

EVALUAREA ACTIVITĂȚII MICROBIOLOGICE A APELOR MINERALE DIN JUDEȚELE HARGHITA, MUREȘ ȘI TIMIȘ, DETERMINAREA NUMĂRULUI TOTAL DE GERMEI (NTG), DETERMINAREA SPORILOR DE BACTERII ANAEROBE SULFITO- REDUCĂTOARE (CLOSTRIDIA)

G. HEGHEDŪȘ-MÎNDRU¹,
Ramona Cristina BIRON¹,
Delia Maria PERJU²,
L.M. RUSNAC², A. RIVIȘ¹
D. ȘTEF¹

¹Universitatea de Științe Agricole și Medicină
Veterinară a Banatului, Timișoara
e-mail gabone2003@yahoo.com

²Universitatea Politehnica, Timișoara

Mineral waters are those waters that have a variable content of mineral salts, gases, mineral substances, radioactive elements, which confer therapeutically properties to these waters. In the past, the name of mineral water was given to all the underground or superficial waters that could have been used for therapeutically causes. In the last years, mineral waters for therapeutically means were named curative waters.

In our country there are many mineral water springs and around them were set up important resorts. Mineral waters are basically natural factors in indicated disease treatment. Mineral waters are: salt-iodated-bromide, salt-sulphur and springs for internal cure with slightly sulphur mineralized, bicarbonated, sulphurated, sodium calcinated, saline. Doro-sodium iodated bromide waters with gases release (light hydrocarbons such as methane) are deep underground waters cu high concentration, explored by bore.

In this study we have done microbiological analyses for 3 samples of mineral water from Harghita, Mureș and Timiș counties. For all analyses we considered the Romanian legislation and the European legislation.

For the water samples analyzed we used the Millipore filters. The method we use is more selective and quickly. The culture media we used for filter impregnation is agar with lactose and tergitol 7.

There were used impregnated pads with nutritive media (according to ISO 9308).

The method we used - filtration method on a membrane (white filter with green grid).

Keywords: Mineral water, Membrane filter, Agar with ferment extract, TSC agar, Colony count, Clostridia.

Apa minerală naturală este o apă care are originea într-un acvifer sau zăcămint subteran, protejat de orice risc de poluare, provine dintr-o sursă exploatată prin una sau mai multe emergente naturale sau foraje și este îmbuteliată în apropierea sursei, cu precauții de igienă deosebite.

Producătorul trebuie să vină în întâmpinarea creșterii constante a cerințelor consumatorilor cu privire la calitatea și siguranța pe termen mai lung a alimentelor și băuturilor. El nu poate limita încrederea calității controlului produsului finit, cum ar fi băuturile îmbuteliate sau produsele alimentare preparate. În schimb, în mod constant, trebuie să controleze materiile prime și efectueze controale de calitate de-a lungul fluxului de producție dacă dorește să evite pierderile ulterioare și eventualele plângeri ale consumatorilor. Testele microbiologice și în condiții aseptice joacă un rol important în câștigarea încrederii asupra calității.

În industria băuturilor nealcoolice, calitatea microbiologică și igienică, incluzând stabilitatea biologică a produselor sunt un criteriu important pentru valoarea, prețul produsului. Motivul: doar câțiva microbi sunt deseori de ajuns pentru a distruge cantități mari de băuturi.

Cu toate că dezvoltarea explozivă a tehnologiei a redus riscul contaminării cu microorganisme de alterare, problema duratei proprii de valabilitate a luat noi dimensiuni ca rezultat a capacității mari de producție posibilă acum. Controlul de calitate asupra îmbutelierii și umplerii în termeni chimici și, mai ales, ai stabilității biologice, trebuie adaptat la această dezvoltare prin metodele de ultimă oră.

Cerințele pentru metoda practică a testului microbiologic sunt cele care permit determinări cantitative și reproductibile a urmelor de contaminare și care poate fi efectuată eficient și economic în condiții obișnuite. Aceste cerințe sunt îndeplinite optim prin metoda filtrării cu membrană.

Principiul acestei metode este bazat pe concentrația microorganismelor de la probe relativ mari de pe suprafața membranei filtrului și culturi ale acestor microorganisme pe un mediu nutrient sau un mediu de cultură agar.

MATERIAL ȘI METODĂ

- apă minerală (surse diferite);
- mediu de cultură folosit – agar cu extract de drojdie, TSC agar – bază cu cicloserină;

- cartonașe impregnate cu mediu nutritiv (conform normelor ISO 9308)

Cartonașele impregnate cu mediu nutritiv (CMN) sunt utilizate împreună cu metoda filtrului membrană de peste 20 de ani cu succes, ele ușurând datorită manevrării foarte practice numeroase procese de analiză microbiologică.

CMN sunt medii de cultură sterile în formă uscată, preambalate în cutii Petry sterile. După umezire cu 3,0-3,5 mL apă sterilă și distilată ele sunt gata de utilizare.

Umezirea cartonașelor nutritive este optimă când în zona de margine este clar vizibil un surplus de lichid.

- pompă de vid;
- pâlnie de vid - 500 ml.

Mod de lucru

Pentru a obține rezultate relevante în controlul microbiologic, este necesară respectarea unor condiții de lucru care să asigure eliminarea de microorganisme străine, care ar putea influența negativ rezultatele.

Se va lucra într-un spațiu lipsit de curenți de aer. Înainte de începerea lucrului locul de muncă va fi stropit sau șters cu soluție dezinfectantă (alcool 70%).

Aparatele de filtrare, pensete și foarfecele vor fi sterilizate înainte de utilizare printr-o metodă uzuală (flambare).

Metoda filtrării prin membrană

O membrană de filtru cu mărimea porilor potrivită este plasată pe suportul unui filtru, iar proba de analizat este filtrată. În timpul procesului, microorganismele din proba de analizat sunt reținute pe suprafața filtrului prin acțiunea de selecție a membranei filtrante. Inhibitorii de creștere pot fi îndepărtați prin spălarea suportului cu apă sterilă după filtrare. După aceasta, membrana filtrantă este pusă pe un mediu de cultură și incubată. Nutrienții și metaboliții sunt schimbați printr-un sistem de pori ai membranei filtrante.

Avantaje:

Comparativ cu metoda directă, pot fi analizate volume considerabil mai mari de probă. Acest efect de concentrare crește precizia determinării microbiologice.

Membrana filtrantă cu coloniile dezvoltate poate fi păstrată ca o dovadă permanentă a testului.

Coloniile vizibile pot fi raportate direct la volumul probei. Se pot da rezultate cantitative.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

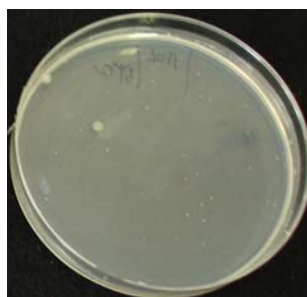
În lucrarea de față am efectuat analize microbiologice la 3 probe de apă minerală provenite din trei areale geografice (Harghita, Mureș și Timiș)



Harghita



Mureș



Timiș

Determinarea numărului total de germeni (NTG)

Mod de incubare la 48 de ore la $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, și 72 de ore la $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;

Mediul de cultură folosit - Agar cu extract de drojdie.

Metode folosite - încorporări în mediu nutritiv solid. Un set de plăci Petry se incubează la 36°C la 48 de ore, și un alt set este incubat la 22°C la 72 de ore. Se numără toate coloniile dezvoltate.

Determinarea se realizează pe un eșantion de 1mL.

Interpretarea rezultatelor obținute după 48 de ore

Harghita - nu s-a identificat nimic;

Mureș - s-au identificat două colonii;

Timiș - s-au identificat două colonii mari și mai multe mici.

Se exprimă prin numărul de colonii raportat la volumul de 1mL, la temperatura de incubare ($36 - 22^{\circ}\text{C}$) se numără toate coloniile ce s-au dezvoltat raportându-se la volumul de 1mL.

Interpretarea rezultatelor obținute după 72 de ore

Harghita – nu s-a identificat nimic;

Mureș - nu s-a identificat nimic;

Timiș - s-au identificat cinci colonii mari și mai multe mici.



