

UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI

Cu titlul de manuscris
C.Z.U.: 664:579.6:[613.2:614.3](043)

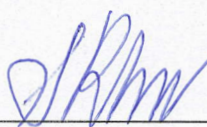
COJOCARI DANIELA

ACȚIUNEA MICROBIOSTATICĂ A UNOR EXTRACTE VEGETALE DE
COMPUȘI FENOLICI ASUPRA MICROORGANISMELOR
RESPONSABILE DE ALTERAREA ALIMENTELOR

253.06 - Tehnologii biologice și chimice în industria alimentară

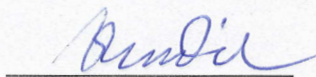
Teză de doctor în științe inginerești

Conducător științific:



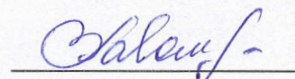
STURZA Rodica
dr. hab, prof. univ., m.c.
AȘM

Consultant științific

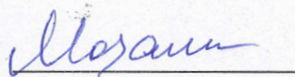


RUDIC Valeriu
dr. hab, prof. univ.

Comisia de îndrumare



BALAN Greta
dr. hab, conf. univ.




GHENDOV-MOȘANU
Aliona, dr. hab, conf. univ.



MACARI Artur
dr., conf. univ.

Autor:



COJOCARI Daniela

CHIȘINĂU, 2024

CUPRINS

ADNOTARE	4
LISTA TABELELOR	7
LISTA FIGURILOR	9
LISTA ABREVIERILOR	10
INTRODUCERE	11
1. COMPUȘI BIOLOGICI CU ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ – SURSĂ PROMIȚĂTOARE PENTRU DIMINUAREA CONTAMINĂRII ALIMENTELOR ȘI REDUCEREA REZISTENȚEI MICROORGANISMELOR LA ANTIBIOTICE	19
1.1 Problema maladiilor transmisibile prin alimente	19
1.2 Agenți etiologici implicați în bolile alimentare	21
1.3 Epidemiologia bolilor alimentare	23
1.4 Criza rezistenței la antibiotice	29
1.4.1 Abuzarea excesivă a antibioticelor în agricultură	35
1.4.2 Alimentele vehicul pentru răspândirea bacteriilor rezistente la antimicrobiene	37
1.4.3 Fenomenul de rezistență antimicrobiană	41
1.5 Compuși antimicrobieni naturali	44
1.5.1 Plantele, surse naturale împotriva agenților responsabili de alterarea alimentelor	44
1.5.2 Componente active ale extractelor din plante	47
1.6 Concluzii la capitolul 1	49
2. MATERIALE ȘI METODE	51
2.1 Materiale de cercetare	51
2.2 Caracteristica culturilor microbiene utilizate	52
2.3 Reagenți chimici și materiale auxiliare	55
2.4 Tehnologii de fabricare a produselor alimentare	56
2.4.1 Pregătirea plantelor și extractelor	56
2.4.2 Microincapsularea extractelor	56
2.4.3 Prepararea produselor din carne cu adaosuri vegetale	56
2.4.4 Prepararea cremei de brânză cu extract de busuioc microîncapsulat	57
2.4.5 Prepararea înghețatei cu adaosuri vegetale	57
2.5 Metode de cercetare	58
2.6 Caracteristica metodelor microbiologice utilizate pentru testări <i>in vitro</i>	60
2.7 Metode de testare <i>in situ</i> a efectului antibacterian al pudrelor și extractelor vegetale	65
2.8 Modelarea matematică	65
2.9 Analiza statistică a rezultatelor	66
2.10 Concluzii la capitolul 2	66
3. EFECTUL ANTIMICROBIAN AL PREPARATELOR DE ORIGINE NATURALĂ	68

3.1	Determinarea activității antimicrobiene a pudrelor vegetale prin metoda godeurilor	68
3.1.1	<i>Efectul antimicrobian a diferitor soiuri de cătină, determinat prin metoda godeurilor</i>	71
3.1.2	<i>Rezistența în timp a activității antimicrobiene a pulberilor vegetale</i>	73
3.1.3	<i>Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale și extractelor de busuioc, cimbru și rozmarin asupra microorganismelor patogene</i>	78
3.1.4	<i>Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale asupra L. monocytogenes ATCC 19118, L. monocytogenes EGDe (godeuri)</i>	79
3.2	Determinarea concentrațiilor minime inhibitoare a pulberilor vegetale	82
3.2.1	<i>Determinarea CMI și CMB ale pulberilor vegetale prin metoda diluțiilor succesive în medii lichide</i>	83
3.2.2	<i>Determinarea concentrațiilor minime inhibitorii ale pulberilor vegetale (în timp) prin metoda microdiluțiilor</i>	85
3.2.3	<i>Determinarea CMI și CMB a extractelor din busuioc, cimbru, rozmarin</i>	86
3.2.4	<i>Determinarea concentrațiilor minime de inhibiție a pulberilor vegetale asupra L. monocytogenes ATCC 19118</i>	87
3.2.5	<i>Determinarea concentrațiilor minime de inhibiție a pulberilor vegetale asupra L. monocytogenes EGDe</i>	89
3.3	Activitatea antimicrobiană și antioxidantă a extractelor – mecanisme de interacțiune	91
3.3.1	<i>Compoziția extractelor din tescovină de struguri și fructe de pădure</i>	91
3.3.2	<i>Compoziția și activitatea antioxidantă a extractelor de busuioc</i>	92
3.3.3	<i>Activitatea antioxidantă a extractelor de fructe de pădure și tescovină de struguri</i>	94
3.3.4	<i>Mecanisme de inhibare a activității antioxidante și antimicrobiene</i>	96
3.4	Concluzii la capitolul 3	103
4.	ANALIZA IN SITU A ACȚIUNII MICROBIOSTATICE ȘI MICROBICIDE A UNOR EXTRACTE ȘI PUDRE VEGETALE	106
4.1	Evaluarea <i>in situ</i> a acțiunii antimicrobiene a extractelor și pudrelor de fructe de pădure în produse din carne	106
4.2	Analiza microbiologică a crenvurștilor cu adaos de busuioc, cimbru, tarhon	112
4.3	Evaluarea <i>in situ</i> a acțiunii antimicrobiene a unor extracte și pudre vegetale în crema de brânză	117
4.4	Efectul extractului de busuioc microîncapsulat asupra calității și stabilității cremei de brânză	121
4.5	Evaluarea <i>in situ</i> a acțiunii antimicrobiene a unor extracte și pudre vegetale în înghețată	130
4.6	Concluzii la capitolul 4	134
	CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	137
	BIBLIOGRAFIE	141
	ANEXE	159
	DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	162
	CURRICULUM VITAE	163

ADNOTARE

Cojocari Daniela: „Acțiunea microbiostatică a unor extracte vegetale de compuși fenolici asupra microorganismelor responsabile de alterarea alimentelor”, teza de doctor în științe ingineresti, Chișinău, 2024.

Structura tezei: Introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografia din 236 de titluri, 3 anexe, 130 pagini de text de bază, inclusiv 30 figuri și 35 de tabele. Rezultatele obținute sunt publicate în 37 lucrări științifice.

Cuvintele-cheie: activitate antimicrobiană, pudre și extracte, fructe de pădure, plante aromatice, compuși biologici activi, antioxidanți, aditivi alimentari.

Scopul cercetării constă în evaluarea acțiunii microbiostatice a pudrelor și extractelor vegetale din fructe de pădure și condimente asupra microorganismelor responsabile de alterarea alimentelor *in vitro* și *in vivo*, pe diferite categorii de alimente procesate.

Obiectivele cercetării: Determinarea *in vitro* a efectului microbiostatic și microbicid la contactul direct a unor fracții vegetale bogate în compuși fenolici asupra microorganismelor ce cauzează alterarea produselor alimentare; stabilirea *in situ* a efectului microbiostatic a unor fracții vegetale bogate în compuși fenolici pe matrici de produse din carne și mezeluri; stabilirea *in situ* a efectului microbiostatic a unor fracții vegetale bogate în compuși fenolici pe diferite matrici de produse lactate; caracterizarea compoziției compușilor bioactivi și a proprietăților lor antioxidante; analiza proprietăților fizico-chimice, senzoriale și morfologice ale cremei de brânză cu extract încapsulat.

Noutatea și originalitatea științifică: Pentru prima dată, pe baza unui studiu amplu, a fost evaluată acțiunea antimicrobiană a extractelor vegetale bogate în polifenoli asupra tulpinelor de referință. S-a determinat efectul microbiostatic și microbicid al acestor extracte *in situ*, pe diverse matrici alimentare. Au fost estimate compoziția, activitatea antioxidantă și mecanismele posibile de acțiune a extractelor.

Problema științifică soluționată: A fost testată activitatea antimicrobiană a unor extracte vegetale asupra microorganismelor responsabile de alterarea alimentelor *in vitro*. Au fost estimată acțiunea antioxidantă a extractelor vegetale. Acest fapt contribuie la elaborarea unor strategii antiinfecțioase alternative, în scop de a diminua utilizarea aditivilor sintetici și dezvoltarea rezistenței la antimicrobiene.

Semnificația teoretică: Au fost acumulate informații despre activitatea unor preparate (extracte, pudre) vegetale asupra tulpinilor de referință. A fost determinat efectul microbiostatic pe diverse matrici alimentare. Au fost adunate date despre influența acestor extracte asupra prelungirii fazei lag în dezvoltarea bacteriilor.

Valoarea aplicativă: A fost propus și realizat procedeul de fabricare a înghețatei în baza căruia s-a obținut un brevet de invenție.

Implementarea rezultatelor științifice: Conform actului de implementare din 3 septembrie 2021, la întreprinderea SRL Mellang&Compani au fost fabricate 4 loturi experimentale de înghețată cu pudre și cu extracte de aronia, păducel, măceș și cătină în cantitate de 100 kg fiecare. Rezultatele tesărilor microbiologice au servit pentru elaborarea monografiei colective „Analiza riscurilor asociate alimentației în Republica Moldova”, recomandată de către Senatul UTM specialiștilor din domeniul siguranței alimentelor, pentru studenții ciclului II (Masterat) și III (Doctorat).

АННОТАЦИЯ

Даниела Кожокарь: « Микробиостатическое действие некоторых растительных экстрактов фенольных соединений на микроорганизмы, вызывающие порчу пищевых продуктов », кандидатская диссертация по техническим наукам, Кишинев, 2024.

Структура диссертации: введение, 4 главы, общие выводы и рекомендации, библиография из 236 наименований, 3 приложения, 130 страниц основного текста, в том числе 30 рисунков и 35 таблиц. Полученные результаты опубликованы в 37 научных статьях.

Ключевые слова: антимикробная активность, патогенные микроорганизмы, растительные порошки и экстракты, биологически активные соединения, антиоксиданты, пищевые добавки.

Цель исследования - оценить микробиостатическое действие порошков и растительных экстрактов из ягод и специй на микроорганизмы, вызывающие порчу пищевых продуктов *in vitro* и *in situ* на различных категориях переработанных пищевых продуктов.

Задачи исследования: определение *in vitro* микробиостатического и микробицидного действия при прямом контакте некоторых фракций растений, богатых фенольными соединениями, на микроорганизмы, вызывающие порчу пищевых продуктов; установление *in situ* микробиостатического действия некоторых растительных фракций, богатых фенольными соединениями, на различные матрицы мясных и колбасных изделий; установление *in situ* микробиостатического действия некоторых фракций растений, богатых фенольными соединениями, на различные матрицы молочных продуктов; характеристика состава биологически активных соединений и их антиоксидантных свойств; анализ физико-химических, органолептических и морфологических свойств сливочного сыра с капсулированным экстрактом базилика.

Научная новизна и оригинальность: впервые на основе обширного исследования оценено антимикробное действие растительных экстрактов на эталонные штаммы микроорганизмов. Микробиостатическое и микробицидное действие этих экстрактов было определено *in situ* на различных пищевых матрицах. Оценены состав, антиоксидантная активность и возможные механизмы действия экстрактов.

Решение научной задачи: Была исследована антимикробная активность некоторых растительных экстрактов в отношении микроорганизмов, ответственных за порчу пищевых продуктов *in vitro*. Было оценено антиоксидантное действие растительных экстрактов. Этот факт способствует разработке альтернативных противомикробных стратегий с целью сокращения использования синтетических добавок и развития устойчивости к противомикробным препаратам.

Теоретическая значимость: собрана информация о действии некоторых растительных препаратов (экстрактов, порошков) на эталонные штаммы микроорганизмов. Определено микробиостатическое действие на различные пищевые матрицы. Были собраны данные о влиянии этих экстрактов на продление лаг-фазы роста бактерий.

Практическая ценность: предложен и реализован процесс производства мороженого, на основании которого получен патент на изобретение.

Внедрение научных результатов: согласно акту внедрения от 3 сентября 2021 года на предприятии SRL Mellang&Compani изготовлено 4 опытные партии мороженого с порошками и экстрактами черноплодной рябины, боярышника, шиповника и облепихи в количестве 100 кг каждая. Результаты микробиологических исследований были использованы при разработке коллективной монографии «Анализ рисков, связанных с пищевыми продуктами в Республике Молдова», рекомендованной Сенатом ОТМ специалистам в области безопасности пищевых продуктов и для студентов циклов II (магистратура) и III (докторантура).

ANNOTATION

Cojocari Daniela: " The microbiostatic action of some plant extracts of phenolic compounds on the microorganisms responsible for food spoilage ", doctoral thesis in engineering sciences, Chisinau, 2024.

Thesis structure: Introduction, 4 chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 236 titles, 3 annexes, 130 pages of main text, including 30 figures and 35 tables. The obtained results are published in 38 scientific papers.

Keywords: antimicrobial activity, pathogenic microorganisms, powders and plant extracts, biologically active compounds, antioxidants, food additives.

The research aims to evaluate the microbiostatic action of powders and plant extracts from berries and spices on microorganisms responsible for food spoilage *in vitro* and *in situ*, on different categories of processed foods.

Research objectives: *In vitro* determination of the microbiostatic and microbicidal effect upon direct contact of plant fractions rich in phenolic compounds on microorganisms causing food product spoilage; *in situ* determination of the microbiostatic effect of plant fractions rich in phenolic compounds on different matrices of meat and meat products; *in situ* determination of the microbiostatic effect of plant fractions rich in phenolic compounds on different matrices of dairy products; characterization of the composition of bioactive compounds and their antioxidant properties; analysis of the physico-chemical, sensory, and morphological properties of cream cheese with encapsulated basil extract.

Scientific novelty and originality: For the first time, based on an extensive study, the antimicrobial action of plant extracts on reference strains was evaluated. The microbiostatic and microbicidal effect of these extracts on diverse food matrices was determined *in situ*. The composition, antioxidant activity, and possible mechanisms of action of the extracts were estimated.

Solved scientific problem: The antimicrobial activity of plant extracts on microorganisms responsible for food spoilage was tested *in vitro*. The antioxidant action of plant extracts was estimated. This contributes to the development of alternative anti-infective strategies to reduce the use of synthetic additives and the development of antimicrobial resistance.

Theoretical significance: Information on the activity of plant preparations (extracts, powders) on reference strains was accumulated. The microbiostatic effect on diverse food matrices was determined. Data on the influence of these extracts on prolonging the lag phase in bacterial development were collected.

Applicative value: The process of manufacturing ice cream was proposed and implemented, leading to a patent.

Implementation of scientific results: According to the implementation act of September 3, 2021, at the Mellang&Compani LLC enterprise, 4 experimental batches of ice cream were manufactured with powders and extracts of aronia, hawthorn, rosehip, and sea buckthorn, each in a quantity of 100 kg. The results of microbiological tests were used to develop the collective monograph "*Analysis of risks associated with nutrition in the Republic of Moldova*," recommended by the TUM Senate to specialists in the field of food safety and for Master's and Doctoral students.

