

REZUMAT

Teza de doctorat cuprinde 300 pagini din care prima parte (stadiul cunoașterii) extinsă pe 76 de pagini reprezintă aproximativ o treime, iar cercetările proprii acoperă 224 de pagini, reprezentând două treimi.

Lucrarea debutează cu primul capitol din cele patru ale părții generale și anume "Diagrama fluxului tehnologic în unități de procesare a cărnii". Este o succintă trecere în revistă a principalelor momente ce caracterizează tehnologia procesării cărnii, din momentul sacrificării animalelor și până la ambalarea și expedierea produsului finit reprezentat de carcace ambalate în pungi din plastic sau piept și pulpe în casolete în cazul cărnii de pasăre, sau carcace, semicarcace, sferturi, dacă ne referim la carnea de bovine – suine.

Capitolul al II – lea intitulat "Surse de contaminare ale produselor alimentare de origine animală" exprimă, prin prisma bibliografiei consultate, esența unei strategii manageriale originale prin care se asigură calitatea și siguranța produselor alimentare, începând cu materia primă și până la produsul finit. Ea este aplicată în producție sub numele de "Metoda celor 5M" și include ca elemente potențial contaminante ale fluxului tehnologic: "Materia primă, Materialele, Mâna de lucru, Mediul ambiant și Metoda de procesare".

Sanitația în industria agroalimentară nu mai reprezintă o etapă izolată, aleatorie pe fluxul tehnologic; ea se integrează plener și armonios în procesul general de prelucrare a materiei prime și de obținere a unui produs final de calitate. Complexele operațiuni de sanitație includ factori de biosecuritate, care interesează toate elementele tehnologice din incinta spațiilor de producție și care împreună concură la realizarea unor bunuri alimentare valoroase, având ca parametru esențial de evaluare și de referință markerul microbiologic. Această modalitate modernă de abordare a tehnologiei, într-o viziune integrativă, operațională, răspunde dezideratelor impuse de noul program de Analiză a Punctelor Critice de Control (HACCP), care asigură monitorizarea permanentă a elementelor și etapelor cu risc epidemiologic major. Mijloacele și tehnicile decontaminante utilizate în industria alimentară prezentate în capitolul al III – lea se

bucură de un expozeu de excepție, deoarece problematica abordată este deosebit de abundentă în date, multe dintre ele originale sau de ultimă generație. Ceea ce surprinde în mod plăcut este clarviziunea cu care au fost surprinse și tratate unele fenomene sau evenimente biologice până la nivelul unor detalii de mare finețe și rafinament. Tehnicile de decontaminare folosite în unitățile de industrializare a cărnii, etapele decontaminării, măsurile de biosecuritate în funcție de cei 5M sunt câteva elemente care pot servi ca argumente în sprijinul aserțiunii făcute. Un subcapitol interesant, de mare valoare teoretică și practică, se referă la "Factorii care pot influența eficiența măsurilor de sanitație" în care, sunt aduse în discuție ca elemente de risc biofilmele uni, bi sau tridimensionale. Aceste modele inedite de organizare a microorganismelor explică marea lor rezistență la diversitatea factorilor nocivi, natura și concentrația substanțelor decontaminante alese în funcție de particularitățile ecofiziologice, precum și condițiile ambientale în care se desfășoară acest conflict dintre agenții microbieni pe de o parte și mijloacele decontaminante pe de altă parte.

În capitolul al IV – lea "Considerații generale asupra sistemului HACCP" sunt discutate succint principiile, etapele și riscurile ce pot apărea în procesul de industrializare a cărnii și care reprezintă elementele fundamentale ale sistemului HACCP, ca mijloc eficient de prevenire și combatere a bolilor cu sorginte alimentară. Acest sistem preventiv de control urmărește identificarea punctelor critice în care produsul poate suferi deprecieri, remediarea lor prin măsuri corective adecvate și monitorizarea limitelor maxime stabilite în fiecare punct critic de control.

Partea a II – a "Cercetări proprii", cuprinde patru capitole, concluziile generale și bibliografia, în care sunt prezentate și discutate rezultatele investigațiilor întreprinse.

Capitolul al V – lea "Izolarea, identificarea și încadrarea taxonomică a unor grupe de microorganisme din două unități de procesare a cărnii", a încercat să evalueze printr-un screening microbiologic gradul de contaminare cu bacterii și micromiceți a aerului și a suprafețelor din spațiile de procesare a cărnii. În unitatea de industrializare a cărnii de bovine – suine "AB", nivelul cel mai ridicat de contaminare microbiologică a aerului a fost evidențiat în sala de sacrificare, unde numărul celulelor bacteriene a depășit de 750 de ori limitele maxim admise prin standardele în vigoare, iar cel al micromiceților de 260 de ori.

