

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

"CERCETĂRI PRIVIND INVENTARIEREA MICROFLOREI BACTERIENE ȘI MICOTICE LA MELCII DE CONSUM ȘI SEMNIFICAȚIA EI SANITAR-VETERINARĂ"

Calitățile nutritive și dietetice deosebite ale cărnii de melc au dus la creșterea tot mai mare a consumului, în special în țări ca Franța, Italia și Spania, iar în ultimul timp și la noi în țară. Această creștere a consumului a determinat creșterea melcilor în ferme de helicultură, ferme în care dezvoltarea lor este controlată și dirijată în scopul obținerii de exemplare care pot fi valorificate pentru consumul uman. Cea mai mare parte a producției de melci din România este destinată exportului.

Pentru a obține produse corespunzătoare calitativ, trebuie îndeplinite o serie de criterii privind igiena și calitatea cărnii de melci și, de aceea, s-a impus abordarea unei teme de cercetare care să urmărească inventarierea microflorei acestui produs, precum și implicațiile sale sanitar-veterinare. Cercetarea aspectelor privind starea igienică a cărnii de melci s-a impus și prin faptul că în țară nu s-a fost făcută cercetări în acest sens până acum

Obiectivele cercetării sunt următoarele: investigarea noilor tehnologii de creștere și procesare a melcilor, efectuarea unor investigații privind organizarea internă a melcilor comestibili; investigații privind unele aspecte structurale și de compoziție a cărnii de melci; cercetarea și inventarierea microflorei micotice și bacteriene la melcii vii (de pe cochilie, de pe picior și din carne); identificarea genurilor și chiar a speciilor bacteriene, prin examene culturale, biochimice și alte teste; cercetări privind identificarea microflorei bacteriene potențial patogene pentru om (*L. monocytogenes*, *Salmonella spp*, *B. cereus*, *Yersinia spp*, *Clostridium spp*, *Pseudomonas spp*, etc); cercetarea și inventarierea microflorei micotice și bacteriene la produsele proaspete și la produsele alterate din carne de melc.

Materialul biologic a fost reprezentat de melci comestibili din două specii: *Helix pomatia* și *Helix aspersa*. Pentru realizarea investigațiilor s-au folosit melci maturi, recoltați din patru arealuri diferite: o grădină proprietate particulară din județul Iași, o pădure din apropierea orașului, precum și două ferme (o fermă de creștere a speciei *Helix pomatia* din județul Harghita și o fermă de creștere a speciei *Helix aspersa* din județul Vaslui).

În scopul identificării microflorei bacteriene și micotice au fost supuse examinării și trei

tipuri de produse din carne de melc: carne proaspăt congelată, carne congelată alterată și cârnați din carne de melc.

Prin complexitatea activităților propuse în proiectul de cercetare, metodele de lucru au fost histologice, fizico-chimice și microbiologice.

Locurile în care s-au desfășurat cercetările au fost următoarele: Facultatea de Medicină Veterinară Iași: în cadrul Laboratorului de Morfopatologie, în cadrul Laboratorului de Microbiologie, în cadrul Laboratorului de Controlul Alimentelor și în cadrul Laboratorului de Micologie; un laborator particular, în care au fost efectuate investigațiile fizico-chimice și o parte din investigațiile bacteriologice; Institutul de Sănătate Publică, în cadrul căruia au fost realizate identificările biochimice ale speciilor bacteriene izolate de la melci.

Cercetările au început cu investigarea unei noi tehnologii de creștere a melcilor autohtoni, *Helix pomatia*. Au fost vizitate în acest scop trei ferme și o fabrică de procesare din județul Brașov, ferme care practică metoda Teliu. Aceasta se caracterizează prin asigurarea unor condiții similare celor naturale în care cresc și se dezvoltă melcii și prin folosirea unor tehnici Bio.

Cercetările au continuat cu un studiu al structurii interne a melcilor din specia *Helix pomatia*, specie autohtonă. Aceste cercetări au reprezentat o pregătire pentru studiul structurii histologice a melcilor, pentru care este necesară cunoașterea exactă a morfologiei acestora.