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1	Agenții cauzali implicați în maladii alimentare*	22
Tabelul 1.2	Incidența maladiilor alimentare (zoonozelor) în UE, 2019	27
Tabelul 1.3	Cazuri de infecții intestinale acute și toxinfecții alimentare provocate de agenți determinați și nedeterminați anii 2015 -2020	28
Tabelul 1.4	Antibiotice utilizate în agricultură și creșterea animalelor	40
Tabelul 1.5	Ponderea sensibilității microorganismelor la antibiotice, Republica Moldova	42
Tabelul 2.1	Materiale utilizate în cercetare	51
Tabelul 2.2	Reagenți chimici	55
Tabelul 2.3	Metodele de cercetare	58
Tabelul 3.1	Zonele de inhibiție a pulberilor vegetale asupra microorganismelor patogene	69
Tabelul 3.2	Zonele de inhibiție a diferitor soiuri de cătină asupra microorganismelor patogene	71
Tabelul 3.3	Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale în timp asupra microorganismelor patogene	74
Tabelul 3.4	Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale și extractelor din busuioc, rozmarin, cimbru asupra microorganismelor patogene	78
Tabelul 3.5	Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale asupra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	80
Tabelul 3.6	Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale asupra <i>L. monocytogenes</i> EGDe	81
Tabelul 3.7	Concentrații minime inhibitorii (CMI*) și concentrații minime bactericide (CMB*) a pulberilor vegetale asupra microorganismelor patogene	83
Tabelul 3.8	Determinarea CMI* și CMB* ale extractelor vegetale (în timp) prin metoda microdiluțiilor asupra microorganismelor patogene	85
Tabelul 3.9	CMI și CMB ale extractelor din busuioc, cimbru, rozmarin	86
Tabelul 3.10	Determinarea CMI și CMB a pudrelor vegetale asupra <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	88
Tabelul 3.11	CMI a extractelor de fructe de pădure și tescovină asupra <i>L. monocytogenes</i> EGDe	89
Tabelul 3.12	Polifenoli individuali identificați în extracte hidroetanolice din fructe de pădure și tescovina de struguri	92
Tabelul 3.13	Conținutul de polifenoli totali și individuali și activitatea antioxidantă a extractului de busuioc utilizat pentru experimente	93
Tabelul 3.14	Mecanisme de acțiune a extractelor din fructe de pădure ca și agenți antimicrobieni	99
Tabelul 4.1	Numărul de colonii microbiene dezvoltate în probele de crenvuști contaminate	108
Tabelul 4.2	Microorganisme identificate după o perioadă de timp de la fabricarea mezelurilor	113
Tabelul 4.3	Rezultatele monitorizării <i>in situ</i> a creșterii tulpinilor patogene în crenvuști contaminate cu tulpini de referință	114
Tabelul 4.4	Ratele de creștere specifice ale tulpinilor individuale <i>S. Abony</i>	115
Tabelul 4.5	Determinarea NGMAFA și a micetelor conform standardului	118
Tabelul 4.6	Reducerea creșterii microbiene în probele cu cremă de brânză cu adaos de pulberi de fructe de pădure	119
Tabelul 4.7	Parametrii fizico-chimici ai cremei de brânză fortificate cu extract de busuioc microîncapsulat*	123
Tabelul 4.8	Evoluția proprietăților senzoriale (scor) în cremă de brânză fortificată cu extract de busuioc microîncapsulat, în timpul depozitării	124

Tabelul 4.9	Evoluția valorii pH cremă de brânză fortificată cu extract de busuioc microîncapsulat în timpul păstrării	126
Tabelul 4.10	Evoluția parametrilor de textură a cremei de brânză fortificată cu extract de busuioc microîncapsulat în timpul păstrării	126
Tabelul 4.11	Analiza informațională a influenței duratei de păstrare și a concentrației de extract de busuioc microîncapsulat asupra parametrilor de textură, pH-ului și acceptabilității totale a probelor de cremă de brânză	129
Tabelul 4.12	Caracteristici senzoriale și fizico-chimice ale înghețatei cu adaos de pudră și extracte de fructe de pădure	130
Tabelul 4.13	Monitorizarea creșterii microbiene în probele de înghețată cu adaos de pulberi de fructe de pădure	132

LISTA FIGURILOR

Fig. 1.1	Mecanisme de rezistență a bacteriilor la antibiotic	31
Fig. 3.1	Acțiunea diferitor tipuri de materie vegetală asupra tulpinei de <i>S. aureus</i>	69
Fig. 3.2	Acțiunea diferitor soiuri de cătină asupra bacteriilor Gram pozitive și Gram negative	72
Fig. 3.3	Acțiunea preparatelor (pulberilor) din cătină (5-C6); (6-R1); (7-AGA); (8-R4): a) <i>S. sonnei</i> , b) <i>S. aureus</i>	74
Fig. 3.4	Acțiunea pulberilor din cătină (5-C6); (6-R1); (7-AGA); (8-R4): a) <i>P. aeruginosa</i> ; b) <i>B. cereus</i>	75
Fig. 3.5	Studiu comparativ al evoluției activității antibacteriene la păstrare (2020-2022) a pulberilor de cătină asupra microorganismelor patogene <i>S. aureus</i>	76
Fig. 3.6	Studiu comparativ al evoluției activității antibacteriene la păstrare (2020-2022) a pulberilor de cătină asupra microorganismelor patogene <i>B. subtilis</i>	76
Fig. 3.7	Studiu comparativ al evoluției activității antibacteriene la păstrare (2020-2022) a pulberilor de cătină asupra microorganismelor patogene <i>E. coli</i> .	77
Fig. 3.8	Studiu comparativ al evoluției activității antibacteriene la păstrare (2020-2022) a pulberilor de cătină asupra microorganismelor patogene <i>S. Typhymurium</i> și <i>S. Enteritidis</i>	77
Fig. 3.9	Activitatea pulberilor vegetale asupra <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118: a) cătină; b) păducel; c) măceșe.	80
Fig. 3.10	Efectul extractelor vegetale asupra <i>L. monocytogenes</i> EGDe: a) extract concentrat 1, b) cătină 2, c) extract de păducel, d) extract de măceșe.	82
Fig. 3.11	Determinarea CMI și CMB a preparatelor vegetale asupra bacteriilor patogene	84
Fig. 3.12	Activitatea antibacteriană a extractelor asupra <i>B. cereus</i> și <i>C. albicans</i> : 1) busuioc, 2) rozmarin, 3) cimbru.	87
Fig. 3.13	Concentrația minimă inhibitorie a extractelor vegetale pentru <i>L. monocytogenes</i> EGDe a) măceșe, b) cătină	89
Fig. 3.14	Concentrația minimă inhibitorie a extractelor vegetale pentru <i>L. monocytogenes</i> EGDe a) aronia, b) tescovină de struguri	90
Fig. 3.15	Activitatea antioxidantă a extractului de tescovină de struguri (soiul B-1): a) extract pur; b) raport 1:2.	94
Fig. 3.16	Activitatea antioxidantă a extractului de cătină albă (soiul RH-4): a) extract pur; b) raport 1:2; c) raport 1:4	95
Fig. 3.17	Mecanisme responsabile pentru proprietățile antioxidante ale polifenolilor	100
Fig. 4.1	Crenvurști cu diferite adaosuri vegetale	107
Fig. 4.2	Colonii de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 dezvoltate din probele de crenvurști testate după 24 ore: a) proba martor; b) proba cu păducel.	109
Fig. 4.3	Colonii de <i>Klebsiella pneumoniae</i> dezvoltate din probele de crenvurști testate după 96 h: a) proba martor; b) proba cu păducel.	109
Fig. 4.4	Faza <i>Lag</i> și Faza <i>Exponențială</i> a tulpinelor patogene în probele de crenvurști; (perioada de testare 96 h) a) <i>S. aureus</i> ATCC 25923; b) <i>S. Abony</i> ATCC 6017; c) <i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883; d) <i>E. coli</i> ATCC 25922	111
Fig. 4.5	Creșterea tulpinelor de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 în probele de crenvurști: a) proba martor; b) proba cu cimbru.	116
Fig. 4.6	Creșterea tulpinilor de <i>S. Abony</i> și <i>S. aureus</i> în probele de crenvurști: a) proba cu busuioc, martor; b) proba cu tarhon.	116
Fig. 4.7	Efectul pulberilor încorporate în crema de brânză asupra <i>S. aureus</i> : a) proba S1 - măceș, martor; b) proba S12 – martor, păducel).	119
Fig. 4.8	Efectul pulberilor încorporate în crema de brânză asupra <i>E. coli</i>	120
Fig. 4.9	Micrografii MES ale probei de extract de busuioc microîncapsulat	121
Fig. 4.10	Spectrele FT-IR ale alginatului de sodiu (Alg), extractului de busuioc (BE) și extractului de busuioc microîncapsulat (MBE)	122
Fig. 4.11	Efectul pulberilor încorporate în înghețată asupra <i>S. aureus</i> : a) proba martor; b) proba 11	133
Fig. 4.12	Efectul pulberilor încorporate în înghețată asupra <i>S. Abony</i> : a) proba martor; b) proba 11	134

ABREVIERI

Alg	Alginat de sodiu
BE	Extract de busuioc
BGN	Bacterii Gram negative
BRA	Bacterii rezistente la antibiotic
CDC	<i>eng. Centres of Disease Control</i>
CDDEP	<i>eng. The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy</i>
CLSI	<i>eng. Clinical & Laboratory Standards Institute/Institutul pentru Standarde Clinice și de Laborator</i>
CMI	Concentrația minimă inhibitoare
CMB	Concentrația minimă bactericidă
DDD	Doze zilnice definite
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ECDC	<i>eng. European Centres of Disease Control/Centrul European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor</i>
EFSA	<i>eng. European Food Safety Authority/Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară</i>
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa și Enterobacter</i>
FTIR	Spectrometrie în infraroșu cu transformată Fourier
GI	Gastro-intestinală
GRA	Gene de rezistență la antimicrobiene
MBE	Busuioc microîncapsulat
MDR	Tulpini multirezistente
MRSA	Meticilin rezistent <i>S. aureus</i>
M/o	Microorganism
NGMAFA	Numărul total de germeni mezofili aerobi și facultativ anaerobi
PA	Preparate antimicrobiene
PDR	Tulpini pan-rezistente
RAM	Rezistența la antimicrobiene
STEC	<i>E. coli</i> toxin Shiga producătoare
TIA	Toxiinfecții alimentare
UFC	Unități formatoare de colonii
XDR	Tulpini cu rezistență extinsă

ÎNTRUDUCERE

Calitatea vieții și sănătatea este o componentă importantă a preocupărilor în sfera politicii, comerțului și securității. Sănătatea ia în considerare bunăstarea fizică, mentală și socială. Integritatea mediului, sănătatea comunității, sănătatea comportamentală, economia sănătății, politica publică, sănătatea mintală și securitatea ocupațională, problemele de gen în domeniul sănătății, sănătatea sexuală și reproductivă prezintă corelații importante. Bolile pot fi generate de produse alimentare, de alimente tot mai sofisticate și răspândite la nivel internațional, care riscă să fie contaminate cu microbi patogeni, substanțe chimice sau toxine, comerțul cu astfel de produse amplifică riscul îmbolnăvirilor. Datorită ritmului rapid de viață și a industriilor orientate spre profit, care minimizează costurile de producție și de distribuție prin utilizarea de conservanți, aditivi, antibiotice și hormoni, consumul de alimente fast-food și mese rapide, sănătatea este adesea grav afectată, iar imunitatea generală a populației este mult mai slăbită.

Bolile transmise prin alimente sunt maladii frecvente, costisitoare, uneori periculoase pentru viață - dar în mare parte prevenibile și constituie o problemă de sănătate publică (FDA, 2024). Mulți agenți cauzali care provoacă maladii prin contaminarea alimentelor, cauzând intoxicații alimentare. Cercetătorii au identificat peste 250 de boli transmise prin alimente. Cele mai multe dintre ele sunt infecții, cauzate de o varietate de bacterii, virusuri și paraziți. Centrul pentru Prevenirea și Controlul Bolilor (CDC) în anul 2021 estimează că în fiecare an 48 de milioane de oameni se îmbolnăvesc de o boală transmisă prin alimente, 128000 sunt spitalizați și 3000 mor (CDC, 2021; WHO, 2021)

Alimentația este necesitatea de bază a organismului uman și satisfacerea acesteia adesea cauzează probleme. Maladiile alimentare provoacă o morbiditate semnificativă, în pofida progreselor tehnologice de procesare a alimentelor și a medicinei avansate. Bolile transmise prin alimente sunt o problemă atât în țările dezvoltate, cât și în cele în curs de dezvoltare, suprasolicită sistemele de sănătate, afectează grav sugarii, copiii mici, bătrânii și bolnavii, creează un cerc vicios de diaree și malnutriție, afectează economia și dezvoltarea națională, precum și comerțul internațional. Raportul din 2019 al Băncii Mondiale privind povara economică a bolilor de origine alimentară a indicat că pierderea totală de productivitate asociată cu bolile de origine alimentară în țările cu venituri mici și medii a fost estimată la 95,2 miliarde USD pe an, iar costul anual al tratării bolilor de origine alimentară este estimat la 15 miliarde USD (WHO, 2015).

Rezistența la antibiotice apare atunci când bacteriile se modifică într-un mod care împiedică activitatea antibioticelor. Rezistența la antimicrobiene (RAM) s-a dezvoltat ca una dintre principalele amenințări urgente la adresa sănătății publice, cauzând probleme serioase pentru prevenirea și tratamentul cu succes a bolilor persistente. În pofida diferitelor acțiuni

întreprinse, în ultimele decenii pentru a aborda această problemă, tendințele RAM la nivel mondial nu arată semne de scădere. Rezistența la antimicrobiene este considerată o amenințare semnificativă pentru sistemele de sănătate publică nu doar în țările în curs de dezvoltare, ci și în întreaga lume. Faptul că bolile infecțioase nu mai pot fi tratate cu antibiotice descrie un viitor necunoscut în domeniul sănătății. Infecția cu bacterii RAM duce la îmbolnăviri grave și internări prelungite în spital, creșteri ale costurilor de asistență medicală, costuri mai mari pentru medicamentele de linia a doua și eșecuri ale tratamentului (Porooshat, 2019).

Utilizarea în agricultură a antibioticelor este un alt contributor proeminent la rezistența antimicrobiană la om. În Statele Unite, aproximativ 80 % din antibioticele vândute sunt introduse în alimentele pe care le consumă animalele (Mohr, 2016). În 2010, 63200 de tone de antibiotice au fost utilizate în producția de animale din întreaga lume, ceea ce este semnificativ mai mult decât consumul uman. Pe lângă utilizarea antibioticelor pentru tratarea animalelor bolnave, antibioticele sunt adăugate în mare măsură la hrana animalelor sănătoase și apa potabilă pentru a preveni îmbolnăvirile în rândul animalelor, pentru a menține nivelul subterapeutic cu scop de a crește eficiența hranei. Experții estimează că în absența unei soluții de tratare a infecțiilor rezistente la antimicrobiene, aproximativ 300 de milioane de oameni vor muri prematur în următorii 35 de ani, iar pierderile economice globale vor crește la 100 de trilioane de dolari (Porooshat, 2019).

Rezistența la antibiotice trebuie văzută prin prisma „One Health”. Abordarea oricărei probleme dintr-o perspectivă One Health necesită analiza interacțiunilor populației, animalelor domestice, faunei sălbatice, plantelor și mediului nostru. One Health este efortul de colaborare al mai multor profesii din domeniul sănătății pentru a obține o sănătate optimă pentru oameni, animale domestice, animale sălbatice, plante și mediul nostru. Rezistența antimicrobiană este o problemă ecologică, care se caracterizează prin interacțiuni complexe, implicând diverse populații microbiene ce afectează sănătatea oamenilor, a animalelor și a mediului. Este logic să abordăm problema rezistenței luând în considerare această complexitate și natura ecologică, folosind o abordare coordonată, multisectorială, cum ar fi One Health (McEwen et al., 2018).

Pe măsură ce ne confruntăm tot mai mult cu problema rezistența microorganismelor la antibiotice, devine evident că doar o abordare naturistă, care ar conduce la diminuarea consumului de aditivi de sinteză ar putea ameliora situația. Utilizarea extractelor de plante pentru diminuarea riscurilor microbiologice asociate alimentelor ar fi o soluție promițătoare pentru sănătatea populației. Microorganismele patogene producătoare de toxine, care cauzează alterarea produselor se găsesc în mod natural în mediu și pot fi transferate în produsele alimentare. Conservanții chimici pentru alimente sunt utilizați pe scară largă de industria alimentară pentru a preveni sau a întârzia eficient deteriorarea alimentelor. Cu toate acestea, utilizarea acestor substanțe chimice poate

provoca efecte adverse pe termen lung, cum ar fi alergii și cancer, dereglări metabolice. Aceste efecte adverse justifică cercetarea continuă pentru a găsi conservanți alimentari GRAS (recunoscuți în general drept siguri) (Attarianshandiz, 2022).

Alimentele sunt un vehicul ideal pentru dispersia agenților nocivi care pot provoca boli alimentare ce pun viața în pericol. Există peste 80000 de substanțe chimice și sute de agenți patogeni biologici naturali, toxine, metale grele, paraziți care pot provoca boli grave. Alimentele și produsele alimentare sunt ușor accesibile contaminării în mai multe puncte ale oricărui proces de fabricație, în timp ce sunt ușor distribuite pe distanțe mari, ceea ce duce la o mare îngrijorare pentru impactul pe scară largă al bolilor transmise prin alimente. Condimentele și legumele aromate, fructele de pădure au fost de multă vreme folosite în alimente nu numai pentru calitățile lor aromatice și parfumate dar și pentru proprietățile lor de-a preveni deteriorarea alimentelor și a prelungi durata de valabilitate a alimentelor (Cetin-Karaca, 2014).

Activitate antibacteriană, antifungică, antivirală și proprietățile antioxidante ale acestor compușilor bioactive din plante au fost obiectul cercetărilor antiinfecțioase de mulți ani. Aceste activități au sugerat că compușii fenolici pot fi utilizați ca agenți chimioterapeutici, agenți de conservare ale alimentelor și dezinfectanți (Cetin-Karaca, 2011; Jouda, 2013; Attarianshandiz, 2022). Totuși, utilizarea lor ca aditivi naturali în industria alimentară rămâne a fi sub nivelul așteptărilor, cauza principală fiind de ordin economic – costul mai redus și accesibilitatea aditivilor de sinteză. Însă preocupările tot mai frecvente ale populației legate de sănătate impun o căutare intensivă a alternativelor naturale, care ar putea fi utilizate ca substituenți pentru antimicrobienele și conservanții sintetici, pentru inhibarea parțială sau completă a bacteriilor (Cetin-Karaca, 2011). În acest context, crește și cererea de produse ecologice, ceea ce, finalmente, va solicita industria alimentară să diminueze consumul de aditivi sintetici în favoarea soluțiilor naturiste.