Flora bacteriană izolată de la nivelul suprafețelor s-a caracterizat printr-un polimorfism extrem de accentuat, motiv pentru care au fost aleși ca markeri biologici igienico – sanitari cu potențial patogen bacteriile aparținând genurilor *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia* și *Salomonella*. Din 24 probe prelevate de la nivelul suprafețelor (pardoseală, tegumentul mâinilor operatorilor, mijloace tehnologice), 18 au fost contaminate cu germeni din genul *Staphylococcus* (75%), 22 cu microorganisme încadrate taxonomic în genul *Enterococcus* (91,2%), iar în 21 de probe au fost evidențiate microorganisme din genul *Escherichia* (83,3%). Germenii cu potențial patogen prezenți pe suprafețele mijloacelor tehnologice (mașini de tocat, cuter, malaxor) reprezintă elemente de risc major deoarece ei pot fi transferați în carnea folosită ca materie primă la prepararea unor produse ce se comercializează în stare crudă punând astfel în pericol sănătatea omului.

Contaminarea microbiană a sălilor de producție din spațiul tehnologic de procesare a cărnii de pasăre "AP", apreciată prin examene microbiologice cantitative și calitative, a evidențiat diferențe mari, în funcție de sursele infectante și particularitățile fluxului tehnologic. Microaeroflora a înregistrat valorile cele mai ridicate în spațiul de deplumare, unde numărul bacteriilor a atins cote de $322.240/m^3$, depășind de 537 de ori limita maxim admisă, iar numărul micromicetilor a fost de $226.877/m^3$, deci de 750 de ori mai mult decât este admis.

Suprafețele din spațiul de procesare a cărnii de pasăre (pardoseală, mese de lucru, utilaje) dar și tegumentul mâinilor muncitorilor, au prezentat un grad alarmant de contaminare; din cele 25 de probe analizate 19 (76%) au fost contaminate cu germeni aparținând genurilor *Staphylococcus* și *Escherichia*, 20 (80%) au răspuns pozitiv la testele de identificare a germenilor din genul *Enterococcus*, iar 13 (52%) au fost contaminate cu *Salmonella*.

Incidența bolilor enterice la om consecutiv consumului de alimente infectate cu germeni patogeni de sorginte intestinală este destul de ridicată, chiar și în țările dezvoltate. Bryan și Doyle (1995) au arătat că prevalența germenilor din genul *Salmonella* pe carcasele de pasăre variază între 2% și 100%, cu o medie îngrijorătoare de 30%, așa cum se întâlnește și în cazul microorganismelor termofile încadrate taxonomic în genul *Campylobacter* (3% până la 100%).

Bovinele reprezintă un important rezervor de *Escherichia coli* O₁₅₇H₇, iar carnea provenită de la aceste animale purtătoare, precum și laptele sau alte produse alimentare susceptibile a fi contaminate cu fecale au fost incriminate în apariția multor episoade de toxiiinfecții alimentare colective (TIAC). Carnea ca materie primă poate constitui o sursă importantă de contaminare a produselor obținute prin procesarea acesteia, deoarece ea se poate infecta continuu, dacă procedeele de sanitație din unități de industrializare a cărnii sunt superficial sau greșit efectuate.

Cercetările efectuate în două unități de industrializare a cărnii de pasăre, respectiv de bovine-suine, care au urmărit gradul de contaminare cu bacterii și micromiceți a aerului și a suprafețelor din spațiile de producție consecutiv operațiunilor de sanitație au demonstrat că soluția de hidroxid de sodiu în concentrație de 3% a fost inefficientă, deoarece încărcătura microbiană a aerului a fost redusă într-o proporție foarte mică, iar pe suprafețele testate au fost evidențiați aproape constant germeni aparținând genurilor *Staphylococcus*, *Enterococcus* și *Escherichia*. Substanțele decontaminante complexe, Virocid 2,5‰ și Virkon'S 1%, au exercitat un efect cid mult mai pronunțat, gradul de contaminare a aerului cu bacterii și micromiceți a fost redus în proporție de 82,2% și 99,6%, iar pe suprafețele de lucru germeni cu semnificație patogenă au fost semnalati doar ca excepții. Este necesar să subliniem un aspect de mare importanță practică și anume faptul că, un reper al fluxului tehnologic, care intră în contact direct și repetat cu materia primă, conveierul, a fost contaminat constant cu microorganisme patogene reprezentând o sursă permanentă de contaminare a cărnii.

