

## SINTEZA

### RAPORTULUI DE CERCETARE LA PROIECTUL TIP IDEI: IMPLICAȚIILE BIOFILMULUI MICROBIAN ÎN IGIENA ȘI SIGURANȚA ALIMENTELOR - cod CNC SIS 902 -

ANUL 2011

#### Colectivul de cercetare:

Conf. Dr. Sala Claudia – director de proiect  
Prof. Dr. Decun Mihai  
Conf. Dr. Nichita Ileana  
Șef de lucr.univ. Dr. Morar Adriana  
Drd. dr.med.vet. Morvay Attila Alexandru

Primul obiectiv al contractului de cercetare pentru anul 2011 a constat în STUDIUL STRUCTURII BIOFILMULUI ÎN CONDIȚII DE LABORATOR. În cadrul acestui obiectiv au fost desfășurate două activități și anume: *studiul etapelor de constituire a biofilmului bacterian pe suprafețe cu grad diferit de rugozitate și studiul structurii biofilmului microbial la diferite specii și asociații bacteriene prin microscopie confocală laser*. Proprietățile funcționale ale biofilmului fiind în strânsă legătură cu arhitectura spațială a acestuia, cunoașterea structurii biofilmelor reprezintă primul element în înțelegerea strategiilor de comportament și de supraviețuire a microorganismelor în interiorul acestor structuri, care ne va permite în final să alegem cele mai eficiente măsuri de control.

În cadrul acestui obiectiv am evidențiat structura biofilmului produs de diferite specii sau asociații de microorganisme (patru tulpini de referință: *P. aeruginosa* 27853, *E. coli* 25922, *L. monocytogenes* 19114 și *S. aureus* 25923 și nouă tulpini bacteriene izolate din unitățile de procesare a cărnii și patru asociații bacteriene), pe suprafețe cu grad de rugozitate diferit (inox 304 satinat și nesatinat, inox 316 satinat și nesatinat, sticlă, PVC și cupru) în condiții de cultivare diferite (adăugarea în mediu a extractului de carne și a laptelui reconstituit), prin utilizarea unor metode actuale folosite în studiul structurii biofilmului microbial (microscopia în fluorescență, microscopia confocală) și aplicarea unor programe specifice de calcul pentru cuantificarea și caracterizarea structurii biofilmului microbial. S-a utilizat microscopul model *Leica DM 2500* cu scanare laser, iar imaginile 3D obținute prin microscopia confocală cu scanare laser au fost analizate cu programul special conceput COMSTAT 2 (DTU-Danemarca). Capacitatea acestor specii de a forma biofilm a fost testată și cu ajutorul plăcilor de microtitrare colorate cu cristal violet.

Rezultatele obținute au permis studiul etapelor de formare a biofilmului microbial la tulpinile ATCC, la tulpinile și asociațiile microbiene izolate din biofilmul recoltat din unitățile de procesare a alimentelor, la stabilirea influenței pe care o au natura, tipul și rugozitatea suprafeței, prezența nutrienților în mediu asupra atașării inițiale și evoluția ulterioară a structurii biofilmului. Rezultatele referitoare la evidențierea prin microscopie confocală și caracterizarea structurii biofilmului format reprezintă un element de noutate care au evidențiat o mare variabilitate în arhitectura tridimensională a biofilmelor speciilor microbiene analizate, ceea ce poate avea un rol esențial în colonizarea substratului, toleranța la substanțele cu rol antimicrobial și mai ales la persistența acestor microorganisme în mediu (în anexă se prezintă spre exemplificare etapele formării și caracterizarea structurii biofilmului microbial pentru *E.coli* ATCC 25922, anexa în extenso cuprinzând totalitatea imaginilor este atașată raportului de cercetare ).

Concluziile formulate pe baza rezultatelor obținute au fost următoarele:

- Biofilmul format de tulpinile ATCC utilizate în experiment prezintă caracteristici diferite: *P. aeruginosa* formează biofilm cu aspect de rețea stratificată, uniform ca grosime, care tinde să acopere întreaga

suprafață; *E. coli* formează biofilm gros, cu aspect de rețea rugoasă multistratificată; *L. monocytogenes* formează două tipuri de biofilm: unul cu aspect de împletitură în strat uniform, iar celălalt, ca aglomerări de celule, cu aspect de rețea; *S. aureus* produce biofilm cu aspect de rețea multistratificată neuniformă, cu zone de aglomerări celulare care alternează cu zone de creștere confluentă.