Motivația alegerii subiectului. Produsele alimentare sunt obținute astăzi cu ajutorul celor mai noi procedee. Supraproducția și oferta foarte variată îi obligă pe producători să facă tot ceea ce este posibil pentru ca alimentul lor să aibă succes. Astfel, produsele sunt conservate pe perioade lungi, se introduc coloranți mai atractivi, vitamine produse pe cale artificială etc. Conservanții, aromele, coloranții - într-un cuvânt aditivii sunt astăzi utilizați pe larg în industria alimentară. Disponibilitatea antibioticelor pentru tratarea bolilor infecțioase a îmbunătățit semnificativ sănătatea și speranța de viață a oamenilor, precum și sănătatea și bunăstarea animalelor. Cu toate acestea, utilizarea antibioticelor a generat microorganisme rezistente la antimicrobiene. Rezistența antimicrobiană este o problemă la nivel mondial atât pentru sănătatea umană, cât și pentru cea animală. Alimentele pot acționa ca un vector pentru transferul bacteriilor rezistente la antimicrobiene și al genelor de rezistență la antimicrobiene la oameni. Tot mai frecvent se caută

alternative de substituire a conservanților sintetici. Astfel, direcția cercetărilor privind elaborarea produselor alimentare cu componente bioactive și ingrediente funcționale naturale este deosebit de actuală. Creșterea rezistenței microorganismelor la substanțele chimice și medicamentele convenționale prezintă o problemă serioasă și evidentă la nivel mondial. Plantele și derivații acestora conțin o mare varietate de metaboliți secundari care pot inhiba sau încetini creșterea bacteriilor, drojdiilor și mucegaiurilor. Screening-ul și identificarea unor substanțe naturale cu proprietăți antimicrobiene poate sta la baza substituirii aditivilor sintetici.

Ipoteza științifică: pudrele și extractele vegetale manifestă efectele antimicrobiene și antioxidante, ceea ce ar putea permite utilizarea lor în calitate de conservanți alimentari. Pentru confirmarea acestei ipoteze a fost necesar de a testa efectul antibacterian al fracțiilor vegetale atât în rezultatul contactului direct cu microorganismele patogene, cât și evaluarea efectului fracțiilor vegetale incorporate în produse alimentare, prin contaminarea intenționată a acestora cu patogeni capabili de a coloniza accidental aceste categorii de produse și elucidarea efectului microbiostatic al acestor fracții vegetale.

Scopul cercetării constă în evaluarea acțiunii microbiostatice a pudrelor și extractelor vegetale din fructe de pădure și condimente asupra microorganismelor responsabile de alterarea alimentelor *in vitro* și *in situ*, pe diferite categorii de alimente procesate.

Pentru realizarea scopului propus au fost stabilite următoarele **obiective ale cercetării:**

1. Determinarea *in vitro* a efectului microbiostatic și microbicid la contactul direct a unor fracții vegetale bogate în compuși fenolici asupra microorganismelor ce cauzează alterarea produselor alimentare.
2. Stabilirea *in situ* a efectului microbiostatic a unor fracții vegetale bogate în compuși fenolici pe matrici de produse din carne.
3. Stabilirea *in situ* a efectului microbiostatic a unor fracții vegetale bogate în compuși fenolici pe diferite matrici de produse lactate.
4. Caracterizarea compoziției compușilor bioactivi și a proprietăților lor antioxidante.
5. Analiza proprietăților fizico-chimice, senzoriale și morfologice ale cremei de brânză cu extract încapsulat de busuioc.

Sinteza metodologiei de cercetare științifică și justificarea metodelor de cercetare aplicate. Studiul a fost realizat în cadrul Departamentului Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”; a Departamentelor Tehnologia Produselor Alimentare și Oenologie și Chimie, Facultatea Tehnologia Alimentelor, Universitatea Tehnică a Moldovei. O parte din cercetări au fost efectuate și în instituții internaționale: Universitatea Dunărea de jos, Galați, România;

Institutul de Plante și Științe a Mediului Nitra, Institutul de Horticultură; Centrul de Cercetare AgoBioTech, Nitra, Slovacia (*Institute of plants and environmental sciences Nitra Institute of Horticulture, Faculty of Horticulture and Landscape Engineering and Agrobiology, Research Centre AgoBioTech*).

Drept suport metodologic al tezei au servit cercetările realizate în cadrul proiectelor științifice:

16.80013.5107.22/Ro - *Substituirea aditivilor alimentari sintetici cu componenți bioactivi extrași din resurse naturale regenerabile*, Proiect din cadrul Programului de cooperare științifică și tehnologică Republica Moldova – România, 2016-2018.

18.51.07.01A/PS - Proiect de Stat *Diminuarea contaminării materiei prime și produselor alimentare cu microorganisme patogene*, 2018-2019.

20.80009.5107.09 - Proiect de Stat *Ameliorarea calității și siguranței produselor alimentare prin biotehnologie și inginerie alimentară*, 2020-2023.

Proiectul *SER-ECO-2023 - Valorisation de composés bioactifs issus de déchets agro-industriels par encapsulation lysosomale*, 2023-2024.

Pentru confirmarea ipotezei de cercetare au fost aplicate metode concrete pentru fiecare obiectiv, aprobate la nivel național și internațional. Cercetarea a fost efectuată în etape și a constat în: determinarea efectului antimicrobian calitativ și cantitativ a fracțiilor biologice asupra tulpinilor de referință, determinarea efectului microbiocid și microbiostatic a extractelor și pudrelor vegetale încorporate în diverse matrice alimentare (*in situ*). Testul cu radicalul liber DPPH a fost aplicat pentru aprecierea activității antioxidante. În conformitate cu scopul și obiectivele stabilite, au fost aplicate metode clasice și moderne de cercetare: metode microbiologice, fizico-chimice (spectroscopia UV/vis, FT-IR, cromatografia de lichide – HPLC), modelarea matematică, metode statistice de prelucrare a rezultatelor.

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute și valoarea aplicativă a lucrării. Studiul s-a axat pe aprecierea activității antibacteriene a pudrelor și extractelor vegetale autohtone. A fost identificat spectrul de acțiune al acestor preparate asupra tulpinelor de referință, preponderent responsabile de alterarea alimentelor. În premieră s-a evaluat efectul microbiostatic și microbiocid a fracțiilor vegetale încorporate în matrice alimentare. În baza rezultatelor cercetării a fost obținut 1 brevet de invenție – „Procedeu de fabricare a înghețatei”.

Valorile potențialului antimicrobian și antioxidant ale preparatelor vegetale luate în studiu sugerează necesitatea continuării cercetărilor în vederea elaborării unor strategii antiinfecțioase alternative și utilizarea produselor naturale ca aditivi alimentari.

Rezultatele cercetării completează studiile anterioare privind efectul antimicrobian al preparatelor biologice asupra tulpinilor de referință. Activitatea antibacteriană a unor preparate biologice și a acțiunii antioxidante a extractelor și pudrelor vegetale stabilite în lucrare prezintă dovezi, care pot fi utilizate pentru obținerea de agenți terapeutici antimicrobieni noi, lipsiți de efecte adverse majore.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele cercetării acumulate în cadrul tezei au fost prezentate și discutate la **foruri științifice naționale și internaționale:**

Conferințele Studenților, Masteranzilor și Doctoranzilor, UTM, Chișinău (2019 - 2021); Conferința Internațională „Modern Technologies in the Food Industry”, Chișinău (2018); Conferința Internațională „Achievements and perspectives of modern chemistry dedicated to the 60th anniversary from the foundation of the Institute of Chemistry”, Chișinău (2019); Conferința Internațională „The days of the Academy of Technical Sciences from Romania - XIV edition”, Chișinău (2019); Conferința științifică internațională, „Perspectivele și Problemele Integrării în Spațiul European al Cercetării și Educației”, Ediția a VIII-a, Cahul (2021); Conferința Internațională „International Conference Intelligent valorisation of agro-industrial wastes”, Chișinău (2021); Conferința Internațională „The 7th International Conference Ecological & Environmental Chemistry”, Chisinau (2022), Conferința națională cu participare internațională „Abordarea O singură sănătate – realizări și provocări ”Ediția” a II-a, Chișinău, Republica Moldova (2023); Simpozionul Internațional „Euro-Aliment”, Galați (2019); Simpozionul Internațional „Euro-Aliment”, Galați, România (2021); Conferința Internațională „Works of the International Conference on Carotenoid Research and Applications in Agro-Food and Health”, Cyprus (2019); Conferința Internațională „The 16th International Conference of Constructive Design and Technological Optimization in Machine Building Field, OPROTEH 2021; Conferința Internațională „Aspecte moderne ale conservării sănătății umane, Procesele celei de-a Conferința 15-a științifică și practică interdisciplinară internațională, a 30-a aniversare de la înființarea Institutului de Cercetare în Fitoterapie al Universității Medicale de Stat”, Ujhorod, Ukraina (2022).

Saloane naționale și internaționale de invenții: Expoziția europeană de creativitate și inovație „Euroinvent-2021”, Iași (2021); The 10th International Symposium. Food connects people and shares science in a resilient world. Galati, Romania (2021).

Rezultatele cercetării și problemele abordate au fost publicate în următoarele lucrări științifice: 1 capitol în monografia colectivă „Analiza riscurilor asociate alimentației în Republica Moldova”; 7 articole în reviste indexate în baze de date Web of Science și SCOPUS; 2 articole în reviste științifice din străinătate recunoscute, indexate BDI; 6 articole în reviste științifice din

Registrul Național al revistelor de profil (B+), 20 rezumate ale lucrărilor publicate în culegeri de lucrări ale conferințelor internaționale (16) și naționale (4); 1 brevet de invenție și un ghid metodic.

Sumarul compartimentelor tezei. Lucrarea este expusă în limba română, pe 130 pagini tehnoredactate la computer. Teza este structurată în conformitate cu rigorile de întocmire a tezelor de doctor. Teza constă din foaia de titlu, dreptul de autor, cuprins, adnotare în limbile română, engleză și rusă, introducere, 4 capitole, concluzii generale, recomandări și bibliografia cu 236 de referințe, 3 anexe, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului. Materialul ilustrativ include 35 de tabele, 30 de figuri.

În „**Introducere**” sunt etalate actualitatea și importanța științifico-practică a subiectului abordat, motivația alegerii subiectului de cercetare, scopul și obiectivele cercetării, noutatea și semnificația teoretică, valoarea aplicativă, problema științifică soluționată, aprobarea și implementarea rezultatelor științifice obținute și sumarul capitolelor tezei.

Capitolul 1 „**Compuși biologici cu acțiune antimicrobiană – sursă promițătoare pentru diminuarea contaminării alimentelor și reducerea rezistenței microorganismelor la antibiotice**” conține date actuale, culese din literatura de specialitate, cu referire la antimicrobiene naturale, aspecte generale și mecanisme de acțiune, importanța utilizării lor ca aditivi alimentari. Capitolul reflectă problema maladiilor transmise prin alimente și agenții etiologici responsabili de alterarea alimentelor. Este analizată informația actuală privind situația epidemiologică la nivel național și internațional, legată de utilizarea excesivă a aditivilor sintetici și rezistența la antibiotice. În compartiment sunt relatate cauzele apariției crizei rezistenței la antimicrobiene și utilizarea excesivă a antibioticelor în medicina umană, în sectorul veterinar, agricultură și în industria alimentară. Este specificată importanța alimentelor ca vehicol de răspândire a bacteriilor rezistente la antibiotice. Este subliniată complexitatea compușilor microbieni de origine vegetală și sunt reflectate rezultatele cercetărilor, care elucidează aspecte legate de acțiunea antimicrobiană a fenolilor, alcaloizilor, compușilor organici, antocianilor, terpenoidelor din plante. Se pune accent pe utilizarea produselor naturale în industria alimentară. Capitolul se încheie cu 9 concluzii la subiectele ce persistă în domeniul de interes al studiului propus.

Capitolul 2 „**Materiale și metode**” conține descrierea amplă a metodelor de cercetare și obiectelor de studiu, care au fost utilizate pentru realizarea prezentei lucrări de doctorat. În calitate de obiecte de studiu *in vitro* au fost utilizate tulpini de referință Gram pozitive și Gram negative. În capitol sunt expuse metodologia cercetării, metodele de cercetare (bibliografico-analitice, microbiologice, fizico-chimice) și metodele statistice de prelucrare a datelor obținute. Capitolul conține descrierea metodelor de cercetare utilizate. Obiectele de studiu și metodologia utilizată au

permis de a determina activitatea antimicrobiană a preparatelor vegetale. În urma analizei metodelor de cercetare au fost formulate concluzii.

Capitolul 3 „*Efectul antimicrobian al preparatelor de origine naturală*” prezintă rezultatele determinării acțiunii antimicrobiene a extractelor și pudrelor vegetale la contactul direct cu microorganismele patogene. Incipient s-a determinat acțiunea bacteriostatică și bactericidă asupra tulpinilor de referință, s-a stabilit concentrația minimă inhibitorie, minimă bactericidă. S-a determinat efectul antibacterian și acțiunea antioxidantă a preparatelor după o perioadă de doi ani de păstrare. Se caracterizează tulpinile mai sensibile față de acțiunea acestor preparate. În baza rezultatelor obținute au fost publicate articole în reviste naționale și internaționale. Cele nouă concluzii de la finele capitolului redau în totalitate rezultatele obținute.

Capitolul 4 „*Analiza in situ a acțiunii microbiostatice și microbiocide a unor extracte și pudre vegetale*” elucidează efectul *in situ* al adaosurilor vegetale pentru diminuarea riscului microbiologic și ținerea sub control a calității și siguranței produselor alimentare. S-a efectuat analiza produselor alimentare (matricilor) conform standardelor în vigoare. În acest compartiment a fost analizate mai multe loturi de produse alimentare: crenvurști, înghețată, cremă de brânză cu diferite concentrații de extracte și pudre vegetale. A fost determinată acțiunea antibacteriană *in situ* a extractelor propuse spre testare și probelor martor, matricele alimentare prealabil fiind infectate cu *S. aureus*, *S. Abony*, *K. pneumoniae* și *E. coli*. S-a determinat efectul antibacterian și capacitatea de inhibiție a unor extracte din fructe de pădure încorporate în înghețată. După evaluarea activității antibacteriene la contact direct (calitativ și cantitativ) a extractelor și pudrelor din diverse fructe de pădure și plante, s-a determinat efectul lor bacteriostatic *in situ*. Rezultatele testelor au pus în evidență efectul antimicrobian al pulberilor de fructe de pădure asupra microorganismelor patogene (*Salmonella Abony* ATCC 6017, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 25922). Acest capitol conține descrierea efectului relevant antimicrobian al pulberilor de fructe de pădure adăugate în crema de brânză, înghețată și crenvurști, prealabil contaminate cu tulpini de referință.

Cuvinte-cheie: efect antibacterian, extracte, pudre vegetale, polifenoli, diluții succesive, difuzimetric, antioxidanți, conservanți.

1. COMPUȘI BIOLOGICI CU ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ – SURSĂ PROMIȚĂTOARE PENTRU DIMINUAREA CONTAMINĂRII ALIMENTELOR ȘI REDUCEREA REZISTENȚEI MICROORGANISMELOR LA ANTIBIOTICE

1.1 Problema maladiilor transmisibile prin alimente

Mâncarea sigură salvează vieți. Bolile alimentare au constituit o problemă pentru toate societățile de la începutul omenirii (WHO). Hrana este esențială pentru viață, prin urmare siguranța alimentară este un drept fundamental al omului. Datorită globalizării comerțului cu alimente la nivel mondial, alimentele au devenit o cale majoră de expunere a omenirii la agenți patogeni responsabili de infecții alimentare. Miliarde de oameni din lume sunt expuși riscurilor cauzate de alimente. Multe milioane se îmbolnăvesc, în timp ce sute de mii mor în fiecare an pentru că consumă alimente nesigure (Hoffman et al., 2017; Fung et al., 2018). Maladiile alimentare sunt o problemă globală de sănătate publică cu un impact major asupra sănătății umane, mijloacelor de trai și a sistemelor de îngrijire a sănătății, cu afectarea comerțului internațional. Efectul lor este preconizat a fi diminuat prin strategii naționale de control, realizate prin punerea în aplicare a legilor și reglementărilor alimentare (Faour-Klingbeil et al., 2020; WHO). Însă bolile cauzate de alimente continuă să fie o problemă în creștere, în pofida schimbării în evoluția comerțului cu alimente la nivel mondial, comportamentele de consum ale populației, mediul și procesele de producție a alimentelor (Faour-Klingbeil et al., 2020).

Elementele cheie pentru siguranța alimentară:

- A fost estimat, că circa 600 milioane persoane (aproape una din zece persoane în întreaga lume) se îmbolnăvesc după ce consumă produse alimentare contaminate, iar 420000 mor în fiecare an, ceea ce duce la pierderea a 33 de milioane de ani de viață sănătoși (Faour-Klingbeil et al., 2020; WHO, 2021; Lee et al., 2021).
- Asigurarea și accesul la alimente sigure și nutritive este cheia succesului în menținerea vieții și promovarea sănătății decente.
- Hrana incertă, care conține microorganisme dăunătoare sau substanțe chimice, provoacă peste 200 de boli și poate cauza de la diaree severă până la cancer.
- Maladiile diareice sunt cele mai frecvente boli care provin din consumul de alimente contaminate.
- Copiii sub 5 ani suportă 40 % din povara bolilor transmise de alimente, cu 125000 de decese în fiecare an (Faour-Klingbeil et al., 2020; WHO, 2019).