Microorganismele rezistente la antibiotice, în mod deosebit la cele β -lactamice, manifestă rezistență crescută și la antiseptice și decontaminante, în special la acțiunea clorurii de benzalconiu. Testând sensibilitatea la antibiotice a 94 de tulpini izolate din unități de procesare a cărnii, dintre care 27 încadrate în genul *Escherichia*, 33 aparținătoare genului *Enterococcus* și 34 din genul *Staphylococcus*, s-a constatat că acestea manifestă o rezistență crescută la antibiotice cu limite cuprinse între 70,5% și 100%. Tulpinile de enterococi care au fost rezistente la vancomicină (31) au etalat o rezistență similară și la șocul termic, respectiv tratamentul cu acizi organici. Importanța practică a acestor observații rezidă în faptul că, în industria alimentară există un portaj constant de tulpini de *Escherichia* cu rezistență multiplă la antibiotice, inclusiv la cele β -

lactamice, fenomen datorat linkajului dintre genele care codifică β -lactamazele cu spectru extins și genele care conferă rezistență la alte antibiotice. Aceste tulpini ajungând în organismul omului pot provoca entități morbide al căror tratament cu antibiotice este inefficient.

În numeroase țări se încearcă reducerea încărcăturii microbiene a carcaselor, fie prin spălarea lor cu jet de apă sub presiune, fie prin imersionarea acestora în bazine cu apă la temperatura de 80°C și în soluții acide; rezultatele nu satisfac însă pe deplin exigențele epidemiologice și nu totdeauna justifică eforturile financiare.

În capitolul al VII – lea sunt prezentate rezultatele unor investigații ample care au urmărit capacitatea reactivă a 7 tulpini microbiene de colecție ATCC și a 47 tulpini "de teren", izolate din unități de prelucrare a cărnii, la acțiunea solitară sau asociată a temperaturii și a unor acizi organici (lactic, acetic și citric) astfel încât, acest tratament fizico – chimic să poată fi introdus în operațiunile de igienizare a carcaselor. Reacția celulelor tipizate de laborator la acțiunea solitară a șocului termic a fost diferită în funcție de valoarea acestuia, timpul de contact și de natura agentului antimicrobian, respectiv compoziția chimică și particularitățile morfo-structurale parietale ale celulei. Gradientul de temperatură cu valori de 52°C a redus foarte puțin numărul unităților formatoare de colonii, care s-a menținut constant la valori mai mari de 100.000/ml, în timp ce șocul termic de 55°C, respectiv 60°C a divizat sușele testate în două grupe, unele rezistente (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), caracterizate printr-o reducere logaritmică slabă, ce nu a depășit 3 log₁₀, altele sensibile (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833, *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Candida albicans* ATCC 10231) deoarece după 3 – 5 minute de contact reducția unităților formatoare de colonii a fost de 4 – 6 log₁₀. Cea mai sensibilă la acțiunea temperaturii ridicate s-a dovedit a fi *Candida albicans*, iar cea mai rezistentă *Enterococcus faecalis*.

Un alt element extrem de important care condiționează multiplicarea microorganismelor este pH – ul mediului, care spre deosebire de temperatură permite o deschidere mai amplă a curbei de dezvoltare, microorganismele acceptând limite mai largi de variație a pH-ului de la 3,8 până la 11,0. Acizii organici sunt considerați în general mai eficienți împotriva microorganismelor patogene implicate în boli de origine

alimentară, comparativ cu acizii anorganici ; luând drept model experiența altor țări dezvoltate, în studiile efectuate a fost urmărită acțiunea acizilor lactic și acetic în concentrații diferite de 0,5%, respectiv 1% asupra tulpinilor microbiene tipizate ATCC.

Acidul acetic în concentrațiile amintite a manifestat un efect cid mai puțin pronunțat față de bacteriile Gram pozitive și fungii levuriformi, cel mai rezistent dovedindu-se a fi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a cărei populație de celule nu a fost afectată de acidul respectiv, indiferent de concentrația și de timpul de contact. În mod surprinzător cea mai sensibilă tulpină la acțiunea acidului a fost *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, recunoscută în literatura de specialitate ca fiind deosebit de rezistentă la acțiunea nocivă a agenților chimici.

Acidul lactic este un agent organic folosit frecvent în industria de procesare a cărnii, acțiunea sa antimicrobiană fiind deosebit de severă, fapt atestat și de rezultatele investigațiilor întreprinse de noi pe tulpinile de laborator. Germenii Gram pozitivi (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) dar și tulpina *Candida albicans* ATCC 10231 au etalat o sensibilitate oarecum moderată la acțiunea acidului lactic, numărul unităților formatoare de colonii fiind redus cu 4 – 5 log₁₀ când concentrația a fost de 0,5% și cu 5 log₁₀ când concentrația a fost de 1% ; la bacteriile Gram negative reducția logaritmică a coborât frecvent în domeniul ce caracterizează efectul sterilizant.