- Cea mai propice suprafață pentru formarea biofilmului este *inoxul tip 304 nesatinat*, urmat fiind de *inox 304 satinat*, *inox 316 nesatinat*, *inox 316 satinat*, *PVC*, *sticlă* și *cupru*.
- Viteza de formare și aspectul biofilmului sunt influențate de rugozitatea suprafeței (suprafața de *inox 304 nesatinat*), de prezența nutrienților din mediu (adaosul de lapte reconstituit), dar și de tulpina testată (*P. aeruginosa* ATCC formează cel mai repede biofilm, cu cea mai mare suprafață de acoperire la 72 de ore).
- Componentele celulare de suprafață (flageli sau fimbrii) și prezența unor compuși în mediul de cultură (ex. acidul lactic) influențează favorabil procesul de atașare inițială a microorganismelor la substrat.
- Cantitatea de biofilm formată este dependentă de tipul de microorganism și de tipul de creștere: biofilm în monocultură sau mixt.
- Există o mare variabilitate în ceea ce privește capacitatea tulpinilor izolate din unitățile de procesare de a forma biofilm. Majoritatea acestor tulpini, crescute în biofilme mixte, dezvoltă biofilm subțire, cu un procent variabil de acoperire al suprafeței. Tipul de biofilm format diferă în funcție de tulpină, de rugozitatea suprafeței și de prezența nutrienților.
- Utilizarea microscopului confocal și a programelor de analiză a imaginilor obținute oferă numeroase posibilități de analiză amănunțită, cantitativă și calitativă a biofilmului, în special a arhitecturii acestuia.

**Al doilea obiectiv al proiectului de cercetare a constat în STUDIUL SENSIBILITĂȚII LA UNELE SUBSTANȚE BIOCIDE A BACTERIILOR ÎN FORMĂ LIBERĂ SAU INTEGRATE ÎN MATRICEA BIOFILMULUI.** Activitățile desfășurate în cadrul acestui obiectiv au fost: *studiul sensibilității tulpinilor bacteriene la produse dezinfectante și studiul sensibilității la antibiotice prin tehnica Calgary Biofilm Device, comparativ cu alte metode.* În interiorul biofilmului accesul limitat de nutrienți poate duce la reducerea ratei de creștere, ceea ce poate afecta susceptibilitatea la substanțe antimicrobiene. Astfel, fenotipul bacteriilor sesile diferă considerabil de fenotipul bacteriilor planctonice.

Pentru studiul sensibilității la produsele dezinfectante s-au utilizat patru dezinfectante utilizate frecvent în industria alimentară: *hipoclorit de sodiu*, *peroxid de hidrogen*, *P3-Topax 66* și *P3-Oxysan*. Efectul dezinfectant a fost stabilit față de șase tulpini bacteriene din familia *Enterobacteriaceae* și trei din genul *Pseudomonas*, izolate din biofilmul bacterian de pe suprafața cărnii (carne de porc, carne de vită și de pasăre), precum și față de trei asociații bacteriene. Experimentele au fost efectuate atât pe celulele planctonice, cât și pe celule bacteriene integrate în matricea biofilmului. În paralel, pentru evaluarea efectului dezinfectant au fost utilizate și tulpini bacteriene standard: trei Gram pozitive (*B. cereus* 10876, *L. monocytogenes* 19114 și *S. aureus* 25923) și două Gram negative (*E. coli* 25922 și *P. aeruginosa* 27853).

Creșterea și eradicarea biofilmului microbial (*MEBC* - *minimum eradication biofilm concentration*, CMEB - concentrația minimă de eradicare a biofilmului) a fost efectuată prin utilizarea dispozitivului *Calgary Biofilm Device* (CBD), iar testarea efectului dezinfectant pe celule planctonice s-a făcut cu ajutorul plăcilor de microtitrare.

Rezultatele obținute au permis evidențierea faptului că unele produse sau substanțe dezinfectante inhibă dezvoltarea microorganismelor la concentrații și timpi diferiți, dependent de modul de creștere (celule planctonice sau integrate în biofilm). Efectul biocid al *hipocloritului de sodiu* a fost exprimat la cea mai mică concentrație testată, 75 ppm pentru celulele planctonice și 150 ppm în cazul biofilmului bacterian. Efectul biocid al *peroxidului de hidrogen* s-a manifestat la concentrații de 1500 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pentru tulpinile și asociațiile bacteriene izolate de pe suprafața cărnii. Tulpinile de referință s-au dovedit sensibile la cea mai redusă concentrație testată (450 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Bacteriile din biofilmul constituit dintr-o singură cultură, cu o excepție (*Escherichia coli*), dar și cele din biofilmul mixt, au fost de 10 ori mai rezistente la acțiunea peroxidului de hidrogen (CMEB a fost de 5% peroxid de hidrogen sau 15000 ppm). Produsul *P3 Topax-66* (pe bază de hipoclorit de sodiu) a inhibat dezvoltarea celulelor planctonice (0,025% produs) și a biofilmului bacterian (0,05 - 0,3% produs), la toate tulpinilor bacteriene și la asocierile între acestea, în interval de 15 minute. S-au evidențiat variații importante în ceea ce privește sensibilitatea la produsele dezinfectante a bacteriilor testate. Această variabilitate nu a fost observată și în cazul tulpinilor de referință. Biofilmele formate de tulpinile de referință au fost eradicate la concentrația cea mai redusă de *P3-oxysan* (pe bază de peroxid de hidrogen) utilizată (0,01%), în interval de 15 minute. Asocierile dintre microorganisme au influențat evident sensibilitatea bacteriilor la substanțele dezinfectante.