- Maladiile alimentare împiedică dezvoltarea socio-economică prin tensionarea sistemelor de îngrijire a sănătății și afectează economia națională, turismul și comerțul.
- Lanțul de aprovizionare cu alimente traversează mai multe granițe naționale. O colaborare eficientă între guverne, producători și consumatori contribuie la asigurarea siguranței alimentelor.
- Protecția și siguranța alimentară, nutriția și securitatea alimentară sunt indisolubil legate. Produsele nesigure creează un cerc vicios de boli și malnutriție, care afectează în special sugarii, copiii mici, bătrânii și bolnavii (WHO, 2021).

Siguranța alimentară se referă la fiecare unitate de manipulare a alimentelor și este în strânsă conexiune cu nutriția umană (Morya et al., 2020). Agenda 2030 prezintă provocările principale din sistemul alimentar și propuneri pentru realizarea sustenabilității. Pentru a atinge foametea zero și securitatea alimentară până în 2030, sunt imperative acțiuni coordonate și soluții politice urgente pentru a transforma sistemele alimentare, pentru a investi în practici agricole durabile și a atenua impactul conflictelor și al pandemiei asupra nutriției globale și a securității alimentare, conform Public Health Environmental Health Service și Environmental Health OC Care Agency. Promovarea comerțului împreună cu îmbunătățirea practicilor agricole și animale la producția primară va ajuta cu siguranță țările în curs de dezvoltare să gestioneze mai bine siguranța alimentară. Îmbunătățirea siguranței alimentelor în comerțul internațional necesită numeroase implicări politice și tehnice care includ un acces efectiv la piață; o analiză mai bună a costurilor și beneficiilor regulilor comerciale globale pentru țările în curs de dezvoltare sau integrarea țărilor în curs de dezvoltare în economia globală (Mead et al., 1999).

Igiena adecvată a angajaților, cum ar fi spălarea corectă a mâinilor, este esențială pentru a preveni contaminarea directă și indirectă a alimentelor, ustensilelor și a altor echipamente legate de alimente. Angajatorii (responsabilii) nu trebuie să admită persoane purtătoare de bacterii patogene sau bolnave să lucreze în bucătărie. Astfel, factori de risc care sunt cel mai adesea responsabili de focare de boli de origine alimentară sunt:

- temperaturi necorespunzătoare de păstrare la cald/rece a alimentelor potențial periculoase;
- temperaturi incorecte de preparare a alimentelor;
- ustensile și echipamente contaminate;
- starea de sănătate și igienă precară a angajaților;
- alimente din surse nesigure, conform Public Health Environmental Health Service și Environmental Health OC Care Agency.

Orice mâncare care urmează să fie vândută, servită, oferită sau utilizată ca ingredient, trebuie să fie obținută de la o sursă aprobată și sigură. O sursă aprobată este o instituție în care alimentele produse, preparate sau procesate, îndeplinesc sau depășesc standardele agenției de

reglementare responsabile, conform Public Health Environmental Health Service și OC Care Agency. Fiecare persoană poate fi expusă la intoxicație alimentară, dar anumite categorii de persoane sunt mai predispuse să se îmbolnăvească și să aibă un proces mai grav.

Persoanele cu un risc mai mare de intoxicație alimentară sunt:

- Adulții cu vârsta de 65 de ani și mai în vârstă. Vârstnicii au un risc mai mare, din cauza ca sistemele de protecție nu recunosc și nu protejează organismul de invadarea germenilor patogeni (Wu, 2018). Mai frecvent aceste persoane sunt depistate cu toxiinfecții cauzate de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp. sau *E. coli*.

- Copiii mai mici de 5 ani. Ei sunt expuși unui risc crescut de boli de origine alimentară, deoarece sistemul lor imun este încă în curs de dezvoltare (Ventola, 2015). La acești copii mai frecvent se înregistrează infecții cu bacterii din genul *Salmonella* și *E. coli*.

- Persoanele cu sistemul imun slăbit. Pacienții cu diabet, boală renală sau hepatică, HIV/SIDA; boli autoimune, persoanele care primesc chimioterapie sau radioterapie, transplanturi de organe, sunt mai susceptibile de a se îmbolnăvi de o boală alimentară. Persoanele care fac dializă au șanse de 50 de ori mai mari să facă o infecție cu *Listeria*.

- Femeile însărcinate. Transformările imunității la femeile însărcinate le expun pe ele și pe copiii lor nenăscuți la un risc crescut de apariție a bolilor alimentare. Aceste boli se pot agrava în timpul sarcinii și pot duce la avort spontan sau la naștere prematură, potrivit Food Safety Home Page și Food safety and the Sustainable Development Goals (FSSDG).

Siguranța alimentară este esențială pentru atingerea obiectivului Dezvoltării Durabile. Un sondaj important în Vietnam, la nivel național, a constatat că siguranța alimentară este cea mai mare preocupare a cetățenilor, chiar mai importantă decât guvernarea, educația și sănătatea populației (USAID 2015). Bolile transmise prin alimente sunt asociate cu costuri mari în mod corespunzător și extenuare psihosocială, care are impact negativ asupra sănătății și bunăstării. Unele boli alimentare pot duce la boli catastrofale (de exemplu, paralizie, leziuni cerebrale) care pot duce la coborârea permanentă în sărăcie. Preocupările legate de siguranța alimentelor duc la creșterea consumului de alimente procesate și ambalate, care pot avea efecte negative asupra nutriției (creșterea bolilor netransmisibile asociate cu excesul de greutate/obezitatea și creșterea malnutriției asociate cu scăderea consumului de alimente proaspete, bogate în nutrienți, hormoni, antibiotice, puțin procesate) (FSSDG).

1.2 Agenți etiologici implicați în bolile alimentare

Focarele de origine alimentară au devenit mai grave datorită globalizării și comerțului activ cu alimente între țări. Fiecare țară are anumite reglementări privind siguranța alimentară și

controlul bolilor transmise prin alimente, cu toate acestea, în pofida acestor reglementări, numărul bolilor transmise prin alimente este în continuă creștere (Lee et al., 2021). Consumul de alimente contaminate are ca rezultat 600 de milioane de cazuri de boli transmise prin alimente și 420000 de decese în întreaga lume în fiecare an. Populația pe glob constituie în prezent de 7,8 miliarde și 56 de milioane de oameni mor în fiecare an, dintre aceștia, în fiecare an, 7,69 % dintre oameni se confruntă cu boli de etiologie alimentară, iar 7,5 % din decesele anuale (56 de milioane de decese) au murit din cauza bolilor de origine alimentară în lume (Wu et al., 2013; Faour-Klingbeil et al., 2020; WHO). La nivel global, bolile alimentare cauzate de bacterii (226526634) au fost mai frecvente decât cele cauzate de virusuri (138513782) și paraziți (10284561) (Lee et al., 2021).

Bacteriile sunt cea mai frecventă cauză a bolilor transmise prin alimente. Unele au capacitatea de a produce spori și, prin urmare, sunt foarte rezistente la căldură (ex: *C. botulinum*, *C. perfringens*, *B. subtilus*). Altele produc toxine rezistente la căldură. Majoritatea agenților patogeni sunt mezofili, temperatură optimă de creștere de la 20 °C la 45 °C. Dar unele bacterii patogene de origine alimentară (ex: psicrotrofe), cum ar fi *L. monocytogenes* și *Y. enterocolitica*, sunt capabile să prolifereze în condiții de refrigerare sau la temperaturi mai mici de 10 °C.

Virusurile sunt particule aceluare, ce necesită gazda ca să își mențină vitalitatea și sunt incapabili de supraviețui în afara gazdei. S-a demonstrat, că peste 100 de tipuri de virusuri enterice cauzează boli de origine alimentară, cei mai frecvenți agenți patogeni virali de origine alimentară sunt hepatita A și norovirusurile, Enterovirusurile (Bintsis, 2017).

Un număr relativ redus de fungi de origine alimentară provoacă infecții la om. Din punct de vedere al siguranței alimentelor, sunt mai importante micotoxinele produse de fungii care contaminează alimentele mai degrabă decât fungii în sine. Micotoxinele sunt compuși toxici care sunt produși de diverse tipuri de mucegaiuri. Mucegaiurile care pot produce micotoxine cresc pe numeroase alimente precum cereale, fructe uscate, nuci și condimente. Micotoxinele pot provoca o varietate de efecte adverse asupra sănătății și reprezintă o amenințare gravă pentru oameni și animale (Johannessen et al., 2005; WHO, 2015). În linii generale, spectrul agenților cauzali implicați în maladii alimentare este foarte larg (tab.1.1).

Tabelul 1.1. Agenții cauzali implicați în maladii alimentare*

Categoriile de microorganisme	Specii patogene
Bacterii	<p>Bacterii frecvent implicate în etiologia IA: <i>Salmonella</i> spp. (<i>S. Typhimurium</i>), <i>E. coli</i> (ECEH), <i>C. jejuni</i>, <i>C. perfringens</i>, <i>B. cereus</i>, <i>E. coli</i>, (EIEC), (EPEC), (ETEC), (EAEC), <i>L. monocytogenes</i>, <i>Shigella</i> spp., <i>S. aureus</i>, <i>S. Enteritidis</i>, <i>Streptococcus</i> spp., <i>V. cholerae</i> O1 și non-O1, <i>V. parahaemolyticus</i>, <i>V. vulnificus</i>, <i>Y. enterocolitica</i>, <i>Y. pseudotuberculosis</i></p> <p>Bacterieni cu o frecvență redusă în etiologia IA: <i>Brucella</i> spp., <i>C. ulcerans</i>, <i>C. burnetiid</i>, <i>P. shigelloides</i></p>

Continuare tabelul 1.1.

Virusuri	<i>Enterovirusurile, Virusul Hepatitei A, Virusul Hepatitei E, Norovirusurile Rotavirusurile</i>
Fungi (<i>micotoxinele produse de fungi</i>)	<i>Fusarium spp., Alternaria spp., Penicillium spp., Aspergillus spp., Alternaria spp., Candida spp., Fusarium spp.</i>
Paraziți de origine alimentară (zoonoze):	Platyhelminthes: <i>Diphyllobothrium spp., Nanophyetus spp., Taenia saginata Taenia solium, Fasciola hepática</i> Nematode: <i>Anisakis spp., Ascaris lumbricoides, Eustrongylides spp., Trichinella spiralis, Trichuris trichiura</i>
Protozoare:	<i>Acanthamoeba și alte amoebe free-living, Cryptosporidiosis, Cyclospora cayetanensis, Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Sarcocystis hominis Sarcocystis suihominis, Toxoplasma</i>

Notă: *Lee et al., 2021; Bintsis, 2017, Adeyeye, 2016; IA, infecții alimentare; EHEC, *E. coli* enterohemoragică; EIEC, *E. coli* enteroinvazivă; ETEC, *E. coli* enterotoxigenă; EPEC, *E. coli* - enteropatogenă.

Astfel, bacteriile sunt cel mai frecvent implicate în etiologia bolilor alimentare, urmate de virusuri și paraziți. S-a menționat, că virusurile dețin un loc important în apariția bolilor alimentare. Conform tabelului 1.1 se observă că, în afară de virusuri și paraziți, *E. coli* și *Salmonella* spp., și *L. monocytogenes* sunt frecvent izolate în cazul infecțiilor alimentare. Aceste bacterii sunt în general izolate de la „food-producing animals”, fiind asociate cu boli și focare de origine alimentară în lume (Lee et al., 2021).

1.3 Epidemiologia bolilor alimentare

Maladiile alimentare, numite uneori „boli alimentare”, „infecții alimentare” sau „intoxicații alimentare” prezintă o problemă de sănătate publică comună, costisitoare, dar care poate fi prevenită. Bolile alimentare constituie o cauză importantă de morbiditate și mortalitate la nivel mondial. Comerțul internațional, migrația, călătoriile și globalizarea producției alimentare sunt un risc mare de transmitere transfrontalieră a bolilor transmise prin alimente și a altor boli infecțioase, potrivit Scientific Committee on Enteric Infections. Poluarea și contaminarea alimentelor se poate produce în orice etapă de producție: creștere, recoltare, procesare, depozitare, expediere sau pregătire. Aceasta contaminare încrucișată este periculoasă pentru alimentele crude, gata de consum, cum ar fi salatele sau alte produse (Shikha et al., 2020; Karanth et al., 2023).

Maladiile alimentare sunt larg răspândite. Persoanele în vârstă și copiii sunt mai expuși la infecții alimentare deoarece receptivitatea către îmbolnăvire e mare. Bolile cauzate de microorganisme se întâlnesc mai frecvent în timpul cald al anului, corespunzător studiilor Catedrei de Igienă generală, USMF și a cercetărilor unor savanți (Shikha et al., 2020; Karanth et al., 2023).

Sursa de infecție în toxiinfecțiile alimentare pot fi animale și omul purtător de aceste microorganisme. Animalele frecvent implicate sunt păsările (carnea și ouăle de rață), porcii, rozătoarele (șobolanii și șoarecii), bovinele, ovinele și, mai rar, câinele, pisica sau alte.

Sursa de infecție umană o constituie persoanele bolnave și purtătorii de germeni. Germenii se elimină prin intermediul materiilor fecale, urină, vărsături, secreții nazofaringiene, puroi, etc. Intoxicațiile alimentare se transmit prin intermediul alimentelor. Produsele pot fi contaminate ca atare (laptele sau carnea provenite de la animale bolnave, ouă de rață, etc.) sau pot fi contaminate ulterior, prin contactul cu dejecții de la animale bolnave sau purtătoare de germeni, prin utilaje sau ambalaje contaminate, prin insecte, rozătoare sau prin intermediul personalului (bolnav sau purtător de germeni) care manipulează alimentele, conform studiilor laboratorului Synevo și a Catedrei de Igienă generală, USMF pentru anul 2022. Spațiile de prelucrare a alimentelor pot fi considerate o sursă serioasă de contaminare, mai ales din cauza procedurilor ineficiente de curățare și dezinfecție, iar programele de monitorizare a mediului reprezintă o strategie valabilă pentru îmbunătățirea igienei alimentelor (Schirone et al., 2021).

Mecanismul și doza infectantă. Alimentele contaminate produc îmbolnăviri când conțin un număr mare de germeni sau cantități de toxină capabile să declanșeze boala. Mecanismul de transmitere este **fecalo-oral**, calea de transmitere **alimentară**. Microorganismele care provoacă boli alimentare se pot răspândi de la o persoană la alta pe cale fecal-orală sau pot apărea din contaminarea încrucișată și alți factori asociați cu producția alimentelor, cum ar fi amestecarea alimentelor crude și gătite, igiena personală precară, prepararea insuficientă și alte condiții care favorizează dezvoltarea microbiană. Materia primă poate fi contaminată prin intermediul aerului, solului, animalelor sălbatice, apa de irigare și gunoi de grajd (CDC, 2018; Schirone et al., 2021).

Perioada dintre consumul de alimente contaminate și apariția primelor simptome de boală se numește **perioada de incubație**. Această perioadă variază de la ore la zile (și rar luni sau chiar ani, cum ar fi în cazul listeriozei sau encefalopatiei spongiforme bovine), în funcție de agentul cauzal și de cantitatea de bacterii ingerată. Dacă simptomele apar în decurs de una până la șase ore după consumarea alimentelor, sugerează că aceasta este cauzată de o toxină bacteriană.

Doza infecțioasă este cantitatea de microorganisme ce duce la apariția primelor semne specifice de boală alimentară și variază în funcție de agent și de vârsta consumatorului și de starea generală. Doza infecțioasă variază în dependență de tipul microorganismului. De exemplu, *Shigella sonnei* are o doză infecțioasă scăzută de < 500 de unități formatoare de colonii (UFC), în timp ce *Staphylococcus aureus* are o cantitatea necesară e mai mare. În cazul *Salmonella*, este necesar un inocul relativ mare de 1 milion până la 1 miliard organisme pentru a produce simptome la voluntari umani sănătoși (Lee et al., 2013).

Date estimative la nivel mondial și național. „Mâncarea ar trebui să susțină și să asigure sănătatea umană, nu să o dăuneze” conform Organizației Mondiale a Sănătății (WHO, 2021). Sistemul alimentar, ca și sistemul de sănătate, este vulnerabil la alterare și contaminare. Alimentele

sunt vehiculul ideal pentru dispersia microorganismelor patogene datorită capacității sale de-a masca agenții nocivi prin arome și mirosuri puternice, texturi diverse sau culori intense. Bolile alimentare, fie că intenționat sau nu, pot paraliza și serviciile de sănătate publică. Sistemele de supraveghere care vizează monitorizarea focarelor de origine alimentară care apar în fiecare an la nivel mondial sunt imperative. Câteva exemple sunt Centrele pentru Evidența și Prevenire a Maladiilor (CDC) care activează în Statele Unite ale Americii (SUA) din 1966 și Centrul European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor (ECDC Evidența) pentru statele membre ale Uniunii Europene (UE), Organizația pentru Alimentație și Agricultură a Națiunilor Unite (FAO) este o agenție specializată a Organizației Națiunilor Unite, cu sediul la Roma, al cărei scop principal este eliminarea foametei pe scară mondială, înființată 16 octombrie 1945 (Schirone et al., 2021).

