediu DG 18 - D+M (Nivel alertă).

Fig. 10. Plăci Petri cu mediu DG 18 - D+M (Nivel de ţintă).

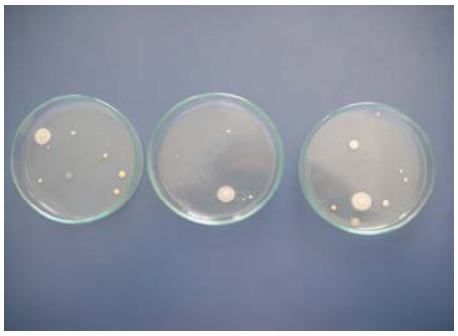

Fig. 11. Plăci Petri cu mediu DG 18 - D+M (Nivel alertă).

În cazul probelor prelevate în perioada în care s-a utilizat echipamentul din clasa GF 3XO-500, nu s-au înregistrat situaţii de contaminare microbiologică, numai 3 probe prezntând valori cuprinse între 1-2 ufc/m³, valoare nesemnificativă pentru contaminarea microbiologică a aerului, valori care se încadrează mult sub nivelul ţintă stabilit de LSVSA Braşov (tabelul 3 şi fig. 12 şi 13).

Tabelul 3. **Rezultatele obţinute în urma examinării probelor prelevate în perioada în care nu s-a utilizat echipamentul din clasa GF 3XO-500**

Nr. Crt.	Denumirea spaţiului	Total probe prelevate	Nr. unităţi prelevate	Rezultate obţinute			
				Conforme		Neconforme	
				Nr.	%	Nr.	%
1.	Receptie probe	5	20	20	100	-	-
2.	Examen organoleptic	5	20	20	100	-	-
3.	Boxă însămânţare	5	20	20	100	-	-
4.	Transplantare	5	20	20	100	-	-
5.	Termostatare	5	20	20	100	-	-
6.	Citire şi interpretare rezultate	5	20	20	100	-	-
	Total	30	120	120	100	-	-

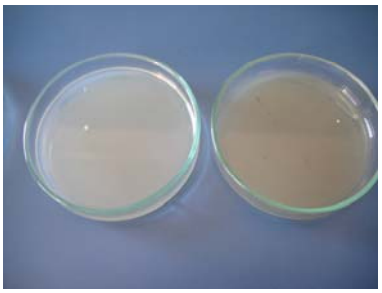

Fig. 12. Plăci Petri cu mediu PCA - NTG.

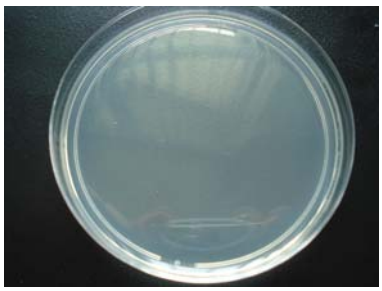

Fig. 13. Plăci Petri cu mediu DG 18 - D+M.

Concentraţia, exprimată ca UFC/m^3 de aer, se calculează prin formula:

$$C_I = n_{ufc} / V_I$$

unde: n_{ufc} este numărul total de colonii de pe plăcuţele Petri; V_I = volumul total al probei, în metri cubi.

Menţionăm că valorile maxime admise prevăzute în procedura ANSVSA referitoare la prelevarea de probe probele de aeromicroflorâ sunt neconforme când acestea prezintă valori peste 600 ufc/m^3 în cazul NTG şi peste 300 ufc/m^3 în cazul D+M.

4. CONCLUZII

1. În cazul probelor prelevate în perioada în care nu s-a utilizat echipamentul din clasa GF 3XO-500, numărul probelor cu contaminare microbiologică a fost ridicat, chiar dacă rezultatele se încadrează în general în limitele nivelului ţintă stabilit de LSVSA Braşov. Doar un număr de 6 probe, reprezentând un procent de 5% s-au încadrat în nivelurile de alertă stabilite, 4 în cazul D + M şi 2 în cazul NTG.

2. În cazul probelor prelevate în perioada în care s-a utilizat echipamentul din clasa GF 3XO-500, nu s-au înregistrat situaţii de contaminare microbiologică, numai 3 probe prezntând valori cuprinse între 1-2 ufc/m^3, valoare nesemnificativă pentru contaminarea microbiologică a aerului, care se încadrează mult sub nivelul ţintă stabilit de LSVSA Braşov (100 ufc/m^3).

3. Utilizarea echipamentelor cu ozon GF 3XO-500, în condiţii de proiectare şi aplicare judicioasă, ofera rezultate excelente. Acestea pot fi aplicate cu costuri de investiţie rezonabile şi de producţie foarte mici pentru decontaminarea microbiologică a aerului. În plus creeaă în spaţiile de lucru şi nişte condiţii ambientale plăcute prin „neutralizarea" mirosurilor specifice activităţii de diagnostic.

BIBLIOGRAFIE

[1] Bacterial Nomenclature up – to – date (Approved lists, validation lists), April 2012. Compiled by Leibniz Institute DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroornismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany.

[2] Bârzoi D., Apostu S., 2002. *Microbiologia produselor alimentare.* Editura Risoprint, Cluj Napoca.

[3] Ivana Simona 2007. *Microbiologie Medicală Veterinară,* Vol I. Editura Ştiinţelor Medicale.

[4] Ivana Simona, 2007. *Microbiologie Medicală Veterinară,* Vol II. Editura Asclepius.

[5] Puchianu G. 2012. *Criterii microbiologice şi de siguranţă alimentară*. Editura Universităţii Transilvania din Braşov.

[6] Ştirbu C., Turcu D., 1999. *Noţiuni de bacteriologie.* Editura Brumar Timişoara.

[7] Ordinul ANSVSA nr. 35/2016. Norme metodologice de aplicare a Programului acţiunilor de supraveghere, prevenire, control şi eradicare a bolilor la animale, a celor transmisibile de la animale la om, protecţia animalelor şi protecţia mediului, de identificare şi înregistrare a bovinelor, suinelor, ovinelor şi caprinelor pentru anul 2012

[8] Piha, Dumitrache Rodica, 2015. *Controlul microbiologic al aerului de interior. Instruire microbiologie alimentară,* Deva 30.09-2.10.2015

[9] Puchianu G., Necula V., Enache D.V., 2016. *Cercetări privind monitorizarea activă şi pasivă a aeromicroflorei în unităţi de procesare.* Sesiunea ştiinţifică de primăvară 2016 a Academiei Oamenilor de Ştiinţă din România, 27-28 mai, Bucureşti – Mioveni.

[10] ISO 16000-17. „Aerul de interior. Partea 17: Detecţia şi numărarea mucegaiurilor - Metoda bazată pe cultivare." Pct. 7.6.2 - metoda prin impact

[11] Procedură ANSVSA. Prelevarea probelor de produse alimentare în vederea testării microbiologice.

[12] SR EN ISO 4833-1/2009. Microbiologia lanţului alimentar. Metodă orizontală pentru enumerarea microorganismelor. Partea 1. Tehnica de numărare a coloniilor la 30° C, prin tehnica turnării în plăci;

[13] SR ISO 21527-2:2009. Microbiologia alimentelor şi furajelor: Metodă orizontală pentru numărarea drojdiilor şi mucegaiurilor. Partea 2: Tehnica de numărare a coloniilor în produse cu activitatea apei mai mică sau egală cu 0,95.