Studiul sensibilității la antibiotice s-a realizat pe nouă tulpini de enterobacterii și din genul *Pseudomonas* izolate din biofilmele formate pe carnea de porc, carcase de vită și de pasăre și de pe suprafețe inerte din unitățile de procesare, pe care s-a identificat biofilm microbial. Capacitatea acestor specii de a forma biofilm a fost testată cu ajutorul plăcilor de microtitrare colorate cu cristal violet. Studiul a fost efectuat atât pe biofilme monospecii, cât și mixte, pe bacterii libere sau integrate în biofilm. Asocierile au fost făcute între microorganismele izolate din același biofilm. Pentru testarea concentrației minime de eradicare a biofilmului prin tehnica *Calgary Biofilm Device* (CBD) au fost utilizate următoarele antibiotice: *Colistin* (Polimixină E), *Enrofloxacină*, *Neomicină*, *Oxitetraciclină* (Crida Pharm). Concentrația minimă inhibitorie pentru bacteriile planctonice a fost stabilită prin două metode: în plăci de microtitrare și cu ajutorul aparatului *Vitek-2* (BioMerieux), utilizând carduri diferite cu antibiotice, în funcție de tulpinile cercetate. Pentru testarea sensibilității la antibiotice cu ajutorul aparatului *Vitek-2* din biofilmul dezvoltat pe suprafața cărnii au fost selectate 16 tulpini. Din acestea, 12 tulpini făceau parte din familia *Enterobacteriaceae*, iar patru, din genul *Pseudomonas*.

S-a observat o variație considerabilă a rezultatelor în ceea ce privește rezistența la antibiotice pentru diferite tulpini și pentru asociațiile bacteriene, atunci când au fost crescute ca celule planctonice. Unele dintre antibiotice au fost mai eficiente și au determinat inhibarea creșterii bacteriilor planctonice la concentrații scăzute. S-au observat, de asemenea, variații ale rezistenței la antibiotice între cele trei tulpini de *E. coli* izolate de pe suprafața cărnii crescute ca celule planctonice.

Integrate în matricea biofilmului microorganismele sunt de câteva ori mai rezistente la acțiunea substanțelor antimicrobiene, deoarece elaborează polizaharide sau prezintă caracteristici de creștere diferite. Asocierile microbiene *S. liquefaciens* – *E. coli*, *E. coli* – *P. aeruginosa*, *E. cloacae* – *S. marcescens* au dus la creșterea cantității de biofilm, ceea ce a avut drept rezultat rezistența crescută la acțiunea antibioticelor. Matricea biofilmului a reprezentat o barieră de difuziune pentru antibiotice, prin influențarea ratei de transport a moleculelor în interiorul biofilmului.

Majoritatea tulpinilor testate au prezentat o rezistență crescută la *Colistin*, atât în formă planctonică, dar și integrate în biofilm. Prin asocierea între o tulpină rezistentă și una sensibilă s-a constatat manifestarea unui efect sinergic între cele două specii, care avut ca rezultat creșterea rezistenței la *Colistin*. Nici unul din antibioticele testate nu a fost eficient față de *P. aeruginosa* integrată în biofilm sau pentru asocierile în care a fost prezentă această specie.

Rezultatele referitoare la stabilirea sensibilității la antibiotice a bacteriilor planctonice cu ajutorul aparatului *Vitek -2* a tulpinilor izolate de pe suprafața cărnii au evidențiat următoarele: dintre *Enterobacteriaceae* trei tulpini au prezentat rezistență la trei grupe de antibiotice (25%) și 83,33% au fost rezistente la cel puțin două clase de antibiotice (10 tulpini). Opt din cele 12 tulpini testate (66.67%) au fost rezistente la cel puțin două antibiotice din clasa  $\beta$  lactaminelor. La cefalosporine și cefamicine (clasa cefeme) au prezentat rezistență 50% din tulpinile cercetate (6 tulpini). La fluorochinolone (norfloxacină) au fost rezistente doar două tulpini (16.67%) de *E. coli* (de pe carnea de porc și de pui). La tetraciclină au prezentat rezistență 50% din bacteriile testate (6 tulpini). La nitrofurantoin au fost rezistente toate tulpinile de *Serratia*, dar și *Enterobacter cloacae* de pe suprafața cărnii de porc. Referitor la stabilirea sensibilității la antibiotice a tulpinilor izolate de pe suprafețe inerte (cu aparatul *Vitek-2*) s-a constatat că 85% (12 tulpini) din enterobacterii au fost rezistente la cel puțin două familii de antibiotice, iar 26,31% (două de *E. coli* și trei de *Serratia*) au fost rezistente la trei clase. 78,57% (11 tulpini) din enterobacteriile de pe suprafețele inerte și 50% (6 tulpini) de pe suprafața cărnii au fost rezistente la ampicilină și la amoxicilină/acid clavulanic. Multirezistență la antibiotice a dovedit tulpina de *St. epidermidis*, care a fost rezistentă la 11 antibiotice aparținând la cinci clase (betalactami, oxazolidinone, macrolide, lincosamide, streptogramine).