Un focar alimentar poate fi considerat ca un grup de două sau mai multe boli asociate epidemiologic în timp și spațiu. Datele epidemiologice implică locația focarului, agentul etiologic, demografia pacientului, numărul de cazuri și severitatea acestora, precum și cele mai probabile alimente asociate unor astfel de evenimente (Schirone et al., 2021). Organizația Mondială a Sănătății, după PAHO/WHO pentru anul 2019, a raportat aproximativ 600 de milioane de cazuri de boli transmise prin alimente și 420000 de decese asociate care au loc anual din cauza agenților patogeni (Sarno et al., 2021; QI, et al., 2022).

Conform estimărilor CDC din 2011 pentru raportul privind bolile de origine alimentară, opt agenți patogeni cunoscuți reprezintă marea majoritate a bolilor, spitalizărilor și deceselor. Potrivit rapoartelor anuale EFSA-ECDC, prima și a doua cea mai raportată boală alimentară (zoonoză) la om sunt campilobacterioza și salmoneloza, iar tendința lor în perioada 2015-2019 a fost stabilă. Cele mai frecvente cazuri de îmbolnăviri în Europa, a. 2019, au fost cauzate de *Campylobacter* spp. (lider din 2005), *Salmonella*, *Yersinia* și *Listeria*. Listerioza demonstrând cele mai alarmante date: 20 % din cazurile de listerioză raportate au dus la decesul pacientului (Condalab, 2021; Schirone et al., 2021).

Campilobacterioza este ce-a mai raportată intoxicație alimentară, cu 50 % din toate cazurile raportate în Europa. Tendința din ultimii cinci ani este stabilă, deși a scăzut cu 6,9 % din 2018 până în 2019. Campilobacterioza și salmoneloza au fost raportate în fiecare an, în timp ce listerioza și yersinioza au fost evenimente rare, iar Suedia, Danemarca, Finlanda și Germania au fost principalele țări de consiliere (de referință). Consumul de carne de pasăre contaminată, produse lactate, precum și legume, fructe de mare, apă sau carne gătită necorespunzător, este principala sursă de campylobacter uman (Condalab, 2021; Schirone et al., 2021).

Salmonelle non-tifoide rămân a doua cauză importantă a intoxicațiilor. La fel ca și *Campylobacter*, numărul cazurilor s-a stabilizat în ultimii cinci ani. Salmonellele non-tifoide se

consideră agenții patogeni majori ce cauzează focare de origine alimentară la nivel mondial. S-a raportat 93,8 milioane de cazuri de îmbolnăviri cauzate de salmonele non - tifoide. Circa 155000 de decese au loc în fiecare an în lume și 86 % dintre aceste boli se datorează consumului de alimente contaminate cu *Salmonella* spp. Salmoneloza este a doua cea mai frecventă infecție gastrointestinală la om după campilobacterioză, iar în anul 2019 au fost raportate 87923 de cazuri confirmate, *S. Enteritidis* și *S. Typhimurium*, sunt asociate cu majoritatea focarelor de *Salmonella* transmise prin alimente din întreaga lume. Această boală este detectată predominant la copiii mici, la vârstnici și la pacienții imunocompromiși, ducând la moartea a 400 de persoane în fiecare an din cauza salmonelozei acute în Statele Unite. Cea mai frecventă sursă de contaminare sunt ouăle și produsele din ouă, carnea și produsele din carne, în special carnea de pasăre și porc, dar și produsele de panificație și alte alimente mixte (Condalab, 2021; Schirone et al., 2021).

STEC (*E. coli* producătoare de toxină Shiga) a fost a treia cauză de raportare a toxiinfecțiilor alimentare în Europa, cu 10 decese în 2019 și 11 în 2018. Ca și în ceilalți 9 ani precedenți cu o tendință sporită în lunile de vară. Cea mai frecventă sursă de infecție în ultimii nouă ani au fost carnea de vită, cu 19 focare, și apa îmbuteliată cu 16 focare. Aceasta denotă că controalele STEC ar trebui efectuate nu numai asupra alimentelor, ci și asupra acestui tip de apă (Schirone et al., 2021; Kim et al., 2020).

Yersinioza a demonstrat o tendință foarte stabilă în ultimii 5 ani, menținându-și poziția a patra în lista celor mai frecvente intoxicații (zoonoze) din Europa (Kim et al., 2020). *Yersinia enterocolitica* este cel mai frecvent agent implicat în intoxicații alimentare (yersinioze), ce cauzează diaree, dureri abdominale și febră. Departamentul de Sănătate și Servicii Umane din SUA/Centre pentru Controlul și Prevenirea Bolilor a arătat o creștere semnificativă de 166 % a incidenței *Yersinia enterocolitica* și alte specii, conform datelor din 2017. În anul 2019, focarele și bolile cauzate de *Yersinia* spp. (15 și, respectiv, 149) au fost raportate de șapte state membre ale UE (Danemarca, Finlanda, Franța, Germania, Lituania, Polonia și Suedia), iar *Yersinia enterocolitica* a fost identificat, ca agent cauzal în toate aceste focare (Kim et al., 2020; Condalab, 2021; Schirone et al., 2021).

Listerioza a indus cel mai mare număr de decese (300) cazuri. Zooantroponozele provocate de yersinii, francizele și brucele au fost înregistrate într-un număr mai mic. Listerioza se menține pe locul cinci în lista celor mai frecvente intoxicații alimentare din Europa (Condalab, 2021) reprezentând o boală periculoasă pentru viață în special pentru persoanele imunocompromise și femeii gravide.

În tabelul 1.2 sunt reprezentate incidența și mortalitate cazurilor de infecții alimentare și cazurile de deces în Europa, anii 2019.

Tabelul 1.2 Incidența maladiilor alimentare (zoonozelor) în UE, 2019*

Infecții	Nr. de cazuri confirmate	Nr. de spitalizări	Nr. de decese
Campilobacterioza	220682	20432	47
Salmoneloza	87923	16628	140
Escherichioza	7775	1100	10
Yersinioza	6961	648	2
Listerioza	2621	1234	300
Tularemia	1280	149	1
Bruceloza	310	98	2
Echinococoză	739	209	2
Trichineloza	96	6	7

Notă: * FSA și ECDC (Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară și Centrul European pentru Prevenirea și Controlul Bolilor), 2022 (EFSA).

Conform tabelului 1.2, campilobacterioza ocupă un loc primordial în incidența maladiilor alimentare, cu 220682 de cazuri înregistrate, urmată de salmoneloze și escherichioze (87923 și 7775). În anul 2019, au fost raportate 2621 de cazuri umane invazive confirmate cu o rată de notificare UE de 0,46 cazuri la 100000 de locuitori, în timp ce cazurile de spitalizare au fost de 236. Cu un parcurs stabil pe 2015 - 2019 după o perioadă lungă de creștere. Grupurile de populație care au suferit cel mai mult de listerioză au fost cele peste 64 de ani. Cele mai frecvente alimente asociate cu listerioza sunt produse gata de consumat fiind bogate în proteine și microfloră scăzută și activitate moderată a apei. Prezența și persistența unei astfel de bacterie în mediile de producție a alimentelor reprezintă o preocupare deosebită, ceea ce duce la contaminarea mai multor loturi de produse pe o perioadă lungă de timp, deoarece poate rămâne nedecelată (Condalab, 2021; Schirone et al, 2021).

Situația în Republica Moldova. Spre regret, siguranța alimentelor nu întotdeauna este la nivelul convenit, produsele alimentare fiind deseori contaminate cu microorganisme patogene, infestate cu helminți, sau poluate cu diferiți poluanți chimici. Chiar în țările economic dezvoltate ale Europei în fiecare an suferă din cauza toxiiinfecțiilor alimentare până la 30 % din populație, iar până la 20 persoane la un milion decedează.

Datorită diversității de germeni patogeni, indiferent cărui gen sau familie aparțin, bolile diareice acute au o vastă răspândire, deseori manifestându-se sub formă de izbucniri. În Republica Moldova se înregistrează anual circa 18 - 20 mii de cazuri de boli diareice acute, inclusiv în jur de zece decese. Conform Agenției Naționale pentru Sănătate Publică, în Republica Moldova, în special în perioada verii, anual izbucnesc peste 20 de focare epidemice cu implicarea unui număr de până la 300 de bolnavi. Cele mai frecvente maladii diareice întâlnite în Republica Moldova sunt *Salmonella*, *Campylobacter* și *Escherichia coli* enterohemoragică anual (Gafin et al., 2019).

Îmbolnăvirile prin consum de alimente contaminate microbiologic reprezintă o pondere importantă în problematica medicinei sociale. Fiecare caz de intoxicație alimentară acută are

consecințe economice atât asupra bolnavului, cât și a instituțiilor medico-sanitare ce asigură servicii de sănătate. Conform unui studiu (1990 - 2003), persoanele care au suportat intoxicație alimentară și au lipsit de la serviciu cauzează daune economice propriilor familii și statului. În perioada anilor de studiu 1990-2003 prejudiciile suportate de instituțiile medicale și sanitare în procesul stării epidemiologice constituie 2215871 lei anual, prejudiciul produs de o persoană bolnavă constituie 8014 lei. Acest studiu a demonstrat ca intoxicațiile alimentare indică un caracter permanent, înregistrându-se anual (Leonte, 2008; Gafin et al., 2019).

Problema toxiinfecțiilor alimentare (TIA) rămâne actuală pentru sănătatea publică. Ponderea sporită a toxiinfecțiilor nedescifrate indică asupra problemei existente în diagnosticare din punctul de vedere al spectrului investigațiilor de laborator, dar și în colectarea din focare a materialului patologic de la bolnavi, precum și a produselor implicate. De cele mai dese ori, drept factori de transmitere a germenilor patogeni în TIA au servit carnea și produsele din carne (22,0 - 54,5 %), ouăle și produsele avicole (18,0 - 37,0 %), produsele lactate (9,0 - 11,0 %). Factorii primordiali care au dus la contaminarea produselor alimentare sunt: încălcarea proceselor tehnologice și nerespectarea igienei personale la prepararea bucatelor, implicarea persoanelor bolnave în procesele de manipulare cu alimentele, nerespectarea condițiilor de păstrare și a termenelor de valabilitate a produselor (Mohr, 2016).

Tabelul 1.3 Cazuri de infecții intestinale acute și toxiinfecții alimentare provocate de agenți determinați și nedeterminați anii 2015 - 2020

Perioade/Ani	TA - agenți determinați	TA - agenți nedeterminați
2015	1393	1565
2016	1543	1241
2017	1105	1240
2018	970	1222
2019	789	1145
2020	188	375
2021	39	57
2022	150	1399

Nota: TA- toxiinfecții alimentare

Conform raportului privind unele boli infecțioase și parazitare înregistrate Republica Moldova, Ianuarie - Decembrie 2015-2020, se observă o creștere a cazurilor în anul 2016 (1543) pentru agenții determinați, de asemenea, în anii 2015 și 2017 (tab 1.3). O scădere vădită se observă în anul 2020. Numărul de infecții intestinale acute și toxiinfecții alimentare prevealează în cazul agenților nedeterminați. Cele mai multe cazuri s-au înregistrat în anii 2015 - 2017 (Apostolova et al., 2019). Datele tabelului denotă că în 2021 au fost înregistrate 57 cazuri de toxiinfecții alimentare provocate de agenți nedeterminați, iar în 2022 se constată o majorare sporită de cazuri, în număr de 1399.

1.4 Criza rezistenței la antibiotice

Ținut de mii de ani, oamenii au fost neputincioși în fața diferitor infecții, care au atins proporții epidemice și au costat viața a milioane de oameni. Guvernarea infecțiilor bacteriene în Egiptul antic, Grecia și China este bine documentată și studiată timp de mulți ani. Era modernă a antibioticelor a început odată cu descoperirea penicilinei de către Sir Alexander Fleming în 1928. De atunci, antibioticele au transformat medicina modernă și au salvat milioane de vieți. Pentru prima dată antibioticele au fost prescrise pentru tratamentul unor infecții grave în anii 1940. Penicilina a demonstrat un succes impecabil în controlul infecțiilor bacteriene în rândul soldaților din cel de-al Doilea Război Mondial (Ventola, 2015; Mohr, 2016; Uddin, et al., 2021).

În pofida acestui fapt, la scurt timp după aceea, rezistența la penicilină a devenit o problemă clinică importantă, astfel, în anii 1950, multe dintre progresele deceniului precedent au fost periclitare. Primul caz de rezistență s-a depistat pentru *S. aureus* la meticilină (MRSA). Aceste informații au fost identificate în același deceniu, în Regatul Unit în 1962 și în Statele Unite în 1968. Rezistența a fost observată inițial la stafilococi, streptococi și gonococi, după ce primul antibiotic comercial penicilina a fost introdusă pe piață (Ventola, 2015; Uddin et al., 2021). Cu regret, rezistența la antibiotice a fost observată aproape la toate antibioticele care au fost descoperite. Vancomicina a fost implementată în practica clinică în 1972 pentru tratamentul *S. aureus* meticilin rezistent, cât și la stafilococii coagulazo-negativi. De la sfârșitul anilor 1960 până la începutul anilor 1980, industria farmaceutică a introdus multe antibiotice noi pentru a soluționa problema rezistenței, dar după aceasta producția de antibiotice a început să scadă și mai puține medicamente noi erau implementate (introduse) în practică. Drept urmare, în 2015, la multe decenii după ce primii pacienți au fost tratați cu antibiotice, infecțiile bacteriene au devenit din nou o amenințare (Ventola, 2015).

În medicină și chirurgie antibioticele au realizat un rol esențial, au prevenit și tratat cu succes infecțiile care pot apărea la pacienții care primesc chimioterapie, care au boli cronice cum ar fi diabetul, boala renală în stadiu terminal sau artrita reumatoidă, sau la pacienți cu diverse intervenții complexe cum ar fi transplanturi de organe, proteze articulare sau intervenții chirurgicale cardiace. Antibioticele au avut un impact la prelungirea vieții, în 1920 (SUA), durata medie de viață era 56,4 ani, acum, durata medie de viață este de aproape 80 (Ventola, 2015).

Încă din 1945, Sir Alexander Fleming a tras un semnal de alarmă cu privire la utilizarea excesivă a antibioticelor, când a avertizat că „publicul va utiliza antimicrobienele apoi va începe o eră a abuzurilor” (Ventola, 2015; Uddin et al., 2021). Antibioticele sunt preparate medicamentoase cele mai frecvent prescrise din lume. Intre timp, datorită tulburărilor cauzate de SARS, lumea a reînvațat lecția că bolile infecțioase modelează și vor continua să modeleze destinul

omenirii (CDDEP, 2021). Utilizarea excesivă a antibioticelor a devenit o epidemie modernă. Aceste medicamente ne-au distrus imunitatea naturală. Au ucis bacteriile benefice din intestinul nostru și, de asemenea, au dus la crearea unor super bacterii care s-au dovedit rezistente la aproape orice formă de medicamente prescrise (Muteeb et al., 2023).

Antimicrobienele – inclusiv antibiotice, antivirale, antifungice și antiparazitare – sunt medicamente utilizate pentru prevenirea și tratarea infecțiilor la oameni, animale și plante. Rezistența la antimicrobiene (RAM) se dezvoltă când bacteriile, virusurile, fugnii și paraziții se modifică în timp și nu mai răspund tratamentului medicamentos, infecțiile se tratează dificil și crește riscul de răspândire maladiilor severe și deces (WHO, 2021). RAM este definită ca incapacitatea sau capacitatea redusă a unui agent antimicrobian de a inhiba creșterea unei bacterii, care, în cazul unui organism patogen, poate duce la eșecul terapiei, după EFSA și ECDC. Rezistența la antimicrobiene reprezintă una dintre cele mai mari amenințări cu care se confruntă medicina modernă. Dacă nu se va interveni, se prevede că RAM va duce la 10 milioane de decese până în 2050, care vor fi în mare parte atribuite infecțiilor cauzate de bacterii Gram-negative (BGN).

În funcție de nivelul de rezistență, BGN poate fi clasificate fie ca multi-drog rezistente la medicamente (MDR), extensiv (XDR) rezistente la medicamente sau pan-drog (PDR) rezistente, acesta din urmă prezentând rezistență la toate clasele de antibiotice (Annunziato, 2019; Impey et al., 2020).

RAM este un proces natural ce permite supraviețuirea microorganismelor. Acest mecanism este accelerat prin creșterea gradului de utilizare a antibioticelor: presiunea selectivă permite răspândirea mutațiilor care promovează supraviețuirea, scurtând timpul necesar bacteriilor pentru a dobândi rezistență la medicamente noi, conform CDDEP pentru anul 2021. Presiunea pe care antimicrobienele o exercită asupra agenților patogeni este responsabilă pentru selecția tulpinilor rezistente. Pentru a supraviețui, germeii dezvoltă strategii de apărare împotriva antibioticelor, făcându-le aparent ineficiente - numite mecanisme de rezistență. Bacteriile posedă diverse mecanisme ce le asigură protecția și rezistența față de antibiotice.