Acțiunea antimicrobiană a acidului acetic glacial 1% a fost serios potențată de gradientul de temperatură, fenomen care a interesat deopotrivă germenii Gram pozitivi și Gram negativi. Populația celulelor microbiene Gram pozitive a fost redusă cu 4 – 5 log₁₀, indiferent de valoarea temperaturii și timpul de contact, iar germenii Gram negativi au dovedit o vulnerabilitate mai mare, reducția logaritmică fiind echivalentă cu efectul sterilizant. În modelul experimental în care concentrația acidului acetic glacial a fost 0,5%, fenomenul biologic s-a repetat aproape identic, dar cu valori mai ridicate.

Acidul lactic în concentrații de 0,5% - 1% în asociere cu temperatura de 52°C, 55°C și 60°C a exercitat asupra microorganismelor testate efect cid remarcabil, superior acidului acetic glacial, dar cu diferența clare în funcție de afinitățile tinctoriale ale celulelor. Bacteriile Gram negative aparținând speciei *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 și *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13833, s-au

dovedit extrem de sensibile, ele fiind distruse în totalitate indiferent de valoarea șocului termic și timpul de contact. Bacteriile Gram pozitive au demonstrat un anumit grad de tolerabilitate, dar numai la valori mici ale temperaturii (52°C respectiv 55°C) și exclusiv în intervalul de timp de 1 – 3 minute.

Investigațiile întreprinse, prin rezultatele obținute, s-au dovedit necesare și utile, dar nu și suficient pentru atingerea obiectivului propus. Ele ne-au permis să stabilim că genurile *Staphylococcus*, *Enterococcus* și *Escherichia* au fost cele mai rezistente la acțiunea acestor factori nocivi și din această cauză aria cercetărilor a fost extinsă și a interesat 47 tulpini "de teren" (15 de stafilococi, 16 de *Escherichia* și 16 de enterococi). Tulpinile "de teren" au fost rezistente la acțiunea temperaturii de 52°C, indiferent de timpul de acțiune. Socul termic de 55°C – 60°C a diferențiat sușele testate în funcție de apartenența taxonomică, reactivitatea individuală și timpul de contact. Germenii Gram pozitivi s-au dovedit mai rezistenți, dintre aceștia detașându-se cei din genul *Enterococcus*, care au și fost aleși ca markeri biologici în realizarea unui punct critic de control pe fluxul tehnologic al cărnii de pasăre.

Testarea capacității antimicrobiene a acizilor organici pe tulpinile "de teren" a demonstrat că acidul lactic se detașează prin acțiunea sa mai puternică de ceilalți acizi, acetic respectiv citric, iar sensibilitatea tulpinilor bacteriene nu a fost uniformă, ci dimpotrivă s-a caracterizat printr-o heterogenitate pronunțată.

Taxonii de teren aparținând genurilor *Enterococcus*, *Staphylococcus* și *Escherichia* au etalat o capacitate reactivă diferită la acțiunea concomitentă a temperaturii (52°C, 55°C, 60°C) și a acizilor organici (lactic și acetic) în concentrație de 1% și 0,5% aceasta fiind dependentă de natura agentului, de compoziția și concentrația acidului, dar și de valoarea temperaturii și a timpului de contact. Rezultatele investigațiilor au demonstrat că germenii din genul *Escherichia* au fost cei mai sensibili, iar enterococii cei mai rezistenți, în timp ce bacteriile din genul *Staphylococcus* au etalat capacitate reactivă intermediară.

În capitolul al VIII – lea au fost efectuate investigații prin care s-a urmărit implementarea sistemului HACCP într-o unitate de procesare a cărnii de pasăre, urmărind fidel fluxul tehnologic de-a lungul celor 14 etape ce caracterizează acest modern sistem de supraveghere și control. Rezultatele obținute ne-au permis să identificăm cinci puncte

critice cu risc major de contaminare a materiei prime, dintre care a fost selectat doar bazinul de opărire, care a fost transformat în punct critic de control, prin introducerea a două elemente corective : temperatura, respectiv acidul lactic. Limitele de variație stabilite pe 7 tulpini tipizate de colecție și 47 de sușe "de teren" pentru cei doi factori au fost de 57°C – 59°C în cazul temperaturii și 0,5% - 1% pentru acidul lactic. Monitorizarea punctului critic de control prin intermediul celor două elemente se poate realiza prin senzori electronici instalați în bazinul de opărire cu avertizoare optice și sonore.