Concluziile desprinse din cercetările efectuate sunt:

- Clorul și produsele pe bază de clor prezintă cel mai puternic efect bactericid, atât asupra celulelor planctonice și asupra celulelor integrate în matricea biofilmului.
- Tulpinile de *Serratia* și asociațiile între *Serratia* și alte specii *Enterobacteriaceae* (*E. cloacae*, *E. coli*) au fost cele mai rezistente, ca celulele planctonice, la acțiunea peroxidului de hidrogen.
- Bacteriile integrate în matricea biofilm sunt de până la 10 ori mai rezistente la acțiunea peroxidului de hidrogen, comparativ cu celulele planctonice.
- Cele mai multe tulpini din familia *Enterobacteriaceae*, din genul *Pseudomonas* și asocierile între acestea elaborează în biofilm enzime care descompun peroxidul de hidrogen, neutralizându-i efectul biocid.
- Bacteriile în formă planctonică prezintă rezistență crescută la *Neomicină* și *Colistin* și mai scăzută la celelalte antibiotice, cu unele excepții: *E. cloacae* și cele două tulpini de *E. coli* de pe suprafața cărnii de porc.

- Asocierile dintre microorganisme favorizează creșterea rezistenței bacteriilor la acțiunea antibioticelor. În asociere cu *P. aeruginosa* rezistența la antibiotice a tulpinilor de *E. coli* este crescută, atât pentru bacteriile planctonice, cât și pentru cele incluse în biofilm.
- Incluse în matricea biofilmului rezistența la antibiotice a bacteriilor este crescută, fiind necesare concentrații de până la 50 de ori mai mari.
- Pentru biofilmul format de *P. aeruginosa* nici unul dintre antibioticele testate nu a fost eficient.
- 75% din tulpinile bacteriene izolate de pe suprafețele din unitățile de procesare (carne și suprafețe inerte) au prezentat rezistență la cel puțin două clase de antibiotice, iar 25%, la trei clase de antibiotice.
- Majoritatea enterobacteriilor izolate de pe suprafața cărnii sau de pe suprafețe inerte au fost rezistente la ampicilină și la amoxicilină/ acid clavulanic.

**Al treilea obiectiv al proiectului de cercetare a constatat în EVIDENȚIEREA PREZENȚEI BIOFILMULUI MICROBIAN PRIN MICROSCOPIA CONFOCALĂ LASER PE SUPRAFEȚE DIN UNITĂȚI DE INDUSTRIE ALIMENTARĂ.** Activitățile desfășurate în cadrul acestui obiectiv au fost: *Evidențierea prezenței biofilmului microbial. Încercări de efectuare a unor corelații între tipurile, structura biofilmului și numărul de microorganisme.* Suprafața alimentelor poate fi colonizată cu microorganisme sub formă de biofilm, care poate reprezenta un potențial pericol pentru consumatorul uman. Sunt relativ puține cercetări care au evidențiat prezența microorganismelor pe suprafața produselor alimentare și pe suprafața carcaselor de carne.

Pentru identificarea biofilmului microbial s-au recoltat probe prin raclare, din vecinătatea zonelor din care au fost prelevate și probele de sanitație. În laborator, probele au fost supuse fixării și colorării cu *acridine orange* (AO). S-a utilizat microscopul model *Leica DM 2500* cu scanare laser, iar imaginile 3D obținute prin microscopia confocală cu scanare laser au fost analizate cu programul special conceput COMSTAT 2 (DTU - Danemarca).

Un exemplar din fiecare probă a fost colorat cu *acridin orange* și al doilea, prin metoda Gram. Microorganismele izolate au fost apoi cultivate pe medii speciale de izolare pentru *Enterobacteriaceae* și pentru *Pseudomonas*. După izolare, identificarea germeilor izolați s-a efectuat cu ajutorul galeriilor *API 20 E* și a sistemului *VITEK-2* (BioMerieux).

Cercetările efectuate au evidențiat prezența biofilmului microbial pe diferite suprafețe inerte din unitățile de procesare a cărnii și a laptelui, dar și pe suprafața cărnii. În *unitatea de procesare a laptelui* aglomerări de microorganisme incluse în *biofilm* au fost constatate în următoarele puncte: pe suprafața interioară a tancului de răcire - *E. sakazaki*; pe suprafața interioară a separatorului de smântână - *S. epidermidis*, pe suprafața interioară a conductei la nivelul garniturii de cauciuc, pe suprafața paletei din tancul de răcire și pe suprafața pardoselii, pe suprafața interioară a conductei de lapte - *P. aeruginosa*. Aspectul biofilmului și caracteristicile acestuia sunt prezentate în anexele incluse în raportul de cercetare. Nivelul de contaminare cu enterobacterii și germeni din genul *Pseudomonas* în aceste punct a fost variabil. În ansamblu, în unitatea de procesare a laptelui, prezența biofilmului microbial a fost identificată pe suprafețele care prezentau un anumit grad de rugozitate.