Tipurile de rezistență la antibiotice. Rezistența naturală și dobândită sunt cele două forme principale de rezistență la antibiotice. Rezistența poate fi înăscută sau mediată (genele sunt prezente în mod normal în bacterii, dar sunt activate doar după tratamentul cu antibiotice). Rezistența dobândită poate fi rezultatul dobândirii de către bacterii a materialului genetic prin translație, conjugare, transpunere sau mutații în propriul său ADN cromozomial (Uddina et al., 2021). O tulpină bacteriană poate dobândi rezistență prin mutație, prin absorbția de gene exogene prin transfer orizontal de la alte tulpini bacteriene sau prin activarea/declanșarea unei cascade genetice, inducând astfel expresia mecanismelor de rezistență (EFSA și ECDC, 2021).

Există patru mecanisme prin care bacteriile devin rezistente la antibiotice:

- 1) Alterarea receptorilor pentru antibiotic și modificarea țintei de atac.
- 2) Inactivarea enzimatică a antibioticului, care poate fi hidrolizat (penicilinază, cefalosporinază) sau modificat structural (acetilaze, adenilaze, fosforilaze), etc.
- 3) Diminuarea permeabilității membranare (diminuarea pătrunderii medicamentului în celulă).
- 4) Eliminarea rapidă a AB (sisteme de eflux), (fig.1.1).

Alterarea țintei de atac este mecanismul ce constituie una dintre cele mai problematice rezistențe la antibiotice din lume. Acest mecanism este implicat în cazul rezistenței la meticilină în rândul *S. aureus*. Modificările împiedică fixarea antibioticului și limitează potența acestuia.

Cel mai comun mecanism prin care bacteriile sunt rezistente la antibiotice este producerea de enzime care inactivează medicamentele. Bacteria elaborează o enzimă ce interacționează cu antibioticul, ca urmare medicamentul devine inefficient. De exemplu, antibioticele β -lactamice (peniciline și cefalosporine) pot fi inactivate de enzime cunoscute sub numele de β -lactamaze.

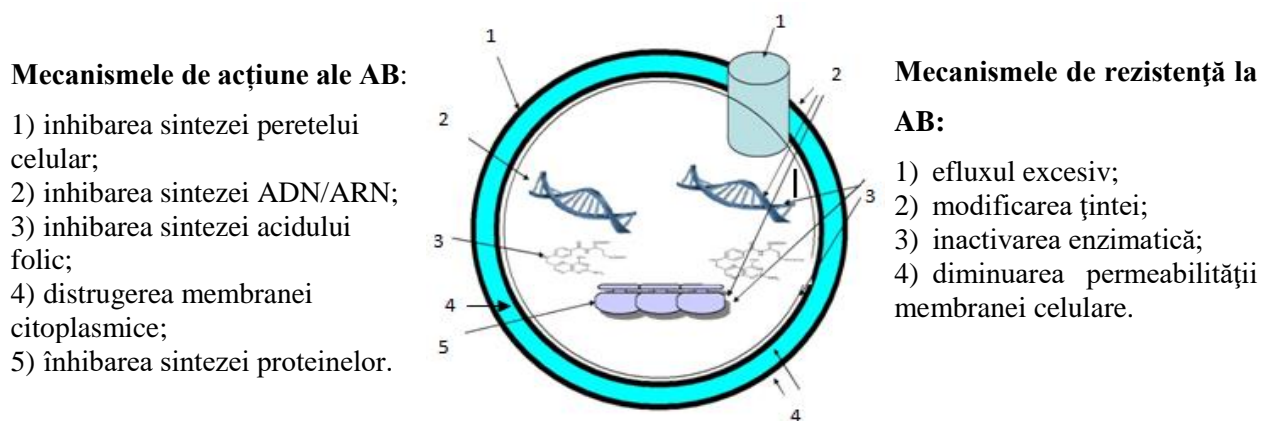


Figura 1.1. Mecanisme de rezistență a bacteriilor la antibiotice (Darby et al., 2023).

Bacteriile sunt intrinsec rezistente la multe medicamente pe baza exclusivă a faptului că medicamentele nu pot pătrunde în peretele celular sau membrana celulară bacteriană. În plus, bacteriile pot dobândi rezistență la un medicament printr-o alterare a porinelor (proteinelor membranare), care formează canale în membrana celulară. Rezistența, pe care *Pseudomonas aeruginosa* o prezintă la o varietate de peniciline și cefalosporine este mediată de o alterare a proteinelor din porine.

Au fost descrise sisteme de transport active (pompe de eflux) pentru îndepărtarea unor antibiotice (cum ar fi tetraciclinele, macrolidele și chinolonele) din celulele bacteriene. Aceste sunt proteine, care sunt capabile să extrudeze o mare varietate de compuși (inclusiv antibiotice) din celulă. Acestea sunt supraexprimate de bacterii pentru a elimina antibioticul. În aceste situații, chiar dacă medicamentul poate pătrunde în celula bacteriană, efluxul activ al agentului îl împiedică să se acumuleze și să interfereze cu metabolismul sau replicarea bacteriilor. Acesta este un

mecanism important de rezistență la *P. aeruginosa* și *Acinetobacter* spp. (Annunziato, 2019; Mann et al., 2021; Uddina et al., 2021).

O listă extinsă de bacterii RAM a fost publicată de Organizația Mondială a Sănătății (OMS). Agenții patogeni sunt clasificați : critici, intensivi și moderați, iar această clasificare se bazează pe mortalitate, nivelul de rezistență și tratament. Situația este extrem de critică în infecțiile cauzate de ESKAPE, Gram-negative, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Enterobacter*. Carbapenemele sunt considerate antibiotice de ultimă generație, acești agenți sunt rezistenți la aceste antimicrobiene. Bacteriile din această listă pot cauza infecții periculoase precum bacteremii și septicemii, pneumonii severe, iar contracararea acestui fapt este considerată drept o prioritate globală în materie de sănătate (Annunziato, 2019).

Rezistența antimicrobiană prezintă un pericol clar și prezent pentru sănătatea globală. Numărul de infecții cauzate de bacterii multirezistente este în creștere pe tot globul pământesc, iar pericolul infecțiilor netratabile se conturează de la începutul secolului al XXI-lea. Conform raportului Organizației Mondiale a Sănătății din 2019, RAM este responsabilă pentru decesul a 700.000 de persoane, în timp ce se estimează că până în 2050 cifra va crește la 20 de milioane, valorând peste 2,9 trilioane de dolari (Uddina et al, 2021). Conform (CDC) Antibiotic Resistance Threats Report 2019 din Statele Unite, peste 2,8 milioane de infecții rezistente la antibiotice apar în Statele Unite pe an, provocând peste 35.000 de decese. Potrivit raportului, în India, un copil moare din cauza unei infecții bacteriene rezistente la antibiotice la fiecare 9 minute și este probabil ca peste 50.000 de nou-născuți să moară din cauza sepsisului cauzat de rezistența microbilor la antibioticele comune utilizate în India.

Potrivit raportului Rețelei europene de supraveghere a rezistenței la antimicrobiene (EARS-Net), în perioada 2015-2019, au existat modificări ale frecvenței rezistenței la antimicrobiene în întreaga Uniune Europeană în funcție de speciile de bacterii, clasa de antibiotice și locația geografică. Conform acestui raport s-a stabilit un clasament al bacteriilor rezistente la antibiotice: *E.coli* (44,2 %), urmată de *S. aureus* (20,6 %), *K. pneumoniae* (11,3 %), *E. faecalis* (6,8 %), *P. aeruginosa* (5,6 %), *S. pneumoniae* (5,3 %), *E. faecium* (4,5 %), and *Acinetobacter spp.* (1,7 %). Aceste tipuri au fost cele mai frecvent bacterii identificate rezistente la antibiotice (Uddina et al., 2021).

Cauzele din spatele crizei rezistenței la antibiotice. Amplificarea rezistenței la antibiotice poate fi declanșată de diferiți factori, cum ar fi utilizarea inadecvată a antimicrobienulelor în medicina umană și veterinară, condițiile și practicile precare de igienă în mediile de asistență

medicală sau în lanțul alimentar, care facilitează transmiterea microorganismelor rezistente (EFSA și ECDC, 2021).

Obiectivul principal al microorganismelor este să se reproducă, să supraviețuiască și să se răspândească, fapt ce le oferă posibilitatea să se adapteze în timp și la diverse condiții. Această motive implică:

- utilizarea excesivă și abuzul de antibiotice,
- diagnostic incorect și prescrierea neadecvată a antibioticelor,
- auto-medicația,
- mediu înconjurător nociv,
- igiena personală precară,
- utilizarea diferitor clase de substanțe de sinteză pe scară largă în agricultură (Ventola, 2015; Uddin et al., 2021).

Utilizarea excesivă și abuzul de antibiotice. Abuzul antibioticelor are consecințe la nivel individual, comunitar și de mediu (Annunziato, 2019; Uddina et al., 2021). Nașterea și propagarea agenților patogeni rezistenți la medicamente continuă să ne amenințe capacitatea de-a trata infecțiile comune. Utilizarea excesivă a antibioticelor conduce în mod cert la progresul rezistenței. Administrarea antibioticelor neargumentată, când acestea nu sunt necesare sau utile, contribuie la diseminarea rezistenței la antibiotice. De exemplu, majoritatea cazurilor de faringită sunt virale, respectiv antibioticele nu vor fi utile. Chiar și infecțiile auriculare se ameliorează adesea fără antibiotice (Ventola, 2015; Uddina et al., 2021). În multe țări cu venituri mari și medii, antibioticele profilactice sunt utilizate pe scară largă pentru proceduri obișnuite, cum ar fi operațiile cezariene, înlocuirea articulațiilor și transplanturile de organe. Antibioticele sunt administrate profilactic și pacienților supuși chimioterapiei, ceea ce scade imunitatea (Chokshi et al., 2019). Bacteriile profită de orice ocazie de-a se înmulți. Administrarea frecventă de antibiotice din motive greșite poate dezvolta diverse modificări în interiorul bacteriilor, ca urmare antibioticele devin ineficiente (Ventola, 2015; Uddina et al., 2021). Antibioticele au proprietatea de-a rămâne neschimbate după consumare și rămân biologic active. De exemplu, 60 % din amoxicilină ingerată de oameni sau animale este secretată în urină fără modificări, ajungând în mediul ambiant. Preparatele antibacteriene nu sunt folosite doar pentru tratamente umane. De fapt, la nivel global, 73 % dintre antibiotice sunt folosite pentru a îngrășa vitele, porcii și păsările pentru consum uman. De regulă, contaminarea cu antibiotice și bacterii rezistente răspândite în mediu este universală. Acesta este modul în care impactul utilizării greșite individuale a antibioticelor se extinde asupra comunității și mediului (Vidovic et al., 2020).

Diagnosticul incorect și prescrierea neadecvată al antibioticelor. În timpul diagnosticării unei infecții, profesioniștii din domeniul sănătății se bazează uneori pe cunoștințe nesigure sau inexacte, prescriind un antibiotic „pentru orice eventualitate” sau un antibiotic cu spectru larg atunci când un anumit antibiotic cu spectru îngust ar putea fi mai potrivit (Uddina et al., 2021). Diagnoza medicală incorectă, abuzul de antibiotice și utilizarea excesivă când nu este necesitate, contribuie la dezvoltarea antibioticorezistenței (Chokshi et al., 2019). Antibioticele prescrise incorect contribuie la promovarea bacteriilor rezistente. Concentrațiile de antibiotice subinhibitoare și subterapeutice induc la apariția diverselor mecanisme de rezistență, cum ar fi modificări ale expresiei genelor și mutageneza (Ventola, 2015).

Auto-medicația, pierderea sensibilității pacientului. Auto-medicația cu antibiotice este legată de utilizarea necorespunzătoare a medicamentelor, ceea ce expune pacienții la risc de reacții adverse la medicamente, mascând semnele bolilor subiacente și dezvoltarea de bacterii antibioticorezistente. În majoritatea țărilor în curs de dezvoltare, există puține legi privind vânzarea medicamentelor. Disponibilitatea ușoară a antibioticelor este una dintre cele mai mari contribuții la rezistența antimicrobiană. Antibioticele sunt disponibile adesea fără prescripția medicului, ceea ce contribuie la utilizarea excesivă a antibioticelor din cauza automedicațiilor și prescripțiilor personalului medical necalificat (Chokshi et al., 2019)

Mediu înconjurător nociv, calitatea proastă a antibioticelor disponibile. Multe țări nu au mecanismele necesare de asigurare a calității pentru a se convinge că antibioticele furnizate sunt de înaltă calitate. Ratele de rezistență cresc de 2-6 ori atunci când se utilizează medicamente expirate. Temperaturile ridicate, lumina puternică a soarelui și umiditatea pot duce la degradarea antibioticelor. Dacă condițiile de depozitare și transportare ale medicamentelor se abat de la cele recomandate, atunci este posibil ca un procent mai mare decât cel așteptat de medicamente să fie degradat. Condițiile climaterice, transportul necorespunzător afectează calitatea antibioticelor. În cele din urmă, medicamentele contrafăcute, în care există puțin sau deloc ingredient activ, sunt de asemenea vândute și pot duce la creșterea dezvoltării rezistenței la medicamente și antimicrobiene (Chokshi et al., 2019; Vidovic et al., 2020).

Utilizarea pe scară largă în agricultură. Atât în regiunile industrializate, cât și în cele emergente ale lumii, antibioticele sunt utilizate ca suplimente pentru creșterea animalelor. Tratatamentul animalelor cu antibiotice, ca și în medicina umană, va duce la apariția bacteriilor rezistente la antibiotice. Bacteriile rezistente la antibiotice depistate la animale pot fi patogene pentru oameni, fiind răspândite cu ușurință la oameni prin lanțurile trofice și sunt larg circulat în ecosistem prin deșeurile animale. La oameni, acest lucru poate duce la infecții complexe, netratabile și pe termen lung (Uddina et al., 2021).

1.4.1 Abuzarea excesivă a antibioticelor în agricultură

Antibioticorezistența este o povară imensă care crește constant și se răspândește rapid din ultimul deceniu. Mecanismul primordial responsabil pentru această problemă este abuzul sever a antibioticelor (Mann et al., 2021). Bacteriile implicate în transferul RAM nu se limitează la agenții patogeni de origine alimentară, dar includ saprofiți și microbi din mediu înconjurător. Cunoștințele sunt insuficiente referitor la transmiterea RAM în zonele agricole și la oameni prin alimente de origine animală și vegetală, precum și riscurile pentru sănătatea umană prezentate de pătrunderea în agricultură a preparatelor antimicrobiene (AM). Această problemă nu numai că are un impact asupra productivității și durabilității agriculturii actuale, dar are la bază transferul rezistenței antimicrobiene la agenții patogeni umani prin lanțul de aprovizionare cu alimente (Thanner et al., 2016; Au et al., 2022).

Antimicrobienele sunt utilizate pe scară largă și în agricultură. Antibioticele sunt folosite nu numai pentru tratamentul infecțiilor umane, acestea sunt utilizate abundant în agricultură pentru creșterea productivității culturilor, în creșterea și tratarea animalelor bolnave, cât și în scopuri profilactice pentru prevenirea infecțiilor (Chokshi et al., 2019; Vågsholm et al., 2020; CDDEP, 2021; Mann et al., 2021). Utilizarea abuzivă a antibioticelor a dus la realizarea unei cereri din ce în ce mai mari de diverse produse agricole și animale, dar aplicarea lor pe termen lung chiar și la concentrații sub-terapeutice, direct pe câmp sau indirect prin gunoi de grajd animal afectează negativ microbiota solurilor agricole. După o analiză a consumului global a diverselor antibiotice, s-a determinat că aproximativ jumătate din antibioticele utilizate în întreaga creștere a animalelor sunt consumate în China, Pakistan, Coreea, urmată de SUA, Brazilia, India și Germania (CDDEP, 2021; Mann et al., 2021).

În agricultură, microbiostaticele sunt utilizate cel mai frecvent pentru prevenirea și vindecarea diferitelor boli ale culturilor. În zootehnie și creșterea animalelor, antibioticele frecvent sunt folosite ca agenți de stimulare a creșterii și în prevenirea sau vindecarea infecțiilor. Practicile agricole tradiționale, cum ar fi fertilizarea gunoiului de grajd, au dus la transferul unor cantități mari de antibiotice în mediu (creând condiții pentru bacterii să producă RAM). Gunoiul de grajd facilitează transferul de gene de rezistență antimicrobiană (ARG) către alte specii patogene nu numai în mediul înconjurător, ci și în sistemele de apă dulce din aval. În rezultat, GRA (genele de rezistență) pentru diaminopirimidină, chinolonă și tetraciclină au fost transferate din apele uzate în soluri irigate din apropiere, ape subterane și stații de epurare a apelor uzate, care pot să ajungă către comunitățile umane (Mann et al., 2021; Au et al., 2022). Există cel puțin 30 de antibiotice diferite care sunt utilizate în mod obișnuit în agricultură și creșterea animalelor, printre care macrolidele, penicilinele și tetraciclinele sunt cele mai importante. Numai în creșterea animalelor,

consumul mediu anual de antibiotice a fost estimat la 172 mg/kg la porci, 148 mg/kg la pui și 45 mg/kg la bovine în întreaga lume (Mann et al., 2021). Raportul de supraveghere elvețian a arătat că 49.250 kg de AM pentru uz veterinar au fost vândute în Elveția în 2014 (Thanner et al., 2016).

