

*ELS ALTRES HABITANTS*

*ESTHER PI BADOSA*

## RESUM

# S

'ha determinat de manera quantitativa la contaminació per microorganismes en l'aire i superfícies de diferents ambients (majoritàriament de la població de Santa Pau, comarca de la Garrotxa, Girona, Espanya) en dues èpoques estacionals diferenciades quant a la temperatura i humitat de l'ambient (juny i agost). Per a la determinació de la contaminació de l'aire es va utilitzar la tècnica de la sedimentació, utilitzant plaques de Petri, mentre que per a la contaminació de superfícies es van utilitzar les plaques RODAK (*Replicate Organism Direct Agar Count*). Ambdós tipus de plaques es van utilitzar amb medi Saboraud (SAB) per al recompte de fongs i llevats i medi d'agar per a recompte en placa (PCA) per bacteris. Pel que fa referència a la contaminació de l'aire i de menor a major quantitat de contaminació hi ha els llocs interiors, exteriors, oficials i de salut, i en major proporció, a les botigues i bars així com en els ambients escolars. En la contaminació de les superfícies hi ha menys contaminació als llocs oficials i de salut, interiors, botigues i bars, ambients i escolars i finalment als exteriors. Els resultats globals han posat de manifest que els microorganismes estan presents per tot arreu i que les persones són una font de contaminació important ja que alliberen una gran quantitat de partícules quan es mouen, estossen, etc i que aquestes partícules estan associades a la presència de microorganismes.

## INTRODUCCIÓ

Tradicionalment els organismes vius es classificaven en els regnes de les plantes i els animals. Més endavant, quan els biòlegs van començar a estudiar organismes que no eren visibles a ull nu, es van trobar amb la problemàtica que molts no podrien ser classificats ni com a plantes ni com a animals. A aquests organismes se'ls va anomenar microorganismes (organismes molt petits). El descobriment dels microorganismes s'associa al desenvolupament del microscopi. Al 1664 Robert Hooke va descriure, per primera vegada, els fongs, però la primera persona que va veure amb detall els microorganismes va ser l'holandès Anton van Leeuwenhoek, que va utilitzar microscopis fabricats per ell mateix. Els primers dibuixos que va presentar a la Real Societat de Londres (Figura 1), van ser confirmats, més endavant, per altres investigadors amb microscopis millorats.

Posteriorment, es va descobrir que tots els organismes vius es podrien dividir en dos tipus cel·lulars bàsics: procariotes i eucariotes, en base a les seves diferències fonamentalment de l'estructura cel·lular. A més de la diferència de mida, les cèl·lules eucariotes, que són més grans, es caracteritzen per tenir una estructura interna molt més complexa que les procariotes, ja que el seu interior està compartimentat diferenciant clarament el nucli cel·lular (on es troba emmagatzemat el material genètic) del citoplasma, mitjançant la membrana nuclear. A més a més, en aquest citoplasma es disposen els anomenats orgànuls com el reticle endoplasmàtic llis, el rugós, l'aparell de golgi, els mitocondris, etc tal com es pot observar a la figura 2.

Dins dels microorganismes, hi ha diferents grups (Brock, 2003; Pelczar, J. 1993): 1) **les algues**, que són microorganismes eucariotes unicel·lulars o colonials que contenen clorofil·la i, per tant, realitzen la fotosíntesi amb alliberament d'oxigen; 2) **els protozous**, que són, també, microorganismes eucariotes unicel·lulars que presenten motilitat i ingestió de l'aliment; 3) **els fongs i llevats**, que també són eucariotes i que són pluricel·lulars en el cas dels fongs i unicel·lulars en el cas dels llevats; 4) **els bacteris**, que són microorganismes procariotes i dels que hi ha descrits centenars de gèneres i milers d'espècies que representen propietats fisiològiques i morfològiques molt diverses.

Els microorganismes tenen molt d'impacte sobre les activitats de l'home en l'agricultura, la indústria alimentària i l'energia. A més a més, els microorganismes també són utilitzats en biotecnologia per obtenir nous organismes capaços de produir productes específics. Finalment, els microorganismes també poden causar malalties en els homes i, per això, tenen una importància molt elevada en clínica humana.

La població microbiana de l'ambient és molt variable. L'aire i les superfícies inerts no són uns medis en els quals els microorganismes puguin créixer, però sí que, per exemple, l'aire és portador de partícules de pols i motetes microscòpiques d'aigua que poden portar associats microorganismes i aquests poden dipositar-se a les superfícies. Amb el desenvolupament de la microbiologia i donat que els microorganismes no són visibles a cop d'ull, es van haver de posar a punt tècniques per poder fer créixer i comptar aquests microorganismes. Això va ser possible amb el desenvolupament dels medis de cultius artificials. És a dir, un aliment sintètic que permetés el creixement dels microorganismes. Aquest medi pot ser líquid o sòlid i s'aconsegueix fer-lo sòlid amb l'addició de l'agar (extracte d'algues que a 100 °C és líquid i a 45 °C ja és sòlid). Així, quan un microorganisme es troba en un recipient de vidre o plàstic anomenat placa de Petri, aquest es comença a reproduir fins que l'anomenada colònia ja es fa visible a ull nu com es mostra, esquemàticament, a la figura 3. Per això, quan es fa el recompte de microorganismes, s'expressa en unitats formadores de colònies (ufc), ja que s'assumeix que cada colònia prové d'un microorganisme.

## OBJECTIU I HIPÒTESI DEL TREBALL

L'objectiu d'aquest treball consisteix en determinar la contaminació per microorganismes en l'aire i en superfícies de diferents ambients i, alhora, comparar els resultats que s'obtenen en els mateixos llocs en dos períodes estacionals diferents (primavera, estiu). Les hipòtesis inicials del treball són: 1) La contaminació ambiental (tant aèria com en superfícies) que es troba en l'exterior (espais oberts) és superior a les d'interior; 2) La contaminació fúngica serà més important que la contaminació bacteriana; 3) En espais tancats, quanta més gent o més moviment de gent hi hagi, també hi haurà més contaminació ; i 4) De les dues èpoques de mostreig hi haurà menys contaminació a l'estiu que a la primavera, degut que a l'estiu hi ha més irradiació solar i menys humitat a l'ambient.

## MATERIALS I MÈTODES

Per a la determinació de la contaminació de l'aire es va utilitzar la tècnica de la sedimentació (Parés, D. , 2005). S'exposa a l'ambient, durant un període de temps d'una hora, la superfície del medi de cultiu que es troba dins una placa de Petri. Els microorganismes que cauen en aquest medi poden originar colònies que es podran comptar després de la incubació a temperatura ambient durant 24

h per als bacteris i 72 h per als fongs. Els resultats s'expressen com a número de microorganismes viables de l'aire dipositats en la superfície (en metres quadrats) de la placa de cultiu per unitat de temps (temps d'exposició): ufc/m<sup>2</sup>h (Parés, D., 2005).

L'àrea total de les plaques de Petri utilitzades, que tenen un diàmetre de 9 cm, es calcula amb la fórmula:  $A = \pi r^2 = 3.1416 \times 4.5^2 = 63.674 \text{ cm}^2$ . Per poder donar els resultats en ufc/m<sup>2</sup>h, cal multiplicar les ufc de la placa per 157.2 (relació de si hagués estat exposada una placa d'1 m<sup>2</sup>; 10000 cm<sup>2</sup> / 63 cm<sup>2</sup>).

Per determinar la contaminació de superfície s'han utilitzat plaques de Petri del tipus RODAC (*Replicate Organism Direct Agar Contact*). Les plaques RODAC són Plaques de Petri especials (aprox. 25 cm<sup>2</sup> de superfície) que s'omplen amb 15-16,5 ml de medi de manera que l'agar formi un menisc i proporcioni una superfície convexa. Amb la placa invertida aconseguim que l'agar solidificat entri en contacte amb la superfície que volem mostrejar i els microorganismes dipositats en la superfície queden adherits al medi de cultiu. Al fons de les plaques de RODAC hi ha gravada una quadrícula amb divisions d'1 cm<sup>2</sup> per facilitar el recompte. L'àrea total de les plaques utilitzades es calcula tenint en compte que el diàmetre és de 5.5 cm amb la fórmula:  $A = \pi r^2 = 3.1416 \times 2.75^2 = 23.75 \text{ cm}^2$ . Però, donat que fa un menisc, es considera que la superfície total és de 25 cm<sup>2</sup>. Per tant el recompte de la placa s'haurà de dividir per 25 per poder donar els resultats en ufc/cm<sup>2</sup>.

En ambdós tipus de plaques es va utilitzar el medi SABORAUD (SAB) per fongs i llevats (que conté un antibiòtic per evitar el creixement de bacteris) i per al recompte de bacteris el medi de recompte en placa (PCA), on es va afegir un antifúngic per evitar el creixement de fongs i llevats. El medi SAB conté en grams per litre: dextrosa (40), Peptona de caseïna (5), digerit pancreàtic de teixit animal (5), agar bacteriològic (15) i 0.05 mil·ligrams per litre de l'antibiòtic cloramfenicol. El medi PCA conté en grams per litre: hidrolitzat enzimàtic de caseïna (5), extracte de llevat (2.5), dextrosa (1), agar (15) i l'antifúngic Actidione (0.05 mil·ligrams per litre).

Un cop barrejats tots els ingredients s'esterilitzaven per autoclau a una temperatura de 121 °C durant 20 minuts i un cop refredat a 50 °C abans que l'agar solidifiqués es dispensava el medi a les plaques corresponents.

Es van mostrejar diferents ambients durant el mes de juny i el mes d'agost del 2008, classificant els ambients en Oficials (ajuntament), Salut (dispensari i farmàcia), 3 Botigues, 2 bars, escolars (llar d'infants, escola de primària i institut de secundària), exteriors i interiors de cases privades. Els mostrejos es realitzaven al matí, migdia i tarda (si era possible). Algunes de les plaques es deixaven créixer més temps per tal de veure un bon desenvolupament de les colònies de microorganismes i poder realitzar fotografies i observacions al microscopi òptic (Olimpus BX50).

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

Després dels recomptes dels microorganismes de les plaques de Petri i les plaques RODAC, es van realitzar els càlculs descrits als materials i mètodes i es van representar les dades obtingudes en gràfics de barres. A la figura 4 es poden observar algunes fotografies al microscopi òptic, de bacteris, llevats i fongs així com fotografies de bacteris i de fongs. A partir d'aquestes dades dels resultats s'han obtingut unes taules resum dels recomptes de microorganismes en els diferents ambients, en els dos moments de mostreig i pels dos tipus de microorganismes. En aquestes taules s'han donat uns paràmetres qualitius referents a si en tots els llocs i moments del dia dels mostresjos s'han pogut fer recomptes (ocasionalment o sempre) i quantitius (valors aproximats al voltant dels recomptes realitzats). A la taula 1 es mostra la taula referent a les dades de la contaminació observada en l'aire.

Tipus d'ambient		Bacteris ufc/m <sup>2</sup> h		Fongs ufc/m <sup>2</sup> h	
		1r mostreig	2n mostreig	1r mostreig	2n mostreig
Oficials i Salut		Ocasionalment 10 <sup>2</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup>
Botigues i bars		Ocasionalment 10 <sup>2</sup>	Sempre 10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>
Escolars		Ocasionalment 10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>4</sup>
Escolars primària	WC	Ocasionalment 10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>4</sup>
Escolars secundària	WC	Ocasionalment 10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	nr	Sempre 10 <sup>4</sup>	nr
Exteriors		Sempre 10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup>
Interiors		Ocasionalment 10 <sup>3</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	Sempre 10 <sup>3</sup>

Nr= no realitzat

**Taula 1** Resum dels resultats obtinguts en aquest treball referents a les dades dels recomptes de la contaminació de l'aire. Quant als bacteris, hi ha diferències entre els dos mostrejos realitzats en el sentit que en el primer mostreig hi ha ambients (interiors, oficials i salut i botigues i bars) en què es detecten ocasionalment i amb valors al voltant de  $10^2$ - $10^3$  ufc/m<sup>2</sup>h mentre que en la resta d'ambients es detecten sempre. En canvi, en el segon mostreig, es detecten sempre i amb valors de  $10^3$ - $10^4$  ufc/m<sup>2</sup>h. Contràriament, sempre es detecten fongs i amb valors més elevats que de bacteris. A la figura 5 es mostren, esquemàticament, aquests resultats.

Si tenim en compte les hipòtesis inicials del treball, els resultats obtinguts en l'aire confirmen que la contaminació fúngica és més important que la bacteriana i, també, que en espais tancats quanta més gent i moviment hi ha més contaminació hi trobem. En canvi, no queden confirmades les hipòtesis que la contaminació ambiental de l'exterior és superior a la dels interiors i, molt menys, la que diu que a l'estiu (agost) hi hauria menys contaminació que a la primavera per l'efecte de la irradiació solar i la humitat.

Quant a la contaminació de les superfícies, els resultats es mostren a la taula 2 i la figura 6.

Tipus d'ambient		Bacteris ufc/m <sup>2</sup> h		Fongs ufc/m <sup>2</sup> h	
		1r mostreig	2n mostreig	1r mostreig	2n mostreig
Oficials i Salut		Pocs <1	Sempre ~2	Pocs <1	Sempre ~2
Botigues i bars		Ocasionalment 1-14*	Sempre 2-5	Sempre 1-7	Sempre 1-4
Escolars		Sempre 2-12*	Sempre 2-5	Sempre 1-3	Sempre 1-3
Escolars primària	WC	Sempre ~2	Sempre 2-8*	Sempre ~2	Sempre 2-8*
Escolars secundària	WC	Pocs <1	nr	Sempre 1-4*	nr
Exteriors		Sempre 2-6	Sempre ~2	Sempre 1-4	Sempre 1-3
Interiors		Sempre 1-3	Sempre 1-2	Sempre 2-4	Sempre 1-2

Nr= no realitzat; \* valors que són extrems i surten de la tònica general

**Taula 2** Resum dels resultats obtinguts en aquest treball referents a les dades dels recomptes de la contaminació de superfícies.

Com es pot observar en la taula i en la figura, els ambients menys contaminats són els ambients oficials i de salut, tant pel que fa als bacteris com pel que fa als fongs. També els interiors on no hi ha gaire moviment de gent. Això seria normal si pensem que són llocs nets i on el contacte de les mans amb les superfícies no és gaire normal. A continuació vindrien els bars i botigues (mostradors) i els escolars, on hi ha molt de moviment de gent i el contacte de les mans amb els mostradors i les taules són més habituals. Per tant, podríem dir que és el que podríem esperar si a més a més tenim en compte que la suor a la superfície de la pell ja és un bon ambient perquè hi sobrevisquin els microorganismes. Tot i això, sembla que hi ha més bacteris que no pas fongs i llevats. Això es podria explicar per la diferent mida d'aquests microorganismes, ja que la mida més gran de fongs i llevats, faria que aquests, amb una rentada superficial de les mans, puguin desaparèixer, mentre que els replecs de la pell mantenen més amagats els bacteris.

Tot i això, quant a les hipòtesis de treball els resultats en superfície són equivalents als que ja hem comentat per a l'aire, malgrat que aquí la contaminació fúngica no és més important que la bacteriana. Tampoc quedarien confirmades les hipòtesis referents a què la contaminació ambiental de l'exterior és superior a la dels interiors, i molt menys la que diu que a l'estiu (agost) és superior a la de la primavera (juny).

En resum, en aquest treball s'ha posat de manifest que els microorganismes estan presents a tot arreu i que les persones són una font de contaminació important ja que alliberen una gran quantitat de partícules quan es mouen, estossen, etc. i que aquestes partícules estan associades a la presència de microorganismes. Pel que fa a la metodologia que s'ha utilitzat per determinar els recomptes de microorganismes en l'aire, s'ha fet servir la tècnica de la sedimentació perquè és la que no requereix cap aparell per dur-la a terme. S'ha de tenir en compte que no hi ha cap normativa vigent respecte a la qualitat de l'aire i, per tant, no podem dir si és molt contaminat o no, i només podem fer referència a quin està més contaminat que l'altre. Segons Karwowska (2003) i Dacarro i col·laboradors (2003), la contaminació depèn de l'intercanvi d'aire que hi ha (ventilació), de la calefacció i de la humitat. En aquest treball no s'ha aprofundit sobre aquests aspectes i possiblement seria interessant agafar 3 aules i fer recomptes al llarg de l'any, posant diferents condicions d'airejament, etc.



Quant a la contaminació de superfícies no hem trobat treballs per compararlos, però sí que s'ha de destacar que és una tècnica molt utilitzada per determinar l'eficiència i freqüència dels processos i cicles de desinfecció en empreses de processat d'aliments (taulells, eines de treball...) i així poder establir la freqüència idònia en el seu programa de manteniment (Carrillo i col. 2004). Per tant, sí que hi ha escales per avaluar el procés de desinfecció, però en aquest treball precisament no es realitzava cap neteja prèvia de la superfície, perquè realment el que volíem determinar era la presència i quantitat dels microorganismes presents en les superfícies estudiades. Per tant, els resultats obtinguts sí que ens poden donar idea de quina és la quantitat de microorganismes que de manera "natural" es poden trobar, i ens ha permès determinar quins són els ambients on la seva presència és inferior. Destacar que, precisament, el fet que el contacte de les mans amb la superfície pot ser una aportació a la quantitat de microorganismes important, els valors trobats presenten molta variabilitat.

La conclusió general del treball és que la contaminació de l'aire i de les superfícies per part dels microorganismes (bacteris, llevats i fongs) es relaciona més amb la presència de persones en l'ambient mostrejat que no pas amb el tipus d'ambient (exterior/interior). No obstant, mentre que en la contaminació de l'aire quantitativament són semblants en els dos grups de microorganismes, en el cas de les superfícies és més importat la contaminació per part de bacteris.

## AGRAÏMENTS

Vull agrair a la UdG l'oportunitat d'haver pogut utilitzar el laboratori del Centre d'Innovació i Desenvolupament en Sanitat Vegetal (CIDSAV) durant la preparació de tot el material necessari per a la part pràctica del treball. Agrair, també, a tota la gent que m'han deixat accedir al seu local per a fer els mostrejos i agrair, d'una manera especial, a la meva tutora, la Maria Àngels, el seu interès constant. Finalment, també, a la meva mare pel seu suport incondicional.

**BIBLIOGRAFIA**

- Brock. *Microbiología de los Microorganismos*. 10<sup>a</sup> ed. (2003). M.T. Madigan, JM Martinko y J. Parker. Pearson/Prentice-Hall Iberia, Madrid.
- Carrillo, B.; González, M.; Schöbitz, R.; Molina, L.H. and Brito, C. (2004). Niveles de contaminación microbiológica en equipos de recepción y almacenamiento de leche, en Centros de acopio de la provincia de Valdivia. *AGROSUR* 32(2): 45-53.
- Dacarro, C.; Picco, A.M.; Grisol, P.; and Rodolfi, M. (2003) Determination of aerial contamination in scholastic sports environment. *Journal of applied microbiology*. 95: 904-912.
- Karwowska, E. (2003) Microbiological air contamination in Some educational settings. *Polish Journal of Environmental Studies*. Vol 12: 181-185.
- Parés, D. *Pràctica 5*. (2005). Control microbiològic de superfícies i ambients. *Guió de pràctiques d'Higiene dels Aliments*. *Ciència i Tecnologia dels Aliments*. Universitat de Girona.
- Pelczar, Michael, J. ; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R. *MICROBIOLOGY. CONCEPTS AND APPLICATIONS*. Editorial McGraw-Hill, INC. United States of America, 1993.