În acest scop am efectuat disecții în urma cărora am observat alcătuirea melcului.

Disecția a pornit de pe partea ventrală a piciorului, de la nivelul gurii, mărginită de doi lobi bucali. Imediat după deschidere am putut observa placa cornoasă, faringele, sub forma unui bulb, și esofagul, cu glandele salivare. Aparatul digestiv se continuă cu stomacul și apoi cu intestinul, care este înconjurat de cel mai mare organ al melcului, hepatopancreasul, cu rol esențial în digestie. Intestinul se deschide la exterior prin orifiul anal.

La nivelul aparatului genital s-au observat următoarele părți constituente: cloacul genital, vaginul, spermoviductul, punga săgeții, glanda multifidă, oviductul, canalul deferent, receptaculul seminal, canalul hermafrodit, glanda albuminipară, penisul și flagelul.

După observarea celor două aparate majore, digestiv și genital, am detașat plămânul, care este o parte a mantalei mai groasă, musculoasă și foarte bine vascularizată. În regiunea sa postero-superioară se află inima, înconjurată de pericard, iar între inimă și canalul excretor se găsește unicul rinichi al melcului, numit și organul lui Bojanus.

După secționarea mantalei am putut observa mușchiul columelar, în care se reunesc toți mușchii retractori ai melcului.

În scopul identificării structurii cărnii de melc, am recoltat mostre de țesut de la melci din specia *Helix pomatia*. Mostrele au fost supuse unei analize histologice care a presupus următoarele etape: fixarea, includerea la parafină, secționarea și colorarea. Au fost utilizate trei

metode de colorare : Hematoxilină – Eozină – Albastru de Metil, Acid Periodic – Fuxină Schiff și Albastru Alcian.

Examenul histologic al piciorului, organul mobilității melcului, a relevat constituția sa musculară. Musculatura este dispusă sub formă de rețea de fibre musculare netede cu ochiuri largi reprezentate de sinusurile capilare hemocelice. Colorația Albastru Alcian și microscopul cu lumină polarizată au evidențiat prezența țesutului conjunctiv colagenic în zona de sub epitelul de suprafață. În zona tegumentului sau epitelului de acoperire se disting celule pline cu mucus, care se extind adânc în țesutul subepitelial, fiind înconjurată de celule musculare netede și țesut conjunctiv.

În ceea ce privește ovotestisul, acesta este constituit din 4 lobi, fiecare fiind reprezentat de un număr mai mare de acini sau foliculi separați de țesut conjunctiv lax interacinar. În interiorul acinilor se disting: celule germinale masculine ocupând lumenul acinilor, celule germinale femele inițial remarcate în peretele acinilor, celule foliculare și celule Sertoli. Canalul hermafrodit sau spermoviductul are în constituția sa un epiteliu cilindric pseudostratificat și o tunică de țesut conjunctiv lax. Canalul spermatic este constituit dintr-un epiteliu cilindric simplu, care formează mai mulți pli în interiorul lumenului. O tunică musculară cu fibre circulare și longitudinale delimitează spermoviductul. Penisul este un organ muscular cu fibre musculare dispuse circular, longitudinal, radial și oblic. Extern este delimitat de un epiteliu cilindric pseudostratificat ciliat. Oviductul este un conduct muscular în care se distinge o mucoasă formată din epiteliu prismatic simplu situat pe o membrană bazală. Celulele epitelului fiind celule ciliate și secretorii. Glanda albuminipară este o formațiune anexă importantă pentru protejerea ouălor, în alcătuirea parenchimului glandei distingându-se celule secretorii și celule labirintice orientate alternativ.

Structura histologică a mantalei reflectă funcțiile sale importante pentru melc. În alcătuirea sa s-au observat numeroase celule mari secretoare de mucus și depozitare ale acestuia, precum și depozite de calciu.

Pentru a determina conținutul în apă al cărnii, am folosit metoda clasică de uscare la etuvă. Determinarea substanțelor proteice s-a făcut în mod indirect, prin dozarea azotului total după metoda Kjeldahl. Pentru determinarea grăsimilor am utilizat metoda Soxhlet, iar pentru determinarea sărurilor minerale calcinarea uscată.

Scopul primelor analize a fost de a observa dacă există diferențe majore între compoziția melcilor activi recoltați din grădină, a celor recoltați din pădure și a celor recoltați din crescătorie. S-a observat că melcii din zona de pădure au un conținut în apă mai ridicat decât cei din zona de grădină. De asemenea, procentul de proteine precum și procentul de săruri minerale sunt mai mari în carnea melcilor de pădure. Pe de altă parte, procentul de grăsime este mai scăzut

în carnea melcilor de pădure față de melcii din grădină. Carnea cu valoarea nutritivă cea mai mare a fost cea a melcilor recoltați din crescătorii. Explicația constă în creșterea dirijată a acestor exemplare, în scopul obținerii unui produs de bună calitate, care să satisfacă cerințele consumatorilor.

În a doua etapă, s-a urmărit stabilirea compoziției cărnii melcilor aflați în hibernare, recoltați din cele trei zone, precum și compararea rezultatelor obținute. Se observă în cazul tuturor celor trei categorii de melci o scădere a procentului de apă, precum și un procent mai ridicat de proteine, grăsimi și săruri minerale în carnea melcilor aflați în hibernare, comparativ cu carnea melcilor aflați în perioada de activitate.

În scopul identificării încărcăturii micotice, s-au realizat din probele cercetate însămânțări pe mediul Sabouraud.

Pe mediul însămânțat cu probele recoltate de pe suprafețele cochiliilor am obținut o medie a unităților formatoare de colonii de 9 UFC/cm², iar pe baza examinării macroscopice și microscopice, au fost identificate 3 familii de micromiceți. Cel mai bine reprezentată a fost familia *Moniliaceae*, cu 3 genuri: *Aspergillus*, *Chrysosporium* și *Fusarium*. Din familia *Mucoraceae* au fost identificate două genuri: *Rhizopus* și *Mucor*, iar din familia *Dematiaceae* un singur gen, și anume *Alternaria*.

Genul predominant a fost *Aspergillus*, din cadrul căruia s-au identificat trei specii: *A. fumigatus*, *A. flavus* și *A. niger*. Dintre acestea, cel mai frecvent a fost izolat *Aspergillus fumigatus*.

Numărul mediu de unități formatoare de colonii izolate de pe suprafața piciorului a fost de 4 UFC/cm². Au fost identificate trei familii, respectiv 6 genuri micotice: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium* și *Fusarium*. Ca și în cazul cochiliei, a predominat familia *Moniliaceae*, cu trei genuri *Aspergillus*, *Penicillium* și *Fusarium*. Familia *Dematiaceae* a fost reprezentată de două genuri, *Alternaria* și *Cladosporium*, iar din cadrul familiei *Mucoraceae* a fost izolat genul *Mucor*. Ca și în cazul probelor recoltate de pe suprafața cochiliei, predominant a fost genul *Aspergillus*. Din cadrul acestui gen s-au identificat trei specii: *A. fumigatus*, *A. flavus* și *A. niger*. Dintre acestea, cel mai frecvent a fost izolat *A. fumigatus*, ca și în cazul probelor de pe cochilie. Din genul *Mucor* a fost identificată specia *Mucor racemosus*, iar din genul *Alternaria* specia *Alternaria alternata*.

Micoflora micotică din carne a fost urmărită atât în probe de carne proaspătă, cât și în probe de carne proaspăt congelată, de carne congelată alterată și de cârnați de melc alterați.