Criza rezistenței la antibiotice a fost o preocupare tot mai mare de la descoperirea penicilinei și este abordată prin dezvoltarea continuă a noilor antibiotice. Evoluția RAM nu este caracteristică doar agenților patogeni umani, dar a fost observată la animale și la produsele alimentare din agricultură. Mai ales în ultimul deceniu, un număr crescut de *Salmonella* și *E. coli* izolate de la oameni, produse alimentare și animale s-au dovedit a fi rezistente la cel puțin 6 sau mai multe clase de antimicrobiene utilizate în mod obișnuit. Literatura din ultimul deceniu arată că dezvoltarea RAM este în creștere în bacteriile patogene transmise prin alimente din diferite surse agricole, unele tulpini devenind rezistente la mai multe clase de antimicrobiene (Thanner et al., 2016). În studiile efectuate de Avantika Mann et al. 2021 referitor la solurile din câmpurile agricole au constatat prezența mai multe gene (*erm* (C), *erm* (V), *erm* (X), *msr* (A), *ole* (B) și *vga*) responsabile pentru rezistența la eritromicină, prezente în sol. Utilizarea necontrolată a antibioticelor a cauzat apariția și eliberarea de GRA (Gene de rezistență la antimicrobiene) în mediu. S-a remarcat că bacterii precum *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *K. pneumonia*, *K. oxytoca*, *S. aureus*, *Proteus* spp. și *Y. enterocolitica* s-au dovedit a fi rezistente la cefalosporine. Aceste specii sunt responsabile și de intoxicații alimentare. Cu toate că cefalosporinele se utilizează limitat la animale în comparație cu medicina umană, totuși se observă rezistența bacteriilor la aceste preparate izolate de la animale. Aceasta denotă că RAM (rezistența la antimicrobiene) este transmisă din diferite medii către animale și apoi către oameni (Mann et al., 2021).

Rezistența la antimicrobiene nu s-a limitat doar la tulpinile izolate de la animale și din produsele lor, ci a fost identificată și la tulpinile izolate din solurile agricole (Mann et al., 2021). Utilizarea în agricultură a antibioticelor afectează și microbiomul mediului. Conform datelor prezentate de C. Lee Ventola (2015) aproximativ 90 % din antibioticele administrate animalelor sunt excretate în urină și materii fecale, apoi sunt dispersate pe scară largă prin îngrășăminte, apele subterane și scurgerile de suprafață. Adicional tetraciclinele și streptomicina sunt pulverizate pe pomi fructiferi pentru a acționa ca pesticide în vestul și sudul SUA. Această procedură reprezintă o proporție mult mai mică din utilizarea generală a antibioticelor, răspândirea geografică rezultată poate fi considerabilă. Această practică contribuie, de asemenea, la expunerea microorganismelor din mediu la agenți de inhibare a creșterii, modificând ecologia mediului prin creșterea proporției de microorganisme rezistente față de microorganisme susceptibile. Produsele antibacteriene vândute în scopuri de igienă sau de curățare pot contribui și ele la această problemă, deoarece pot limita dezvoltarea imunității la antigenele de mediu atât la copii, cât și la adulți. În consecință,

sistemul imun este afectat, crescând morbiditatea și mortalitatea din cauza infecțiilor care sunt oportuniste și avirulente (Ventola, 2015).

Întrucât există o legătură solidă între sol, plante și animale, răspândirea antibioticelor și a rezistenței la antibiotice în mediul nostru nu se limitează numai la un singur ecosistem. Antibioticele se răspîndesc prin toate aceste sisteme și crează o rețea în care GAR (gene de rezistență la antimicrobiene) se distribuie peste tot (Mann et al., 2021). La fel și pescuitul (acvacultură), contribuie la difuzarea antibioticelor în ecosisteme (Ventola, 2015; CDDEP, 2021). Cu toate acestea, există și alți câțiva factori care sunt responsabili pentru mișcarea genelor de rezistență la antibiotice. Acestea includ forțe fizice precum vântul, bazinul de apă și activitățile umane, care au dus la o creștere a rezistenței în rândul bacteriilor patogene comune (Mann et al., 2021). Infecțiile rezistente la antibiotice sunt o povară colosală pentru sănătatea umană și economia globală.

1.4.2 Alimentele vehicul pentru răspândirea bacteriilor rezistente la antimicrobiene

Astăzi RAM (rezistența la antimicrobiene) este o pandemie taciturnă pentru care utilizarea antimicrobienele în producția de alimente este un factor major la nivel global (Vågsholm et al., 2020). Animalele pentru hrana sunt considerate rezervoare cheie de bacterii rezistente la antibiotice, utilizarea antibioticelor în industria de producție alimentară contribuind la declanșarea globală a RAM. Nu există granițe geografice care să împiedice răspândirea la nivel mondial a RAM (Founou et al., 2016). Creșterea globală a consumului de proteine animaliere se numără printre schimbările importante ale timpului nostru. Animalele crescute pentru consumul uman constituie aproape 60 % din biomasa totală de mamifere de pe planetă (CDDEP, 2021). Asemenea intensificării emisiilor de carbon din activitatea industrială, creșterea colosală a consumului de proteine animale are efecte profunde atât asupra mediului, cât și asupra sănătății umane (CDDEP, 2021; Tiseo et al., 2020).

Transmiterea bacteriilor rezistente la om de către animalele a fost observat pentru prima dată în urmă cu 35 ani, când au fost găsite cazuri de rezistență la antibiotice în flora intestinală atât a animalelor de fermă, cât și a fermierilor. Oamenii pot fi expuși la bacterii rezistente la antimicrobiene din lanțul alimentar în mai multe moduri. Antimicrobienele folosite în industria animalieră sunt ingerate de oameni atunci când consuma alimente. Alimentele crude sau insuficient gătite conțin mai multe microorganisme decât alimentele gătite, inclusiv bacterii rezistente la antimicrobiene, derivate din producția primară, după Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP, 2021) și Raportul Comitetului Științific (Report of the Scientific Committee, 2015).

Surse și căi de răspândire a RAM:

- Sursa primordială de bacterii rezistente la antimicrobiene care intră în lanțul alimentar sunt alimentele **de origine animală**. Principalul motiv de îngrijorare îl reprezintă germenii rezistenți la antibiotice achiziționați de la animale. Agenții patogeni zoonotici importanți în ceea ce privește RAM în Irlanda în prezent sunt *Salmonella* și *Campylobacter*. Conform datelor de supraveghere europene, carnea de pasăre, porc și vită, ouăle contaminate, sunt considerate sursă esențială în ceea ce privește transmiterea tulpinelor de *Salmonella*, rezistente la antibiotice. Cauza constă în faptul, că animalele sunt tratate cu aceleași clase de antibiotice ca și cele utilizate în scopuri medicinale la oameni (Report of the Scientific Committee, 2015).

- Alimente de origine **non-animală (vegetale)**. Produsele de origine vegetala în ultimii ani atrag tot mai mult consumatorii, datorită reputației lor de a fi sănătoase și valoarea energetică scăzută. Întrucât produsele proaspete sunt adesea consumate crude, acestea pot fi o sursă de boli de origine alimentară. Prezența bacteriilor rezistente la antibiotice poate prezenta un risc deosebit pentru consumator (Report of the Scientific Committee, 2015; Hölzel et al., 2018). Din ce în ce mai multe alimente de origine non-animală sunt recunoscute ca surse importante de infecție alimentară în Europa. Pe baza datelor raportate privind focarele europene din 2007 până în 2011, alimentele de origine non-animală au fost asociate cu 10 % dintre focare. Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (AESA) a constatat, că legumele cu frunze verzi consumate crude, urmate de radăcinoase și roșii sunt preponderent sursă de infecție cu *Salmonella* spp. Păstăi proaspete, leguminoase sau cereale sunt surse de contaminare cu *E. coli*. Similar cu alimente de origine animală, alimentele de origine non-animală pot fi contaminate cu bacterii rezistente la antimicrobiene în timpul producției primare sau într-o etapă ulterioară (Report of the Scientific Committee, 2015; Founou et al., 2016).

- **Comerțul** cu alimente de origine animală și vegetală. Rezervoare cheie de bacterii rezistente la antibiotice sunt considerate animalele, utilizarea antibioticelor în producția alimentară contribuie la provocarea globală actuală a RAM (Founou et al., 2016).

Tendința globală în producția de alimente de origine animală este în creștere rapidă. Există o contribuție tot mai mare la piața mondială din partea țărilor în curs de dezvoltare și intensificarea sistemelor de producție în aceste țări. Țările au sisteme de creștere diferite, cu diferențe mari în dependență utilizarea antimicrobiene în creșterea animalelor. Organizația internațională pentru sănătatea animală (OIE) a recunoscut necesitatea de-a sprijini țările în curs de dezvoltare în eforturile lor de-a aborda RAM. În prezent, există puține date care să indice dacă există diferențe în nivelurile de RAM în produsele casnice, în comparație cu alimente de import. Deoarece nu există un standard UE pentru bacteriile rezistente la antimicrobiene din alimente, considerațiile

pentru prelevarea de probe pentru AMR nu sunt parte a procesului de control la frontieră. Odată ce un produs a intrat în UE, acesta poate fi comercializat liber între membrii UE state fără alte restricții (Report of the Scientific Committee, 2015; Founou et al., 2016).

- **Apa** ca sursa și cale de transmitere a RAM. Apa potabilă este vehicul direct pentru transmiterea microorganismelor rezistente la antimicrobiene atunci când este contaminată cu fecale animalelor sau umane și un vehicul potențial pentru reziduurile antimicrobiene. Contaminarea alimentelor prin apă poate apărea în timpul producției primare, cu apă contaminată în timpul irigațiilor culturilor sau procesarea alimentelor, de ex: ca ingredient contaminat. Apa poate fi impurificată cu deșeurile animaliere sau alte lichide ce conțin antibiotice (urină, fecale și alte fluide corporale, inclusiv lapte) (Report of the Scientific Committee, 2015).

- **Produce probiotice și alte alimente fermentate.** Probioticele sunt alți factori implicați în răspândirea rezistenței antimicrobiene în lanțul alimentar. Probioticele sunt „microorganisme vii. Se știe că bacteriile probiotice adăpostesc elemente genetice intrinseci și mobile care conferă rezistență la o mare varietate de antibiotice. Cantitățile lor mari în suplimente alimentare pot stabili un rezervor de gene rezistente la antibiotice în intestinul uman. Aceste gene rezistente pot fi transferate la agenți patogeni care împărtășesc același habitat intestinal. Probioticele sunt incluse în alimente, cum ar fi produsele lactate, cum ar fi iaurtul, brânza și laptele, precum și suplimentele alimentare. Există studii care indică faptul că bacteriile rezistente la antimicrobiene poate fi ocazional izolate din alimentele fermentate (Zheng et al., 2017). Aceste bacterii (de obicei bacterii cu acid lactic) nu sunt asociate în mod normal cu bolile umane, dar pot infecta persoanele imunodeprimăte. În plus, ele ar putea prezenta un pericol indirect, acționând ca un rezervor de determinanți transmisibili rezistenți la antimicrobieni (Report of the Scientific Committee, 2015).

- **Ambalaje alimentare.** Recipiente alimente infectate sau colonizate sunt o sursă potențială de organisme rezistente la antimicrobiene și pot contamina alimentele. Acest risc se amplifică dacă nu aplică bune practici de igienă. Conform unor rapoarte ce demonstrează prezența *E. coli* la lucrători din industria alimentară. Au fost documentate cazuri și de *Staphylococcus aureus* și *Salmonella* spp., la lucrători din sfera alimentației.

- **Plantele modificate** genetic au fost evaluate pentru potențialul lor de a acționa ca o cale de transmitere a RAM.

- **Biocide și culturi transgenice.** Studiile experimentale au arătat că unele biocide utilizate la concentrații subletale pot declanșa apariția AMR și/sau bacterii selectate rezistente la antimicrobiene (Report of the Scientific Committee, 2015; Mann et al., 2021).

Rețeaua complexă de interacțiuni dintre oameni și animale duce la transmiterea agenților infecțioși și a rezistenței la antibiotice a agenților patogeni umani. Utilizarea antibioticelor la animalele poate duce la apariția epidemiilor de boli rezistente la microbiocide, crește colonizarea intestinului cu bacterii rezistente și induce rezistență în flora normală a tractului gastrointestinal (Chokshi et al., 2019). Apariția RAM de-a lungul lanțului alimentar este, prin urmare, o problemă majoră de sănătate publică la nivel mondial. Mai multe studii au raportat că animalele și produsele alimentare au fost colonizate și infectate și contaminate cu tulpini rezistente la antibiotice, cum ar fi *Staphylococcus aureus* rezistent la metilicilină (MRSA), *Campylobacter spp.* rezistente la antibiotice și Enterobacteriaceae producătoare de beta-lactamaze cu spectru extins. Situația s-a înrăutățit recent odată cu apariția bacteriilor rezistente la antibiotice cu potențial pandemic semnificativ, cum ar fi Enterobacteriaceae rezistente la carbapenem (purtoare de carbapenemază VIM-1 rezistentă la familia de antibiotice beta-lactamice plus corezistență suplimentară) și *E. coli* rezistentă la colistină (purtoare de gena *mcr-1* și gene de corezistență) (Founou et al., 2016).

Antimicrobienele sunt o componentă esențială a sistemelor de agricultură și sunt utilizate pentru tratarea și prevenirea infecțiilor și pot fi, de asemenea, utilizate în hrana animalelor pentru intensificarea creșterii (tab. 1.4.).

Tabelul 1.4. Antibiotice utilizate în agricultură și creșterea animalelor *

Arial (zona)	Antibiotice utilizate
Agricultură	Oxitetraciclină, streptomycină, penicilină, acid oxolinic, gentamicina
Producția cărnii de porc	Benzilpeniciline și tetraciline (cel mai frecvent utilizate), sulfadimidină, sulfatiazol și trimetoprim, bacitracină, lincosamide, macrolide, florochinolone, cefalosporine de generația a 3-a, colistina
Producția cărnii de pasăre	Bacitracină, clortetraciclină, decochinat, diclazuril, naracin, nicarbazin, monensin, penicilină, clorhidrat de rebenedină, virginiamicina, colistina, tilozină, doxiciclină, tiamulină, roxitromicină, amicacină
Producția cărnii de vită	Peniciline, tetraciline, ceftiofur, florfenicol, tilmicosin, enrofloxacin, tulatromicin, fenicol, lincosamide, pleuromutilin, macrolide, polipeptide, streptogramine, carbadox, bambermicin

Notă: *Mann et al., 2021.

Consumul de antimicrobiene la animale este aproape triplu față de cel al oamenilor și este un factor principal al creșterii producției de proteine animale. Cercetările de la CDDEP și colaboratorii au descoperit că, în 2013, consumul global al tuturor antimicrobienele la animalele alimentare a fost de 131109 de tone și se estimează că va ajunge la 200.235 de tone până în 2030. Pentru creșterea porcilor cantitatea de antimicrobiene a constituit 45 % între 2017 și 2030. Bovinele au avut cea mai mică creștere a consumului de antimicrobiene, reprezentând doar 22 % din creșterea globală. Păsările au contribuit cu 33 % la creșterea globală a consumului de antimicrobiene. Consumul de antimicrobiene variază în dependență de țară (Tiseo et al., 2020; CDDEP, 2022).

În 2017, China a fost cel mai mare consumator de antimicrobiene veterinare, reprezentând 45 % din utilizarea globală și se estimează că va rămâne cel mai mare consumator în 2030 (43 %). Primii 10 consumatori de antimicrobiene veterinare în 2017 au fost: China (45 %), Brazilia (7,9 %), Statele Unite (7,0 %), Thailanda (4,2 %), India (2,2 %), Iran (1,9 %), Spania (1,9 %), Rusia (1,8 %), Mexic (1,7 %) și Argentina (1,5 %). Împreună, aceste țări reprezintă 75 % din antimicrobienele utilizate în producția animală, doar 50 % din populația umană a lumii (Katie Tiseo et al., 2020).

Antibioticele circulă prin toate ecosistemele naturii și creează o rețea în care și agenții microbieni rezistenți călătoresc împreună cu ele. Utilizarea excesivă și nerestricționată a antibioticelor în agricultură pentru a crește productivitatea culturilor și ca promotori de creștere a animalelor, mai mult decât pentru controlul infecțiilor, crește preponderent apariția și răspândirea genelor de rezistență la antibiotice. S-a prezis, că până în anul 2050, aproape 10 milioane de decese în întreaga lume vor fi atribuite rezistenței antimicrobiene (Mann et al., 2021). Bacteriile vor tinde să dezvolte rezistență atât timp, cât se folosesc medicamente antibacteriene împotriva lor.

1.4.3 Fenomenul de rezistență antimicrobiană

Conform rapoartelor OMS (WHO, 2023), rezistența antimicrobiană a atins cote alarmante în multe regiuni ale lumii. Progresul tulpinilor rezistente prezintă un aspect natural, care are loc atunci când microorganismele sunt expuse la antimicrobiene, iar caracterele de rezistență pot fi transmise anumitor tipuri de bacterii. Utilizarea nerațională a microbiostaticelor accelerează acest fenomen, iar practicile slabe de control al infecțiilor determină răspândirea rezistenței antimicrobiene. Frecvența bolilor cauzate de microorganisme multirezistente la antimicrobienele de ultimă generație este în creștere, în pofida măsurilor întreprinse la nivel global.

Rezistența la antimicrobiene induce peste 3500 de decese în fiecare an în UE/SEE și crează costuri semnificative în sistemul de sănătate. În 2019, Organizația Mondială a Sănătății a constatat rezistența la antimicrobiene drept una din principalele 10 amenințări la adresa sănătății publice la nivel mondial cu care se confruntă umanitatea. În iulie 2022, Comisia și statele membre au identificat RAM ca fiind una din cele trei amenințări prioritare la adresa sănătății. Aceste amenințări sunt agenți patogeni cu potențial pandemic ridicat, datorită modului de transmitere rapidă. Aceasta include în mare parte familiile virale ARN respiratorii. Amenințări chimice, biologice, radiologice și nucleare (CBRN) provenind din eliberare accidentală sau deliberată. Rezistența antimicrobiană, care prezintă unul dintre cele mai mari riscuri pentru sănătatea umană, numai rezistența antibacteriană provoacă o estimare anuală de 1,27 milioane de decese la nivel global (Salam et al., 2023; EC, 2022).

Începând cu anul 2018, în Republica Moldova a fost înființat sistemul național de supraveghere epidemiologică a rezistenței la antimicrobiene prin ordinul MSMPS nr. 711 din 07.07.2018 în 2018, ce este în permanentă continuă modificare. La moment sistemul este alcătuit din Laboratorul Național de Referință din cadrul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică (ANSP) (nivelul I), 10 laboratoare microbiologice din cadrul Centrelor de Sănătate Publică regionale ale ANSP și 5 laboratoare microbiologice din spitalele republicane și municipale (nivel II). Din anul 2018 Republica Moldova este parte componentă a rețelei CAESAR (eng. Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance), iar din 2021 va raporta date privind RAM și în GLASS (eng. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System). În cadrul acestor rețele se realizează monitorizarea rezistenței agenților microbieni izolați din biosubstrate umane, tabelul 1.5

Tabelul 1.5 Ponderea sensibilității microorganismelor la antibiotice *

Antimicrobiene	Specii de microorganisme						
	<i>S. aureus</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>
Tetraciclina	30,4	-	-	-	-	-	-
Clindamicina	35,2	-	-	-	-	-	-
Eritromicina	38,4	-	-	-	-	-	-
Co-trimoxazol	-	59,6	-	71,5	-	-	-
Cefaclor	-	61,3	-	-	-	-	-
Oxacilina	-	64,9	-	-	-	-	-
Amox/CA	-	-	56,5	68,7	64,2	73,9	-
Ampicilina	-	-	58,2	-	66,8	87,7	-
Aztreonam	-	-	62,0	-	-	-	-
Ticarcilina	-	-	72,6	-	-	-	-
Amicacina	-	-	-	51,7	-	-	-
Ceftazidim	-	-	-	-	60,6	-	-
Norfloxacin	-	-	-	-	-	69,6	-
Piperacilin	-	-	-	-	-	75,8	-
Vancomicin	-	-	-	-	-	-	48,0

Notă: *Conform Programului național, 2019

Microorganisme rezistente la antimicrobiene prezente la om, animale, în alimente și mediu reprezintă o problemă epidemiologică complexă. Sistemul de supraveghere epidemiologică a rezistenței antimicrobiene, existent în Republica Moldova este bazat pe supravegherea traficului agenților microbieni identificați de la bolnavi și emite date parțiale și inconsistente. Rezultatele naționale referitor sensibilității la antibiotice a microorganismelor patogene izolate de la persoane atestă o rezistență îngrijorătoare față de preparatele incluse în protocoalele naționale pentru terapia de primă intenție. Tuberculoza multidrog-rezistență primară și secundară înscrisă rate înalte, respectiv, 26 % și 64 %, 13 % comparativ cu media 12 % și 50 % în regiunea europeană a OMS. Aproximativ 60 % din tulpinile de microorganisme izolate de la pacienți cu infecții de plagă chirurgicală sunt rezistente la antimicrobiene.

Medicația unor boli comune de genul faringite, bronșite sau toxiinfecții alimentare cauzate de bacterii suferă eșec din cauza utilizării iraționale și în exces a antimicrobienelelor. Informațiile referitor la sensibilitatea la antimicrobiene a agenților denotă o rezistență semnificativă a acestora: fiecare a treia tulpină de *Staphylococcus aureus* este rezistentă la tetraciclină (30,4 %), clindamicină (35,2 %) și eritromicină (38,4 %), iar aproximativ două din trei tulpini de *Streptococcus pneumoniae* sunt rezistente la co-trimoxazol (59,6 %), cefaclor (61,3 %), oxacilină (64,9 %) 15 (tab.1.5) (Programul național, 2019).

Rapoartele naționale actuale prezintă date alarmante referitor la rezistența și sensibilitate agenților izolați din diferite prelevate. Enterobacteriaceele în 33,9 % cazuri demonstrează rezistență crescută față de betalactamine (peniciline, cefalosporine și carbapeneme), antimicrobiene folosite frecvent în tratament medicamentos. Aproximativ 48,7 % din bacterii intestinale au prezentat rezistență la toate preparatele testate din grupa penicinelor: *Klebsiella pneumoniae* - 66,4 %, *Escherichia coli* - 45,0 %, *Proteus* spp. 43,7 %, *Shigella flexneri* - 35,8 %, *Salmonella* spp. - 15,1 %. *K. pneumoniae* a prezentat cea mai mare rată de rezistență antimicrobiană: peniciline 66,4 %, cefalosporine 45,5 %, fluorchinolone 40,9 % și respectiv 28 % la aminoglicozide și alte preparate antimicrobiene. Bacteriile intestinale în 36,3 % cazuri au fost rezistente la cefalosporine. Primordial tulpinile testate au demonstrat rezistență față de cefalosporinele de generația IV (42 %), urmată de cefalosporinele de generația II-a (38,8 %) și a III-a (30,4 %). *K. pneumoniae* - 45,4 % s-a dovedit a fi cea mai rezistentă către aceste antimicrobiene (45,4 %). Tulpinile de *K. pneumoniae* în 50 % cazuri s-au dovedit a fi polirezistente, cu o rezistență sporită la peniciline, cefalosporine și la alte preparate din restul grupelor de antimicrobiene testate. *E. coli* cu 53 % urmată de *K. pneumoniae* cu 50,9 % și *Proteus* spp. cu 50,5 % au manifestat rezistență la cefalosporinele de generația a IV. *K. pneumoniae* a demonstrat rezistență sporită la cefalosporinele de generația II cu 47,9 %, cefalosporinele de generația I – 46,7. La fel bacteriile Gram - negative din familia Enterobacteriaceae au fost net rezistente față de carbapeneme (14,8 %), aminoglicozide (20,7 %) și fluorchinolone (24,6 %). Rezistență antimicrobiană alarmantă au manifestat tulpinile de *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter baumannii*, pentru că un număr mare din ele s-au dovedit a fi rezistente la cel puțin un preparat din trei sau mai multe grupe de antimicrobiene. Rezistență accentuată o prezintă *P. aeruginosa* la antibioticele din grupul penicinelor - 53,9 %, fluorchinolonelor 54,1 % și cefalosporinelor – 62,1 %. *A. baumannii* marchează rezistență sporită față de preparatele din grupul fluorchinolone (Bucov ș.a., 2021).

Antibioticele sunt unele dintre cele mai utilizate preparate. În Republica Moldova, antibioticele pentru consum uman constituie circa 10 % din volumul total al pieței de medicamente.

Consumul anual al preparatelor antimicrobiene de uz uman, în perioada 2011-2014, fluctuează de la 21,3 doze zilnice definite (DDD) la 1000 locuitori/zi în 2011 până la 17,7 DDD în 2014. Informațiile comparative din 2011 pentru 29 țări din partea europeană indică, că consumul variază de la 15 DDD (Olanda, Norvegia) până la 43 DDD (Turcia), nivelul în Republica Moldova este mediu. Ratele de consum în creștere se atestă la antibiotice de generația a treia: Cefalosporine (de la 14,8 % în 2011 la 20,7 % în 2014) și Quinolone (de la 12,7 % în 2011 la 17,1 % în 2014), în anul 2014 în țară ponderea acestora constituind 37,8 % din consumul total. În medicina veterinară, antibioticele sunt utilizate pentru tratament, combaterea bolilor și, uneori ca promotori de creștere. Microorganismele, inclusiv cele rezistente la antimicrobiene, pot fi transmise de la animale la om, care ulterior, se pot răspândi în populația umană (Program național, 2019; Balan, 2022).

RAM nu este exclusiv o problemă de sănătate publică, dar și o problemă de sănătate animală cu consecințe economice directe. Fenomenul de rezistență antimicrobiană determină scăderea eficienței tratamentului antimicrobian la animale, de asemenea, transmiterea de bacterii rezistente prin lanțul alimentar și de la animale la om. Conceptul rezistența antimicrobiană vizează, de asemenea, siguranța alimentară, deoarece microorganismele și genele rezistente la antimicrobiene se răspândesc de la animale la om prin intermediul lanțului alimentar. Apariția tulpinilor de *Salmonella* și *Campylobacter* rezistente este cauzată de utilizarea antimicrobienulelor în creșterea animalelor, ca rezultat se atestă cazuri de boli la om ca urmare a consumului alimentelor nesigure de abordare unitară a rezistenței antimicrobiene în lume, precum și în Republica Moldova, este absolut necesar (Aidara-Kane et al., 2018; Bucov et al., 2021).

1.5 Compuși antimicrobieni naturali

1.5.1 Plantele, surse naturale împotriva agenților responsabili de alterarea alimentelor

Antibioticele sintetice au înregistrat succese semnificative în managementul bolilor și infecțiilor prin efectele lor bacteriostatice și bactericide (dar nu fără limitări precum efectele secundare și rezistența microbiană), natura a fost o sursă de agenți medicinali de mii de ani. Plantele medicinale sunt definite ca un grup de plante care posedă proprietăți speciale ce le califică ca medicamente și agenți terapeutici. Plantele medicinale sunt o categorie de plante ce includ în componența sa diverși compuși chimici și sunt utilizate în diverse scopuri (Cowan, 1999; Moh, 2016; Tiseo et al., 2020).

Utilizarea plantelor pentru vindecare datează din preistorie. Încă cu 60.000 de ani în urmă, neanderthalienii (Irakul de astăzi), foloseau plante pentru vindecare. Hipocrate a scris despre câteva sute de plante medicinale la sfârșitul secolului al V-lea î.Hr. Unele plante tămăduitoare, cum ar fi tămâia și smirna, care au proprietăți antiseptice sunt menționate în Biblie. Extractele de

plante și uleiurile vegetale au fost utilizate de mii de ani, servind mai multor scopuri, cum ar fi conservanții alimentari și agenții terapeutici medicali, pentru beneficiu sănătății umane (Cowan, 1999; Moh, 2016; Shaukat et al., 2016; Tiseo et al., 2020).

Apariția tulpinilor de bacterii multi-rezistente la medicamente și apariția tulpinilor cu sensibilitate scăzută la antibiotice au condus la reapariția intereselor de cercetare în descoperirea de noi agenți antimicrobieni din surse naturale care pot fi utilizați în scopuri terapeutice și profilactice împotriva patologiilor infecțioase, în calitate de conservanți alimentari și aditivi pentru hrana animalelor. Plantele conțin o gamă largă de substanțe fitochimice, care au fost utilizate în mod tradițional de secole în medicamentele populare sau etnomedicinile. Cele mai vechi informații despre utilizarea plantelor medicinale provin din China în anul 5000 î.Hr., din India în 2000 î.Hr., din Mesopotamia în 2600 î.Hr. și de asemenea, din Egipt în aproximativ 1550 î.Hr. Medicamentele naturiste au fost utilizate pe scară largă până în prima jumătate a secolului al XX-lea, când a avut loc o trecere către medicamentele sintetice care erau mai eficiente, patentabile și foarte profitabile. În pofida acestui fapt, ultimii ani crește tendința față de utilizarea preparatelor naturale în scopuri medicinale (Patra, 2012).

De-a lungul istoriei Chinei, au fost efectuate cercetări ample pentru a afla puterile curative ale plantelor. Chinezii se focusează pe utilizarea ierburilor în scopuri terapeutice. Medicina chineză reflectă tradiții dezvoltate de-a lungul a 3.000 de ani și studiază problemele în raport cu întregul organismul, spre deosebire de medicina occidentală care se concentrează pe o anumită cauză și încearcă să o sa o supravegheze (Hintz et al., 2015).

Plantele medicinale sunt o categorie de plante care include compuși chimici specifici în componența sa și sunt folosite în diverse scopuri. Aceste plante exista variabil în habitatul lor, cum ar fi fructe, ierburi, arbuști, copaci, cățărători și plante târătoare etc. Plantele medicinale oferă o oportunitate pentru o nouă abordare medicală a noilor preparate. Medicamentele tradiționale și alternative reapar ca noi oportunități practice din punct de vedere științific. Aproximativ 35.000 până la 70.000 de specii de plante au fost folosite în scopuri medicinale în lume, 6.500 de specii sunt folosite doar în Asia ca remedii la domiciliu împotriva diferitelor boli (Shaukat et al., 2016).

Multirezistența la medicamente este o cauza enormă a suferinței umane ce deteriorează relațiile de încredere dintre medici și pacienții acestora, simultan cu pierderi economice uriașe. Dezvoltarea rapidă a RAM intensifică problemele globale de sănătate și prezintă o provocare pentru tratamentul infecțiilor, despre care cercetătorii susțin că ar putea reveni la nivelul erei pre-antibiotice. Preparatele contemporane au multe dezavantaje și inconveniențe, cum ar fi efectele toxice secundare, care deteriorează calitatea vieții. Costul tratamentului este mai mare decât își pot permite milioane de pacienți care trăiesc în țările în curs de dezvoltare. În consecință, fără îndoială

că există necesitatea de noi medicamente eficiente și mai puțin prejudicioase, de compuși derivați de produse naturale și de noi medicamente care depășesc dezavantajele utilizării medicamentelor moderne (Anand et al., 2019).

Peste 90 % dintre remediile de medicină tradițională conțin plante medicinale. Valoarea de piață globală a produselor din plante medicinale depășește 100 de miliarde de dolari pe an. Amploarea crescută a plantelor medicinale poate fi apreciată din punct de vedere economic, având în vedere următoarele criterii: (Sofowora et al., 2013).

- Comerțul global cu ierburi este de peste 100 de miliarde USD pe an
- În Germania, este peste un miliard de dolari anual
- Comerțul cu plante medicinale din India și China este de aproximativ două până la cinci miliarde de dolari SUA anual
- China face comerț cu 7000 de specii și 700000 de tone de plante medicinale pe an
- India face comerț cu 7000 de specii de plante medicinale
- Marocul exportă 58,7 tone de plante medicinale anual
- În ultimii 5 ani, vânzările de plante medicinale s-au dublat în China, s-au triplat în India și au crescut cu 25 % în Europa (Sofowora et al., 2013).

Fructele de pădure și plantele reprezintă una dintre surse de compuși fenolici, iar piața fructelor de pădure a crescut de-a lungul anilor datorită aportului lor pentru sănătate populației. Produsele naturale din fructe de pădure sunt studiate ca un nou arsenal de antimicrobiene și prebiotice, grație capacității lor de a inhiba selectiv agenții patogeni alimentari, favorizând microorganismele benefice (Lacombe et al., 2017). Fructele de pădure sunt în mod tradițional o parte importantă a regimului alimentar. Aproximativ 50 de fructe de pădure diferite sunt cultivate în regiunile nordice, iar aproximativ jumătate dintre ele sunt comestibile. Cele mai cunoscute și importante fructe de pădure sălbatice din punct de vedere comercial sunt afinele, zmeura, merișorul, fructele de cătină și cățișul. În Finlanda, culturile anuale de lingonberry și afin sunt estimate la 500 milioane kg și, respectiv, 250 milioane kg. Fructele de pădure sunt surse bogate de compuși bioactivi, cum ar fi fenolici și acizi organici, care au activități antimicrobiene împotriva agenților patogeni umani. Fructele de pădure și substanțe fenolice din fructe de pădure, posedă în special efecte antimicrobiene evidente împotriva, de ex. Salmonella și Staphylococcus. Polimerii fenolici complecși, cum ar fi elagitaninele, sunt agenți antibacterieni puternici prezenți în fructe de pădure (Pandey et al., 2009; Anand et al., 2019). Diverse mecanisme de acțiune sunt implicate în inhibarea creșterii bacteriilor, cum ar fi destabilizarea membranei citoplasmice, permeabilizarea membranei plasmice, inhibarea enzimelor microbiene extracelulare, acțiuni directe asupra metabolismului microbial și privarea substraturilor necesare creșterii microbiene.

Activitatea antimicrobiană a fructelor de pădure poate fi legată de antiaderarea bacteriilor la celulele epiteliale, care este o condiție prealabilă pentru colonizarea și infectarea multor agenți patogeni. Compușii antimicrobieni din fructe pot avea aplicații importante în viitor ca agenți antimicrobieni naturali pentru industria alimentară, precum și cu scopuri curativ-terapeutice medicale (Puupponen-Pimiä et al., 2005).

1.5.2 Componente active ale extractelor din plante

Plantele medicinale au aport pentru sănătatea mamei și copilului, ca medicamente esențiale, în alimentație și nutriție, pentru boli și răni comune, pentru boli infecțioase endemice, sănătate mintală și sănătate orală. