

REZUMAT

Teza de doctorat intitulată „*Aprecierea igienică a produselor lactate acide și a unor brânzeturi prin examene micologice și micotoxicologice*” este extinsă pe 264 de pagini și este structurată, în conformitate cu prevederile legale actuale, în două părți principale: partea I „*Stadiul actual al cunoașterii privind contaminarea cu muceți și micotoxine a produselor lactate*” cuprinde 62 pagini și reprezintă 26%, iar partea a II a „*Contribuții personale*” este extinsă pe 177 pagini, reprezentând 74%.

În prima parte, structurată în 4 capitole, sunt prezentate succint informații din literatura de specialitate referitoare la subiectul tezei, sinteze care au fost folosite ulterior pentru interpretarea și compararea datelor obținute în partea a doua. Această parte este ilustrată de 1 tabel și 17 figuri selectate ca fiind sugestive pentru a detalia informațiile sintetizate. Partea a II a este structurată în 6 capitole și cuprinde scopul și orientarea cercetărilor, materialul de studiu și metodele utilizate, rezultatele obținute și interpretarea lor, fiind ilustrată de 45 de figuri și 35 de tabele. Concluziile generale și bibliografia încheie această parte.

Cercetările ce au fost efectuate în cadrul acestei teze de doctorat au relevanță certă în domeniul micologiei și micotoxicologiei deoarece s-a urmărit dinamica contaminării cu muceți și micotoxine a produselor lactate, produse atât de des folosite în hrana omului dar mai ales în cea a copiilor.

Aceste elemente biotice pot afecta calitatea vieții, determinând stări grave de suferință cu procente ridicate de morbiditate și mortalitate. Rezultatele respective se pot constitui în argumente științifice pe care se va putea baza politica statului în direcția îmbunătățirii calității vieții populației, singura alternativă viabilă care asigură prosperitatea unei națiuni și o dinamică demografică normală.

Bolile produse de micotoxine, substanțe pe care fungii toxigeni le elaborează în mediu și care pot să ajungă în organismul omului și al animalelor sunt cunoscute sub numele generic de

micotxicoze. Evoluția lor clinică este gravă și de cele mai multe ori letală pentru că micotoxinele afectează ireversibil organele și țesuturile vitale. Micotoxinele nu pot fi distruse de antibiotice și nici de chimioterapice iar greutatea lor moleculară mică le împiedică să declanșeze *in vivo* sinteza de anticorpi, în consecință, folosirea produselor biologice - seruri și vaccinuri - în astfel de afecțiuni este iluzorie.

Studiile propuse și efectuate în această teză de doctorat au urmărit să stabilească intensitatea fenomenului de contaminare micotică și micotoxinică, iar prin identificarea punctelor critice de control se va putea preveni contaminarea produselor cu astfel de elemente nocive care pot pune în pericol sănătatea publică.

Pornind de la aceste considerente, principalele obiective ale tezei au fost:

- Aprecierea gradului de contaminare cu micromicete a produselor lactate acide și a unor brânzeturi prin examene micologice cantitative
- Izolarea, identificarea și încadrarea taxonomică a tulpinilor de micromicete prin examene micologice calitative.
- Aprecierea gradului de contaminare micotoxinică a produselor lactate prin investigații micotoxicologice.
- Identificarea și evaluarea cantitativă a aflatoxinei M1 prezentă în produsele lactate studiate prin metoda ELISA
- Introducerea într-un sistem HACCP funcțional a unui nou punct critic de control pe fluxul tehnologic al brânzei Emmental tip Schweitzer în unitățile de procesare a laptelui.

Activitatea științifică s-a desfășurat pe o perioadă de 4 ani, respectiv 1 octombrie 2005 până la 1 octombrie 2009, pe un număr de 225 produse lactate acide și unele brânzeturi reprezentate de: 25 probe de iaurt simplu, 25 probe de iaurt cu fructe, 25 probe de lapte bătut, sana și chefir, 25 probe de brânză proaspătă de vacă, 25 probe telemea de oaie și capră, 25 probe telemea de vacă și bivoliță, 25 probe de caș proaspăt de oaie, 25 probe de cașcaval și 25 probe de brânză cu mușegai. Cercetările au fost efectuate în cadrul laboratorului de Micologie și Micotoxicologie din cadrul Facultății de Medicină Veterinară Iași.