Harghita



Mureș



Timiș

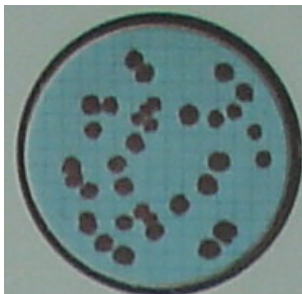
Procedură specifică – detectarea și numărarea sporilor de bacterii anaerobe sulfito– reducătoare (*Clostridia*).

Mod de incubare - se realizează în condiții de anaerobioză la temperatura de $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ timp de 48 de ore.

Mediul de cultură folosit – TSC agar – bază cu adăugare de cicloserină înainte de utilizare.

Metoda folosită - metoda filtrării prin membrană sterilă de culoare albă cu caroiaj negru cu porozitate de $0.2\ \mu\text{m}$. Se lucrează pe un eșantion de 100 mL încălzit în prealabil într-o baie de apă timp de 15 minute (pentru selectarea sporilor).

Pentru *Clostridia* avem:



Clostridia

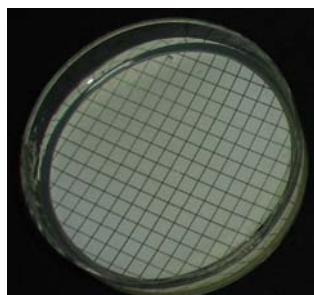
Interpretarea rezultatelor obținute

În mediu de cultură solid, sporii bacteriilor sulfito-reducătoare formează colonii negre.

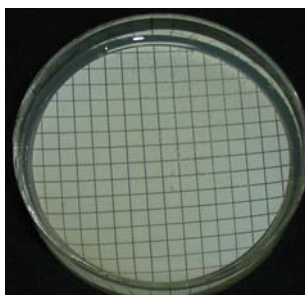
Harghita - nu s-a identificat nimic;

Mureș - nu s-a identificat nimic;

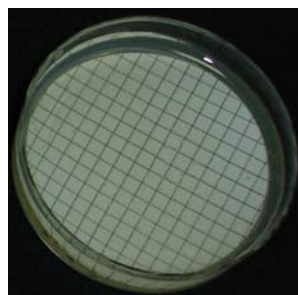
Timiș - nu s-a identificat nimic.



Harghita



Mureș



Timiș

CONCLUZII

În urma rezultatelor experimentale privind determinarea numărului total de germeni (NTG) și a sporilor de bacterii anaerobe sulfito-reducătoare (*Clostridia*) s-au constatat următoarele:

- la identificarea numărului total de germeni după incubare la 48 de ore în județul Harghita testele s-au dovedit a fi negative, în județul Mureș s-au identificat două colonii, iar în județul Timiș s-au identificat două colonii mari și mai multe mici;

- la identificarea numărului total de germeni după incubare la 72 de ore s-a constatat că în județele Harghita și Mureș rezultatele testelor sunt negative, iar la cele din județul Timiș s-au identificat cinci colonii mari și mai multe mici;

- la identificarea sporilor de bacterii anaerobe sulfito-reducătoare (*Clostridia*) s-a constatat că în toate cele trei județe studiate rezultatele testelor sunt negative.

BIBLIOGRAFIE

1. *** ASRO, STANDARD ROMÂN, SR EN ISO 6222, Ianuarie 2004;
2. *** ASRO, STANDARD ROMÂN, SR EN ISO 12780, Martie 2003;
- 3.*** Sartorius, Microbiological Testing of Foods, Beverages and Pharmaceuticals, REG. NO. 1476/2001;
4. Criado, M.,V., Fernández Pinto V., E., Badessari A., Cabral D. - *Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water*, International Journal of Food Microbiology Volume 99, Issue 3, 1 April 2005, Pages 343-349;
5. Lepeuple, A.,S., Giloupe, S., Pierlot, E., M.-R. de Roubin - *Rapid and automated detection of fluorescent total bacteria in water samples*, International Journal of Food Microbiology Volume 92, Issue 3, 1 May 2004, Pages 327-332;
6. Loy, A., Beisker, W. and Meier, H. - *Diversity of Bacteria Growing in Natural Mineral Water after Bottling*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 71, No.7, July 2005, Pages 3624-3632.