În *unitățile de procesare a cărnii* evidențierea prezenței biofilmului microbial a fost diferită, dependent de unitate. În unitatea *PCI* biofilmul microbial s-a evidențiat pe următoarele suprafețe: interiorul și capacul sterilizatorului de cuțite (din plastic) s-a identificat un biofilm mixt, format din *P. aeruginosa* și *E. cloacae*. Biofilmul format a avut aspect rugos uniform (a acoperit în întregime suprafața), cu grosimea de  $4.47 \mu\text{m}$  și cu raportul suprafață/volum de  $0,81 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ . Biofilmul format de asocierea dintre *S. liquefaciens* și *E. coli* pe șorțului măcelarilor (din cauciuc) a prezentat caracteristicile unui biofilm matur: biovolumul de  $1.66 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$ , grosimea medie  $3.06 \mu\text{m}$  și raportul suprafață/volum de  $0,55 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  (imaginile sunt incluse în raportul de cercetare). În *unitatea de abatorizare procesare a cărnii de porc PC 2* s-a evidențiat prezența biofilmului microbial pe suprafețe din materiale diferite (inox, plastic și rășini epoxidice). Astfel, în probele recoltate din sala de tranșare s-a evidențiat prezența biofilmului pe suprafețe din inox (masa de lucru din inox, interiorul cărucioarelor de transport, cuțitul de tranșare, șașurile de agățare), din plastic (blatul de tranșare, navetă, perete din PVC, ușă) și rășini epoxidice (pardosea). Pe masa de lucru din inox s-a identificat biofilm mixt, format din asocierea *S. marcescens* – *E. coli*; pe suprafața interioară a cărucioarelor de transport s-a identificat *E. cloacae*; pe suprafața cuțitului de tranșare s-a izolat *A. baumannii*; de pe suprafața șașurilor de agățare s-a identificat *E. sakazakii*; pe blatul de tranșare s-a identificat biofilm mixt format din *E. coli* și *E. amnigenius*; pe suprafața naveții din plastic biofilmul a fost mixt fiind format din *S. liquefaciens* – *P. fluorescens*; pe suprafața pardoselii din rășină epoxidică biofilmul a fost mixt: *E. cloacae* și *E. coli*. Caracteristicile biofilmului format pe aceste suprafețe sunt incluse în raportul de cercetare. Pe suprafața *carcaselor* aglomerări de microorganisme incluse în biofilm au fost constatate în regiunea sternală și în regiunea coastelor, precum și pe suprafața pieselor din carne tranșate, cu o vechime de 5 zile, pe fața internă a pulpei, regiunea coccigiană și suprafața musculară a cotletului.

Biofilmul format pe *suprafața cărnii de porc* în general a fost un biofilm mixt, format din două specii microbiene. Astfel, în zona coccigiană s-a evidențiat asocierea dintre *E. coli* și *P. putida*, în zona pulpei, *E. coli* și *P. aeruginosa*, iar în zona pieptului *E. cloacae* și *P. aeruginosa*. În probele recoltate de pe suprafața *carcasei de bovine* din unitatea de vânzare cu amănuntul a fost identificată prezența biofilmului în regiunea toracoabdominală, regiunea pieptului și regiunea costală. Și în acest caz a fost un biofilm mixt, format din două specii microbiene. Astfel, în regiunea toracoabdominală și zona pieptului s-a evidențiat asocierea dintre *P. putida* și *E. cloacae*, iar în zona costală, *E. cloacae* și *P. fluorescens*. Pe suprafața carcasei de pasăre din unitatea de vânzare cu amănuntul s-a identificat biofilm microbial în zona pieptului și a spatelui, asocierea microbială constatată fiind între *E. coli* și *S. marcescens*, iar în zona toracoabdominală asocierea microbială sub formă de biofilm, între *P. putida* și *E. cloacae*.

Ca urmare a cercetărilor efectuate s-au desprins următoarele concluzii:

- Nivelul general de contaminare al *suprafețelor inerte* din unitățile de procesare, în zonele în care a fost evidențiată prezența biofilmului microbial, a variat de la  $10^2$  la  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>, cu un număr de enterobacterii de  $10^2 - 10^3$  ufc/cm<sup>2</sup> și  $10 - 10^2$  ufc/cm<sup>2</sup> germeni din genul *Pseudomonas*.
- Nivelul general de contaminare *pe suprafața cărnii*, în regiunile în care a fost evidențiat biofilmul microbial, a variat de la  $10^2$  la  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>, cu un număr de enterobacterii de  $10 - 10^2$  ufc/cm<sup>2</sup> și  $10$  ufc/cm<sup>2</sup> *Pseudomonas*.
- În *unitatea de procesare a laptelui* biofilmul microbial a fost format dintr-o singură specie bacteriană, diferită, dependent de locul de unde s-au recoltat probele.
- În *unitățile de procesare a cărnii* biofilmul microbial identificat pe suprafețele inerte a fost, de regulă, mixt, format din asocierea de enterobacterii sau asocieri de enterobacterii cu germeni din genul *Pseudomonas*.
- Biofilmul microbial de pe *suprafața cărnii de porc și vită* a fost aproape în exclusivitate mixt, format din asocieri între enterobacterii și germeni din genul *Pseudomonas*.
- Biofilmul de pe *suprafața carcasei de pasăre* a fost constituit din asocieri între diferite specii de enterobacterii.
- Structura biofilmului a fost variabilă, caracteristică pentru speciile microbiene asociate în aceste comunități microbiene.
- Prezența biofilmului microbial a fost evidențiată pe cinci suprafețe din *unitatea de procesare a laptelui* (60% din totalul suprafețelor examinate).
- În *unitatea de abatorizare-procesare (PC 2)* prezența biofilmului microbial s-a evidențiat pe nouă suprafețe.
- Pe *suprafața carcaselor și a pieselor tranșate din carne de porc* biofilmul microbial a fost evidențiat într-un număr relativ crescut de probe (29,4%), pe carcasele care prezentau o vechime de cel puțin trei zile.
- Pe *suprafața carcaselor de bovine* a fost identificată prezența biofilmului în 42% din probe.
- Pe *suprafața carcaselor de pasăre* s-a evidențiat prezența biofilmului microbial în zona pieptului, spatelui și regiunea toracoabdominală.

**Al patrulea obiectiv al proiectului de cercetare a constat în STUDIUL DINAMICII ȘI INFLUENȚEI DIFERIȚILOR FACTORI DE MEDIU ASUPRA FORMĂRII BIOFILMELOR MICROBIENE** și a avut drept activități: *urmărirea dinamicii de formare a biofilmului la speciile de bacterii izolate din unitățile de industrie alimentară în diferite condiții de pH, temperatură etc.* Mediul din unitățile de prelucrare a alimentelor oferă condiții care favorizează formarea biofilmului: umiditatea crescută, substanțele nutritive și inoculul de microorganisme de la materiile prime. Astfel de biofilme reprezintă un risc pentru sănătatea publică (surse de contaminare a alimentelor cu agenți patogeni sau de alterare), iar pe de altă parte generează importante pierderi economice (prin degradarea suprafețelor pe care se formează, prin colmatarea conductelor și a unor angrenaje ale utilajelor tehnologice, prin reducerea transferului de căldură etc). Pentru controlul biofilmului microbial în industria alimentară este necesară o mai bună înțelegere a fiziologiei biofilmului și a impactului unor factori de mediu asupra speciilor formatoare de biofilm.

Capacitatea speciilor bacteriene izolate din unități de industrie alimentară de a forma biofilm în diferite condiții de pH (5; 7,5; 8,5), temperatură (10° C; 22° C; 37° C) și interval de timp (24, 72 și 240 ore) a fost testată prin cultivarea în plăci de microtitrare și colorare cu cristal violet. Pentru testare au fost alese 19 tulpini bacteriene și trei asocieri. Din acestea 10 tulpini au fost izolate din biofilmul dezvoltat pe suprafețe inerte de natură diferită, din trei unități de procesare: un abator, o unitate de procesare carne și o unitate de procesare lapte. Biofilmul a fost recoltat de pe suprafețele cel mai frecvent întâlnite în industria alimentară: inox, plastic, cauciuc, rășină epoxidică, mozaic și ciment. Celelalte tulpini (nouă), precum și asocierile bacteriene au fost selectate din biofilmul dezvoltat pe suprafața cărnii provenită de la specii diferite (porc, vită, pui). Tulpinile bacteriene alese pentru asociere au izolat din același biofilm (recoltat de pe aceeași suprafață). Cuantificarea cantității de biofilm a fost efectuată prin

măsurare densității optice (DO) la 540 nm, cu ajutorul unui cititor ELISA. Datele au fost analizate statistic prin testul *Wilcoxon*, cu ajutorul programului *SPSS*.

**Efectul temperaturii.** Menținerea timp de 10 zile (240 ore), la temperatura de 10° C, în condiții optime de pH (7,5), a favorizat dezvoltarea celui mai dens biofilm de către tulpinile-test. Dintre acestea, *P. aeruginosa* (de pe carnea de porc) a dezvoltat cel mai abundent biofilm. Cantitatea de biofilm format de această bacterie a fost de 2,3 de ori mai crescută în comparație cu biofilmul produs de aceeași bacterie menținută 72 de ore în condiții optime de temperatură pentru dezvoltarea pseudomonadelor (22° C) și pH (7,5) și de 1,5 de ori mai abundent față de biofilmul format la 37° C, pH 7,5 după 72 de ore. Biomasa filmelor produse de tulpinile de *E. coli* izolate de pe carne, în aceleași condiții (pH 7,5; 10° C; 240h) a fost, în medie, de 1,5 ori mai crescută față de cea constatată în cazul incubării la 37° C, timp de trei zile. La temperatura de 22° C și la pH 7,5, din totalul tulpinilor bacteriene și a asocierilor acestora, izolate de pe carne și de pe suprafețe inerte, jumătate (11) au produs o cantitate de biofilm mai redusă după 72 de ore, reprezentând între 2 și 9 din masa de biofilm constatată la temperatura de 37° C și la pH 7,5. *E. coli* izolată de pe suprafața blatului de tranșare (din material plastic) a fost excepția cea mai reprezentativă, ea producând o cantitate de biofilm de 3,2 de ori mai mare față de cea constatată la 37° C, pH 7,5 după 72 de ore.

