

PROIECT IDEI cod 902:

IMPLICAȚIILE BIOFILMULUI MICROBIAN ÎN IGIENA ȘI SIGURANȚA ALIMENTELOR

DIRECTOR DE PROIECT:

Conf. dr. SALA CLAUDIA CORINA

ECHIPA DE CERCETARE:

Prof. dr. DECUN MIHAI

Sef lucr. dr. MORAR ADRIANA

Cercetător MILOVAN GHEORGHE

Drd. MORVAY ATTILA ALEXANDRU

REZUMATUL PROIECTULUI

Biofilmul reprezinta o strategie de adaptare, de supravietuire a microorganismelor vii in mediile umede, incluzand alimentele, adaptare de care trebuie sa se tina cont atunci cand se implementeaza programe de sanatate si de sanatatea consumatorului. Formarea biofilmului poate compromite suprafata utilajelor și a produselor alimentare pe care se formeaza. Microorganismele care se gasesc in interiorul biofilmului, fiind protejate de actiunea substantelor antimicrobiene, prezinta insusiri diferite și riscuri inca insuficient evaluate. Anumite cercetari efectuate in SUA și Anglia au semnalat necesitatea și urgenta aprofundarii cunoasterii biofilmelor microbiene in relatie cu siguranta alimentara. In tara noastra nu au fost efectuate cercetari de acest fel, datorita anumitor dificultati de ordin tehnic. Proiectul de cercetare propus are in vedere parcurgerea mai multor etape în decurs de trei ani. In prima etapa se va evidentia prezenta și structura biofilmului microbial pe diverse suprafete din unitatile de prelucrare. In a doua etapa se va urmări sensibilitatea la substantele biocide și la antibiotice a unor bacterii gram pozitive și gram negative flotante, comparativ cu cele integrate în biofilm. In cea de a treia etapa se vor testa anumite substante si proceduri, cu scopul limitarii tendintei de formare a biofilmului si chiar de distrugere a biofilmelor formate.

OBIECTIVELE PROIECTULUI

Proiectul propus are ca prim obiectiv evidențierea prezenței și structurii biofilmului microbial pe diverse suprafețe din unitățile de prelucrare a produselor alimentare din țara noastră. Următorul obiectiv al cercetării este reprezentat de studiul sensibilității la substanțe biocide a unor tulpini din speciile bacteriene *Gram negative* și *Gram pozitive*, aerobe și anaerobe, flotante, precum și a celor integrate în biofilme.

Al treilea obiectiv constă în testarea anumitor substanțe, concentrații și proceduri pentru întârzierea formării biofilmelor și chiar pentru distrugerea biofilmelor formate.

Cercetarea are un caracter interdisciplinar întrucât apelează la cunoștințe și tehnici din domeniul microbiologiei, biochimiei și igienei aplicate în cadrul unor tehnologii de obținere și prelucrare a produselor alimentare.

Obiectivele au un caracter pronunțat original, fiind prima cercetare de acest fel în țară și prin anumite aspecte prezintă originalitate de nivel mondial.

Se întrevide aprofundarea cunoașterii în domeniul igienei și al microbiologiei aplicate cu scopul perfecționării programelor de igienizare și tehnologiilor de procesare, în vederea obținerii unor produse alimentare salubre, diminuarea pierderilor economice în condițiile garantării sănătății consumatorilor și a protecției mediului ambiant. Cercetarea va conduce de asemenea, la progrese importante în domeniul metodelor de examinare și monitorizare microbiologică a întregului flux de obținere și de prelucrare a produselor alimentare.

METODOLOGIA CERCETĂRII

Evidențierea prezenței și a structurii biofilmului se va realiza pe suprafețe inerte și pe suprafața produselor alimentare. Se vor alege suprafețe constituite din materiale diferite (inox, PVC, sticlă etc), care prezintă un grad diferit de finisare (suprafețe finisate și zonele de îmbinare a conductelor). Stabilirea gradului de contaminare a suprafețelor se va face prin numărarea directă în placă, iar aprecierea prezenței biofilmului se va face cu ajutorul metodelor care evidențiază concentrația de ATP de pe suprafețe. Structura biofilmului identificat va fi evidențiată prin metodele care utilizează diferite substanțe fluorescente sau nefluorescente de colorare a substratului (microscopia cu fluorescență și microscopia confocală cu aparate de tip *Leica Microsystem*).

Cercetarea sensibilității la substanțele biocide a bacteriilor flotante și a celor incluse în biofilm se vor efectua prin unele tehnici standardizate (tehnica antibiogramelor, metoda difuzimetrică pe geloză nutritivă și metoda diluțiilor), cât și prin metode experimentale recent propuse pe plan mondial (*Calgary Biofilm Device*), sau concepute pe plan local, în raport de condițiile concrete și scopul urmărit.

Studiul dinamicii de formare a biofilmelor cât și a influenței diferiților factori de mediu se va efectua pe un biofermentor computerizat de tip *Tryton*, care permite reglarea și monitorizarea, temperaturii pH – ului, potențialului redox, a concentrației de oxigen, a vitezei de circulație a lichidului etc.

Experimentarea diferitelor substanțe, concentrații și metode de aplicare, cu scopul inhibării formării biofilmelor, se va efectua pe modele experimentale care să reproducă pe cât posibil condițiile fluxului tehnologic de procesare a produselor alimentare, în mod deosebit cu referire la natura suprafeței, gradul de rugozitate al acesteia, viteza de curgere, temperatura, pH – ul.

PLANUL DE LUCRU. OBIECTIVE SI ACTIVITĂȚI

An	Etapa	Obiective	Activități
2009	Intermediara	1. Evidențierea prezenței biofilmului microbial pe suprafețe inerte cu grad diferit de finisare	1.1. Procurarea materialelor necesare pentru realizarea primei faze a cercetării (medii de cultură, reactivi, coloranți, șabloane și a altor materiale necesare realizării obiectivelor); procurarea unor materiale informative. Selectarea a două unități de procesare a laptelui și a cărnii, stabilirea punctelor de recoltare a probelor și a sistemului de monitorizare. Alegerea metodologiei de cultivare și preparare a mediilor de cultură.
			1.2 Experimentarea în laborator a evidențierii biofilmului prin microscopie cu fluorescență. Recoltarea probelor de sanitație, efectuarea de însămânțări pentru determinarea NTGMA, a enterobacteriilor și a germenilor din genul Pseudomonas (procurarea chiturilor specifice acestor aparate - pachete de umplere sau dispozitive de prelevare și a fluorocromilor); Materiale și servicii pentru microscopul confocal. Completarea infrastructurii existente se va face cu BackLight Bacterial Viability kit necesar pentru a face diferențierea între bacteriile moarte și cele vii prezente pe suprafețe. Participarea la manifestări științifice naționale: Cluj, București, Galați, Brașov; participarea la manifestări științifice internaționale simpozioane, conferințe: Vechta (Germania), Roma (Italia). Participarea la cursuri de instruire în: microscopia confocală (Amsterdam sau un alt centru de instruire în Europa), metode de investigare în siguranța alimentelor.
2009	Finala	1. Încercări de evidențiere a prezenței biofilmului pe suprafața cărnii	1.1. Încercarea de evidențiere a prezenței biofilmului prin aplicarea comparativă a metodei cu ATP bioluminescență, utilizând cel puțin două aparate. Stabilirea locației în care se vor desfășura cercetările. Procurarea materialelor necesare pentru realizarea acestei faze a cercetării (medii de cultură, reactivi, coloranți, chituri de recoltare a probelor de sanitație de pe carcase, mănuși sterile și a altor materiale necesare) Recoltarea probelor pentru evidențierea prezenței biofilmului pe suprafața carcaselor prin aplicarea comparativă a metodei cu ATP bioluminescență și cultivarea pe medii de cultură uzuale sau rapide (procurarea chiturilor specifice acestor aparate Hylite și Lumitester pachete de umplere sau dispozitive de prelevare).
			1.2 Încercarea de evidențiere pe carne a biofilmului cu ajutorul microscopului cu fluorescență (procurarea fluorocromilor specifici și a altor materiale necesare).; Materiale și servicii pentru microscopul confocal. Analiza rezultatelor și redactarea raportului științific

2010	finală	<p>1. Studiul structurii biofilmului în condiții de laborator</p>	<p>1.1. Efectuarea de experimente pentru evidențierea etapelor de constituire a biofilmului bacterian utilizând suprafețe netede și una din speciile de Enterobacteriaceae. Repetarea experimentului pe suprafețe din același material, dar cu un alt grad de rugozitate, contaminate cu același tip de cultură</p> <p>1.2 •Efectuarea de experimente pentru evidențierea etapelor de constituire a biofilmului bacterian utilizând suprafețe netede, dar și suprafețe din același material cu un alt grad de rugozitate și o tulpină de coci Gram pozitivi. Repetarea experimentelor pentru evidențierea etapelor de constituire a biofilmului bacterian utilizând suprafețe netede, dar și suprafețe din același material cu un alt grad de rugozitate și o tulpină Pseudomonas. Repetarea experimentelor pentru evidențierea etapelor de constituire a biofilmului bacterian utilizând suprafețe netede, dar și suprafețe din același material cu un alt grad de rugozitate, și asociații de bacterii aerobe, facultative aerobe și anaerobe. Evidențierea structurii biofilmului prin microscopie confocală și urmărirea diferențelor dintre biofilmele constituite dintr-o singură specie și biofilmele cu diferite asociații microbiene. Procurarea materialelor necesare pentru realizarea acestei faze a cercetării (medii de cultură, reactivi, coloranți, șabloane și mănuși sterile, tulpini bacteriene și a altor materiale necesare realizării obiectivelor etc); procurarea unor materiale informative; Materiale si servicii pentru microscopul confocal; completarea infrastructurii existente prin achiziționarea unui Anular Biofilm Reactor, Calgary Biofilm Device, Controler electronic pipete; Participarea la manifestări științifice naționale: Cluj, Iasi, Bucuresti, Craiova, Constanta, Brasov; participarea la manifestari științifice internationale simpozioane, conferințe: Herzeg Novi (Muntenegru), Lozenec (Bulgaria), Sankt Petersburg (Rusia). Participarea la cursuri de instruire în: metode de investigare în siguranța alimentelor în Europa. Participarea la stagii de instruire în microscopie confocală la Universitatea din Kentucky SUA</p>
		<p>2. Evidențierea prezenței biofilmului microbial pe suprafețe din unități de industria alimentară</p>	<p>2.1. Selectarea unităților în care se vor desfășura experimentele și stabilirea punctelor de recoltare a probelor și a sistemului de monitorizare. Recoltarea probelor pentru evidențierea prezenței biofilmului. Recoltarea probelor de sanitație și transportarea lor în laborator, efectuarea de însămânțări pentru determinarea NTGMA, a enterobacteriilor și a germenilor din genul Pseudomonas. Încercarea de efectuare a unor corelații între tipurile și structura biofilmului și numărul de microorganisme (completarea infrastructurii existente cu un Fluorometru cu accesoriile necesare).</p>
		<p>3. Sensibilitatea la substanțele biocide a bacteriilor în formă liberă sau integrate în matricea biofilmului</p>	<p>3.1. Obținerea de suspensii de tulpini de bacterii Gram negative (E. coli, Pseudomonas) și Gram pozitive (din genurile Staphylococcus, Bacillus) Obținerea biofilmelor pornind de la aceleași suspensii</p> <p>3.2 Testarea sensibilității tulpinilor bacteriene (sub formă liberă și integrate în matricea biofilmului) la cel puțin două categorii de produse dezinfectante (perhidrol, clor, acid peracetic). Procurarea materialelor necesare (medii de cultură, produse biocide etc)</p>
		<p>4. Sensibilitatea la antibiotice a bacteriilor în formă liberă sau integrate în matricea biofilmului</p>	<p>4.1. Obținerea de suspensii de tulpini de bacterii Gram negative (E. coli, Pseudomonas) și Gram pozitive (din genurile Staphylococcus, Bacillus) Obținerea biofilmelor pornind de la aceleași suspensii</p> <p>4.2. Testarea sensibilității tulpinilor bacteriene (sub formă liberă și integrate în matricea biofilmului) la cel puțin două categorii de antibiotice prin tehnica antibiogrammei, prin metode experimentale recent propuse la nivel mondial (Calgary Biofilm Device), sau prin metode concepute local, în raport de condițiile concrete. Procurarea materialelor necesare pentru realizarea acestei faze a cercetării (medii de cultură, reactivi, coloranți, șabloane și mănuși sterile, tulpini bacteriene și a altor materiale necesare realizării obiectivelor (substanțe dezinfectante, chituri pentru testarea sensibilitatii la antibiotice) și redactării raportului final etc; procurarea unor materiale informative; Materiale si servicii pentru microscopul confocal ; completarea infrastructurii existente prin achiziționarea unei balanțe, microscop binocular, Stowall Flow Cell, Calgary Biofilm Device, Spectrofotometru. Participarea la cursuri de instruire în: metode de investigare în</p>

			siguranta alimentelor (Europa). Participarea la stagii de instruire în microscopie confocală de la Universitatea din Kentucky SUA. Participarea la manifestări științifice naționale: Cluj, Iasi, Bucuresti, Galati, , Brasov; participarea la manifestari științifice internationale simpozioane, conferințe în Europa; Herzeg Novi (Muntenegru), Lozenec (Bulgaria), Copenhaga (Suedia). Analiza rezultatelor și redactarea raportului științific.
2011	Finală	1.Studiul dinamicii și a influenței diferiților factori de mediu asupra formării biofilmelor microbiene	1.1. Conceperea modelelor experimentale Urmărirea dinamicii de formare a biofilmului la E.coli în diferite condiții de pH, temperatură, aerare etc. cu ajutorul biofermentorului computerizat de tip Tryton. Repetarea experimentelor de urmărire a dinamicii de formare a biofilmului utilizând o tulpină de stafilococ. Repetarea experimentelor de urmărire a dinamicii de formare a biofilmului utilizând o tulpină de Pseudomonas.
		2.. Testare anumitor substanțe biocide în concentrații diferite pentru întârzierea formării și distrugerii biofilmelor microbiene	2.1. Stabilirea procedurilor experimentale pe baza rezultatelor cercetărilor din etapele anterioare Efectuarea unor experimente de întârziere a formării biofilmelor și de distrugere a acestora în condiții de laborator, utilizând diferite substanțe și concentrații de produse biocide. Experimentarea întârzierii formării biofilmelor și distrugerea acestora pe instalații din industria alimentară, utilizând diferite substanțe și concentrații de produse biocide.
		3. Repetarea anumitor experimente, prelucrarea datelor obținute și redactarea raportului final	3.1. Analiza rezultatelor ținând cont de progresele înregistrate la nivel mondial. Repetarea la nevoie a anumitor experimente dacă se constată necorelări sau din alte motive. Elaborarea de recomandări pentru procesatorii de alimente. Redactarea unor comunicări în vederea prezentării lor la diferite congrese, conferințe și publicarea rezultatelor. Procurarea materialelor necesare pentru realizarea acestei faze a cercetării (medii de cultură, reactivi, coloranți, tulpini bacteriene și a altor materiale necesare realizării obiectivelor și redactării raportului final etc; procurarea unor materiale informative; ;Materiale si servicii pentru microscopul confocal ;completarea infrastructurii existente cu aparat foto performant, laptop, videoproiector, numărător de colonii, baie de sonicare, baie ultratermostat cu refrigerare, microcentrifugă. Analiza rezultatelor și redactarea raportului științific final. Participarea la cursuri de instruire în: metode de investigare în siguranta alimentelor (Europa). Participarea la manifestări științifice naționale: Cluj, Iasi, Bucuresti, Galati, Constanta, Brasov; participarea la manifestari științifice internationale simpozioane, conferințe in Europa: Herzeg Novi (Muntenegru), Lozenec (Bulgaria), Atena (Grecia), Viena (Austria)