În cazul probelor de carne proaspătă, în majoritatea cazurilor s-a dezvoltat pe mediu o singură colonie, reprezentată de *Penicillium spp.* În 12 cazuri din 30 nu s-a dezvoltat nici o colonie, în timp ce din celelalte probe s-au identificat atât *Penicillium spp.* (predominant), cât și

Fusarium solani și *Alternaria alternata*. Nici în cazul probelor de carne proaspăt congelată nu s-a obținut nici o colonie pe mediul de cultură.

Pe mediile de cultură însămânțate cu diluții efectuate din probele de carne congelată alterată și din probele de cârnați alterați s-au dezvoltat între două și trei colonii, aparținând genurilor *Alternaria*, *Penicillium* și *Fusarium*. S-a observat faptul că genul *Penicillium*, izolat de pe suprafața piciorului, a fost izolat și din carnea melcilor, precum și din produse alterate.

În ceea ce privește analizele microbiologice, s-au urmărit într-o primă fază: izolarea și identificarea bacteriilor și micetilor de pe cochilia melcilor; izolarea și identificarea bacteriilor și micetilor de pe suprafața piciorului; izolarea și identificarea bacteriilor și micetilor din carne.

Protocolul de lucru a urmărit: recoltarea probelor; realizarea de diluții seriate; însămânțarea mediilor de cultură; realizarea de frotiuri; efectuarea testelor biochimice. Ansamblul rezultatelor arată variații mici ale profilului bacterian la cele trei categorii de melci (de grădină, de pădure și de crescătorie).

În ceea ce privește numărul total de germeni, acesta a atins cele mai mari valori în cazul probelor recoltate de pe suprafața cochiliilor tuturor celor trei categorii de melci (de livadă, de pădure și de crescătorie). Media obținută a fost între 54.4. și 70.9×10^6 UFC/cm², cea mai mică valoare aparținând probelor recoltate de la melcii de crescătorie *H. pomatia*, iar cea mai mare valoare aparținând probelor recoltate de la melcii de pădure.

Media numărului de UFC izolate de pe suprafața piciorului s-a situat între 45.1 și 62.9×10^6 /cm². Cel mai mic număr de UFC a fost izolat de la melcii de fermă *H. aspersa*, iar cel mai mare număr de UFC a fost izolat tot de la melcii de pădure.

Cele mai mici valori ale numărului de UFC s-au obținut în cazul probelor recoltate din carnea melcilor, cu o medie cuprinsă între 20.3×10^2 /g în cazul melcilor de crescătorie *H. aspersa* și 26.8×10^2 /g în cazul melcilor de pădure.

În ceea ce privește identificarea bacteriilor izolate, s-a observat predominanța unei flore bacteriene facultativ anaerobe, Gram negativă, aparținând familiei *Enterobacteriaceae*.

Această microfloră a variat în funcție de arealul melcilor, dar dominante și prezente la toate cele trei categorii de melci au fost genurile *Citrobacter*, *Morganella*, *Klebsiella* și *Enterobacter*. *Citrobacter braakii*, *Citro. freundii* și *Citro. koserii* au fost speciile predominante în cazul melcilor de pădure și al melcilor de crescătorie *H. pomatia*, în timp ce *Morganella morganii* a predominat la melcii de grădină.

Din genul *Enterobacter* au fost identificate două specii: *Ent. amnigenus* și *Ent. cloacae*, cel din urmă având o frecvență mai mare a izolării. *Klebsiella rhinoscleromatis* a fost izolată cu precădere din carnea melcilor de crescătorie *H. pomatia*, iar *Klebsiella pneumoniae* din carnea melcilor de crescătorie *Helix aspersa*.

În ceea ce privește celelalte specii din familia *Enterobacteriaceae*, acestea au avut o frecvență mai mică a izolării și au variat în funcție de arealul melcilor.

Pantoea spp și *Raoultella ornithinolytica* au fost izolate doar de la melcii de crescătorie *H. aspersa*. *Proteus penneri* și *E. coli* au fost izolate cel mai frecvent de la *H. aspersa*, în timp ce *Hafnia alvei* și *Providencia rettgeri* au fost izolate de la melcii de crescătorie *H. pomatia* și de la cei recoltați din pădure. *Yersinia enterocolitica* a fost izolată doar din carnea melcilor de fermă *H. pomatia*.