**Efectul pH-ului.** O creștere a producției de biofilm a fost observată cu **creșterea pH-ului**. În mediu alcalin (pH 8,5), toate tulpinile și asocierile bacteriene izolate de pe suprafața carcaselor și 50% din cele provenite de pe suprafețe inerte au avut o producție mai mare de biofilm față de pH 5, atât la 24, cât și la 72 de ore. Spre exemplu, pseudomonadele au dovedit o creștere a masei de biofilm de 196 -218%, iar colibaciliile, între 145 și 212%, după trei zile. În mod asemănător s-au comportat bacteriile menținute la pH aproape de neutru (7,5). Două excepții au fost constatate în aceste condiții: biofilmul format de *S. liquefaciens* de pe carnea de vită și de asocierea acestei tulpini cu *E. cloacae*.

În ansamblu, **mediul acid (pH 5)** a fost defavorabil dezvoltării biofilmului, în timp, de către flora bacteriană obișnuită a cărnii. Totuși, unele tulpini bacteriene au fost stimulate să producă biofilm în condiții de pH acid. Spre exemplu, tulpina de *Salmonella* izolată de pe suprafața depilatorului din unitatea de abatorizare și menținută 72 de ore la pH acid a produs o cantitate dublă de biofilm, comparativ cu aceeași tulpină expusă în aceleași condiții, timp de 24 de ore. Rezultate asemănătoare au fost obținute și în cazul tulpinii de *P. fluorescens* izolată de pe suprafața navetei din plastic, din unitatea de procesare carne (o creștere a masei de biofilm de 1,62 de ori în interval de 48 de ore). Unele tulpini de *E. coli*, *Salmonella*, *P. aeruginosa* și asocieri ale acestora (*S. liquefaciens* și *E. coli*) în condiții de mezofilie, la **pH 7,5**, au produs o cantitate de biofilm de două până de 10 ori mai mare, în comparație cu menținerea la pH 5, timp de trei zile.

**Efectul temperaturii și pH-ului în timp.** Condițiile de mezofilie (37° C) și pH-ul optim au favorizat formarea biofilmului în interval de 24 de ore. Expunerea tulpinilor microbiene la 37° C, timp de 72 de ore, nu este reflectată proporțional în biomasa de film bacterian formată de majoritatea bacteriile izolate de pe carne și de pe suprafețele inerte. Doar trei tulpini de pe suprafața cărnii (*E. coli* de pe suprafața cărnii de porc și pasăre și *P. aeruginosa* de pe suprafața cărnii de porc) au produs o cantitate de biofilm ușor mai crescută (reprezentând între 1,2 și 1,4% față de biomasa constatată la 24 de ore). De pe suprafețele inerte 80% (8 din cele 10 tulpini) din tulpini au produs o cantitate mai redusă de biofilm după un interval de trei zile de menținere la 37° C, reprezentând în jur de 50%, comparativ cu biofilmul de 24 de ore.

Concluziile desprinse din acest studiu sunt următoarele:

- Menținerea bacteriilor de pe *suprafața cărnii* (enterobacterii, germeni din genul *Pseudomonas* și asocieri ale acestora) în condiții de temperatură scăzută (10° C), timp de 10 zile, la pH favorabil pentru dezvoltarea acestora (pH 7,5), în prezența oxigenului stimulează producerea biofilmului.
- În ansamblu, mediul acid (pH 5) este defavorabil dezvoltării biofilmului, în timp, de către flora bacteriană obișnuită a cărnii.
- Unele tulpini bacteriene sunt stimulate să producă biofilm în condiții de pH acid (*Salmonella*) sau alcalin (*E. coli*, *P. aeruginosa*), ajungând să dubleze cantitatea de biofilm, după trei zile de menținere la 37° C.
- Condițiile de mezofilie (37° C) și pH-ul optim favorizează formarea biofilmului în interval de 24 de ore.
- Expunerea tulpinilor microbiene la 37° C, timp de 72 de ore, nu este reflectată proporțional în biomasa de film bacterian formată de majoritatea bacteriile izolate de pe carne și de pe suprafețele inerte. Dimpotrivă unele tulpini de *E. coli*, *Salmonella*, *P. aeruginosa* și asocieri ale acestora (*S. liquefaciens* și *E. coli*) în condiții de mezofilie, la pH 7,5, produc o cantitate de biofilm de două până la 10 ori mai mare, în comparație cu menținerea la pH 5, timp de trei zile.

- La pH 7,5, 50% din tulpinile bacteriene și asocieri ale acestora izolate din industria alimentară produc o cantitate mai mică de biofilm după trei zile de menținere la temperatura de 22° C, comparativ cu cele expuse la 37° C.
- pH-ul alcalin (8.5) stimulează producția de biofilm de către unele sușe de colibacili, salmonelle și tulpini din genul *Pseudomonas*, care produc de două sau de trei ori mai mult biofilm într-o perioadă de 72 de ore, față de aceleași tulpini crescute în mediu acid.

**Al cincilea obiectiv al proiectului de cercetare a constat în TESTAREA ACȚIUNII UNOR SUBSTANȚE BIOCIDE PENTRU ÎNTÂRZIAREA FORMĂRII ȘI DISTRUGERII BIOFILMELOR MICROBIENE.** Activitățile aferente au constat în efectuarea unor experimente de întârziere a biofilmelor și de distrugere a acestora, utilizând diferite substanțe și concentrații de produse biocide (enzime).

Matricea biofilmului este reprezentată de materia extracelulară, în mare parte produsă de microorganismele care sunt incluse în aceasta. Este compusă dintr-un conglomerat de biopolimeri cu structură și compoziție diferite, cunoscuți sub numele de *substanțe polimerice extracelulare*. Acești compuși conferă arhitectura tridimensională biofilmului și sunt responsabili de atașarea și coeziunea biofilmului. Deoarece microorganismele integrate în biofilm pot deveni rezistente la acțiunea substanțelor antimicrobiene utilizate obișnuit în procedurile de igienizare, tratamentul cu enzime al suprafețelor poate fi utilizat pentru a denatura matricea constituită din substanțe polimerice extracelulare. Astfel de mijloace pot constitui soluții alternative care sunt destinate utilizării atunci când metodele obișnuite nu dau rezultate în combaterea biofilmului microbial.

Experimentele au constat în creșterea biofilmelor dezvoltate de opt tulpini bacteriene, izolate din unitățile de procesare (*Salmonella*, *S. liquefaciens*, *E. sakazakii*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* și două tulpini de *E. coli*), pe suprafețe de oțel inoxidabil de tip 304 2B, apoi tratarea acestor suprafețe cu patru enzime (tripsina, papaina, pectinaza și  $\alpha$ -amilaza) la concentrații diferite. Pentru creșterea biofilmului s-a utilizat un dispozitiv care constă într-un suport cilindric din oțel inoxidabil, care susține 16 plăcuțe de oțel inoxidabil. Dispozitivul astfel asamblat a fost plasat într-un pahar *Berzelius* în care s-a introdus mediu lichid de cultură și cultura bacteriană-test. Omogenizarea conținutului a fost efectuată pe toată perioada incubării (72 de ore), cu ajutorul unui agitator magnetic. După formarea biofilmului, plăcuțele-test au fost recoltate și supuse tratamentului cu soluțiile enzimatică. Pentru cuantificarea numărului de microorganisme rămase atașate în urma tratamentului au fost efectuate însămânțări în agar TSB. În acest studiu s-au utilizat opt tulpini bacteriene.

Rezultatele obținute în urma acestor experimente au arătat capacitatea de formare a diferitelor tulpini de a forma biofilm pe suprafața oțelului inoxidabil, fapt ce s-a dovedit că influențează îndepărtarea enzimatică a biofilmelor. Tot astfel, îndepărtarea enzimatică a biofilmelor depinde de microorganismul implicat în formarea biofilmului. S-au întâlnit anumite diferențe în ceea ce privește îndepărtarea biofilmului microbial în cadrul aceluiași gen și chiar aceleași specii, așa cum a fost cazul biofilmelor formate de *P. aeruginosa* și *P. fluorescens* și biofilmele formate de cele două tulpini de *E. coli*. Una din explicațiile acestei observații ar putea fi compoziția chimică a matricei, care diferă de la specie la specie și chiar de la o tulpină la alta.

Cele mai active enzime au fost cele proteolitice (*tripsina*, *papaina*, *pectinaza*) dintre care cea mai activă a fost *tripsina*, cu o capacitate de a îndepărta biofilmul microbial cuprinsă între 89% și 99%, cu o medie de 95,25%, urmată de *papaină*, cu o capacitate cuprinsă între 73 și 99% (medie 92,62%) și *pectinaza* cu o capacitate cuprinsă tot între 73 și 99%, dar cu o medie de 89,12%. *Amilaza* a prezentat o activitate destul de bună, inconstantă, fapt observat la biofilmele formate de tulpinile de *E. coli*.

În final se poate concluziona că:

- Matricea biofilmului prezintă o heterogenitate structurală care diferă interspecific și chiar intraspecific, ceea ce duce la diferențe în ceea ce privește capacitatea enzimelor de a îndepărta biofilmele formate. Diferențele sunt prezente și în ceea ce privește capacitatea de formare a biofilmului, fapt ce, de asemenea, influențează capacitatea soluțiilor enzimatică de a acționa și de a îndepărta biofilmele formate.
- *Proteazele* au cea mai mare capacitate de a îndepărta biofilmul microbial, cea mai eficientă enzimă dintre cele testate fiind *tripsina*, cu o capacitate medie de a îndepărta biofilmul microbial de 95,25%, urmată de *papaină*, cu o capacitate medie de îndepărtare de 92,62% și *pectinaza*, cu o capacitate medie de 89,12%.
- *Amilaza* a prezentat o activitate medie de îndepărtare a biofilmului de 84%, dar capacitatea acestei enzime a fost inconstantă în ceea ce privește activitatea asupra biofilmelor formate de tulpinile de *E. coli*.