În urma examenului micologic cantitativ s-a constatat că din cele 225 probe de produse lactate supuse examenului micologic cantitativ 135 au fost contaminate micotic cu fungi levurici și fungi filamentoși, reprezentând un procent de 60 %, ceea ce înseamnă un procent destul de ridicat. Datorită faptului că multe dintre produsele contaminate depășeau cu mult limita legală

maxim admisă, se poate aprecia că aceste produse pot fi compromise din punct de vedere organoleptic, dar pot afecta de asemenea și siguranța alimentului pentru consumator.

În ceea ce privește contaminarea sortimentelor de produse lactate acide (iaurt simplu, iaurt cu fructe, lapte bătut, sana și chefir) se poate spune că din punct de vedere cantitativ acestea au prezentat o contaminare micotică destul de ridicată, cea mai mare cantitate de microorganisme fungice regăsindu-se la probele de iaurt cu fructe ($6,4 \times 10^5$ UFC/mL).

Contaminarea acestor produse s-a realizat probabil după procesul de pasteurizare, în următoarele etape ale procesului tehnologic, datorită nerespectării condițiilor de igienă. De asemenea o alta cauză datorită căreia s-ar putea produce contaminarea acestor produse ar putea fi lipsa de sterilizare a ambalajului, fie datorită nerespectării timpului necesar de decontaminare sau chiar defecțiunea lămpii ultraviolete cu care se realizează sterilizarea recipientilor de iaurt, Procentul mare de 52% din probele de iaurt cu fructe contaminate se poate datora și contaminării suplimentare prin adăugarea diferitelor sortimente de pulpă de fructe și a multitudinii de arome adăugate în rețetă.

Probele de brânză proaspătă de vacă au fost contaminate în procent de 48%, având o valoare maximă de contaminare de 2×10^7 UFC/g. Această contaminare cantitativă atât de ridicată a acestor probe poate fi pusă pe seama faptului că acesta este un produs proaspăt, ce nu conține substanțe conservante, dar și a nerespectării condițiilor de igienă din timpul procesului tehnologic, a depozitării în condiții neadecvate, nerespectarea parametrilor termici de conservare dar și datorită manipulărilor repetate

Deoarece contaminarea sortimentelor conservate prin saramurare a fost intensă fiind de $1,5 \times 10^6$ UFC/g în cazul brânzei telemea de capră și de oaie și de $5,8 \times 10^7$ UFC/g în cazul brânzei telemea de vacă și de bivoliță, putem emite ipoteza existenței probabile a două surse de contaminare: contaminarea soluției de conservare (a saramurii) prin nerespectarea condițiilor de igienă. În cazul brânzei telemea preparată din lapte pasteurizat, încărcătura micotică mare s-ar putea explica pe de o parte prin contaminarea secundară a materiei prime după pasteurizare și pe de altă parte prin condițiile improprii de comercializare (temperatură inadecvată, manipulare repetată, lipsa de igienizare a recipientilor de transport, a spațiilor de depozitare și comercializare).

Contaminarea masivă a cașului de oaie, produs fabricat tradițional și comercializat în piețele agro-alimentare, se poate datora preparării tradiționale fără pasteurizarea laptelui. Deoarece acest sortiment a fost contaminat în proporție de 100% cu o valoare maximă de $5,5 \times 10^7$ UFC/g, acest lucru indică abateri severe de la normele de igienă pe tot fluxul de

producție, începând cu mulsul și terminând cu depozitarea și comercializarea neigienică a produsului.

Probele de cașcaval și brânză cu mucegai au fost contaminate în proporție de 68% și respectiv 60%, valorile maxime de unități formatoare de colonii obținute în urma examenului micologic au fost de $5,1 \times 10^6$ pentru probele de cașcaval și de $9,6 \times 10^6$ pentru probele de brânză cu mucegai. Suprafața brânzei este considerată un foarte bun substrat pentru dezvoltarea fungilor, în plus, aceste produse sunt în majoritatea lor maturate în aer liber la o umiditate relativă ridicată. Deși pentru aceste tipuri de brânzeturi atât levurile cât și fungii filamentosi au un rol foarte important în procesul de maturare, în majoritatea cazurilor dezvoltarea acestora trebuie prevenită. Lăsând la o parte pierderile economice datorate alterării din cauza acestor microorganisme, prezența fungilor poate prezenta un interes considerabil pentru sănătatea umană datorită posibilității de formare a micotoxinelor, metaboliți fungici toxici.

Pe lângă posibilitățile de contaminare din timpul maturării această contaminare micotică semnificativă se datorează probabil și manipulărilor repetate, dat fiind faptul că majoritatea acestor probe au fost achiziționate din supermarket-uri în care aceste produse au fost recântărite și reambalate din calupuri mari, de către personalul supermarket-ului.

În concluzie, respectarea condițiilor de igienă pe tot fluxul de producție și comercializare în condiții salubre reprezintă soluția optimă ce garantează calitatea produsului și sănătatea consumatorului, chiar în cazul produselor preparate tradițional fără pasteurizarea materiei prime, deși această practică tinde să fie limitată sau chiar exclusă prin reglementările legislative europene.

Pentru identificarea micromicetilor evidențiați prin examenul micologic cantitativ și încadrarea lor taxonomică este necesară coroborarea aspectelor culturale ale coloniilor, cu particularitățile morfo-structurale microscopice și caracterele lor biochimice. Pentru aceasta s-au efectuat o serie de examene în scopul identificării.

În urma studierii încărcăturii micotice a produselor lactate acide și a unor brânzeturi s-au izolat 319 tulpini fungice și s-a constatat că flora micotică contaminantă a acestor produse aparține următoarelor genuri: *Candida* (64,1 %), *Penicillium* (32%), *Geotrichum* (14,1%), *Saccharomyces* (5,6%), *Trichosporon* (3,5%), , *Cryptococcus* (1,3%), *Rhodotorula* (0,9%) și *Mucor* (0,6%).

În urma examenului micologic calitativ se poate constata că cele mai frecvente tulpini izolate (64,1%) au fost cele aparținând genului *Candida*, fiind identificate 204 tulpini reprezentate de următoarele specii: 39 tulpini de *Candida kefyr*, 35 tulpini de *Candida sphaerica*, 29 tulpini de *Candida lipolytica*, 29 tulpini de *Candida famata*, 14 tulpini de *Candida*

intermedia, 12 tulpini de *Candida zeylanoides*, 7 tulpini de *Candida catenulata*, 7 tulpini de *Candida inconspicua*, 6 tulpini de *Candida lambica*, 6 tulpini de *Candida parapsilosis*, 4 tulpini de *Candida krusei*, 4 tulpini de *Candida colliculosa*, 4 tulpini de *Candida valida*, 3 tulpini de *Candida holmii*, 3 tulpini de *Candida norvegensis* și 2 tulpini de *Candida sake*.

Din genul *Geotrichum* au fost identificate 45 de tulpini (14,1%), 35 tulpini de *Geotrichum candidum* și 10 tulpini de *Geotrichum capitatum*, din genul *Penicillium* au fost identificate 32 de tulpini, dar la nivel de specie au fost identificate doar tulpinile folosite la culturile starter, respectiv 14 tulpini de *Penicillium camemberti* și 13 tulpini de *Penicillium roqueforti*, restul de 5 tulpini fiind identificate doar la nivel de gen.

Celelalte genuri au fost identificate într-o proporție mai mică, și anume genul *Saccharomyces* a fost identificat în 18 probe (5,6%) cu specia *Saccharomyces cerevisiae*, din cele 11 tulpini din genul *Trichosporon* (3,4%) au fost identificate 7 tulpini de *Trichosporon inkin* și 4 tulpini de *Trichosporon asahii*, 4 tulpini din genul *Cryptococcus* cu speciile *Cryptococcus curvatus* și *Cryptococcus laurentii*, 3 tulpini din genul *Rhodotorula* cu două tulpini din specia *Rhodotorula mucilaginosa* și o specie de *Rhodotorula rubra* și două tulpini din genul *Mucor*.

Printr-un exercițiu de exprimare sintetică a rezultatelor, se poate afirma cu certitudine că analizele micotoxice efectuate prin metoda ELISA competitivă care au interesat 150 probe de iaurt simplu, iaurt cu fructe, brânză de vacă, caș proaspăt de oaie, brânză telemea și brânză cu mușcăi au constituit un model experimental reușit, care oferă șanse obiective de interpretare a unui fenomen cu largi și grave implicații epidemiologice. Din cele 150 de probe luate în studiu, trei eșantioane, două reprezentând brânza de vaci și una brânza cu mușcăi, au fost considerate improprii consumului, conținutul lor în aflatoxina M1 depășind limita maximă admisă de standardele europene.

În pofida acestui fapt, aspectul cel mai grav pe care îl surprinde și îl evidențiază acest studiu este numărul foarte mare de probe contaminate micotoxic și care reprezintă 57,3% din totalul probelor analizate. Chiar dacă nivelul contaminării lor se situează sub cota maximă de admisibilitate ele oferă totuși, o imagine clară asupra calității materiilor prime folosite la fabricarea brânzeturilor și a iaurturilor, la modul de procesare al acestora și a condițiilor de transport, depozitare și comercializare. Aceste produse lactate care conțin aflatoxine trebuie considerate din punct de vedere epidemiologic ca factori POTENȚIALI DE RISC pentru persoanele vulnerabile imunologic, bătrânii, suferinzii de boli cronice și mai ales copiii.

De asemenea, trebuie luat în considerare și fenomenul de cumulare a micotoxinelor, la nivelul ficatului cel puțin, deoarece detoxifierea enzimatică a aflatoxinei B1, forma parentală a micotoxinei laptelui, AFM1, este un proces biochimic complex, care se desfășoară stadial, cu

participarea succesivă sau concomitentă a unui evantai larg de compuși enzimatici. Deci detoxifierea micotoxinelor în organism, respectiv în ficat, nu se produce instantaneu și atunci realimentarea organismului cu astfel de compuși toxici prin intermediul substanțelor nutritive contaminate chiar și cu doze foarte mici, poate genera prin cumul micotoxicoze cu evoluție cronică.

Rezultatele obținute printr-un studiu sistematic, care a interesat un număr variat de produse lactate demonstrează cu forța argumentelor științifice că aceste produse de origine animală pot reprezenta factori de risc pentru sănătatea celor care le consumă, iar un control mai riguros privind conținutul lor în micotoxine se impune a fi introdus cu necesitate și urgență, chiar și în piețele agro-alimentare tradiționale unde sunt comercializate aceste produse de către procesatorii particulari.

Implementarea sistemului HACCP a avut ca scop asigurarea calității și siguranței produsului finit în industria lactatelor, și a prezentat o remarcabilă îmbunătățire în ceea ce privește siguranța și calitatea produsului. Identificarea PCC-urilor în linia de producție a brânzei Emmental tip Schweitzer a determinat o restrângere satisfăcătoare a riscurilor, ducând astfel la obținerea de produse mai puțin defectuoase decât în trecut. Mai mult decât atât, unitatea de prelucrare a laptelui în care s-au efectuat cercetările și în care s-a implementat programul HACCP a reușit, de asemenea, să-și mărească cota pe piața, atât pe plan local cât și internațional, confirmând așadar importanța adoptării sistemului HACCP.