Familia *Pseudomonadaceae* a predominat în profilul bacterian al melcilor recoltați din grădină. Au fost izolate trei specii: *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseud. mendocina* și *Pseud. putida*.

În ceea ce privește populația bacteriană Gram pozitivă, aceasta a cuprins patru familii: *Listeriaceae*, *Aerococaceae*, *Staphylococcaceae* și *Enterococcaceae*.

S-a observat o predominanță clară a familiei *Listeriaceae*, izolată de la toate cele trei categorii de melci, atât de pe suprafața cochiliei, cât și de pe suprafața piciorului și din carne. Cel mai mare număr a fost izolat de pe suprafața cochiliei, iar dintre cele două specii prezente, *Listeria monocytogenes* și *Listeria innocua*, predominantă a fost *L. monocytogenes*. Aceasta are o importanță deosebită pentru sănătatea consumatorilor, fiind o specie patogenă pentru om, care determină una din cele mai grave toxiinfecții alimentare.

Din familia *Aerococaceae* a fost identificată o singură specie, *Aerococcus viridans*, izolat de pe cochilia melcilor de crescătorie *H. aspersa*.

Bacteriile din familia *Staphylococcaceae* au fost identificate doar la melcii de crescătorie *H. aspersa*, de la care s-au izolat trei specii: *Staphylococcus aureus*, *Staph. sciuri* și *Staph. warneri*.

Per ansamblu, s-a observat o predominanță a bacteriilor facultativ anaerobe, care se găsesc frecvent în sol și în apă, iar unele sunt chiar comensali ai intestinului omului și animalelor.

În ceea ce privește microflora bacteriană existentă în produsele din carne de melc, obiectivele urmărite au fost: determinarea microflorei aerobe mezofile; determinarea *E.coli*; izolarea și identificarea salmonelilor; izolarea și identificarea stafilococilor coagulazo-pozitivi; identificarea speciei *Bacillus cereus*; determinarea prezenței clostridiilor; determinarea altor specii patogene, ca *Listeria* și *Yersinia*.

Între cele două tipuri de carne, congelată și recongelată, nu s-au observat diferențe semnificative din punct de vedere al încărcăturii microbiene. Au fost identificate aceleași specii bacteriene, cu o singură excepție reprezentată de *Aeromonas hydrophila*, specie izolată doar din carnea recongelată. *Pseudomonas alcaligenes* și *Pseud. luteola*, *Pantoea*, *Escherichia coli*,

Enterobacter amnigenus și *Listeria monocytogenes* au fost prezente în toate probele.

În carnea de melc congelată și alterată au fost identificate următoarele bacterii: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoea spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus sciuri*, *Staph. capitis* și *Listeria monocytogenes*. Au fost absente genurile *Escherichia*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Clostridium* și *Yersinia*, precum și *Staph. aureus*.

Speciile bacteriene izolate din cârnații de melc alterați în experiment au fost: *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Ochrobactrum anthropi*, *Burkholderia cepacia*, *Kokuria cristinae*, *Aerococcus viridans*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus sciuri*, *capitis*, *cohnii* și *xylosus*, *Clostridium spp* și *Bacillus cereus*.

După cum se observă din rezultatele obținute, consumul de carne de melc nu este lipsit de riscuri majore pentru sănătatea consumatorilor. Principalul motiv de îngrijorare este dat de prezența *Listeriei monocytogenes* atât în carnea proaspătă, cât și în carnea congelată și în produsele alterate din carne de melc. De asemenea, o importanță deosebită o are menținerea *E. coli* și a *Pantoea spp.* în carnea de melc după congelare. În ceea ce privește produsele alterate, semnificativă este prezența genurilor *Bacillus* și *Clostridium*, care produc infecții și toxiinfecții grave la om.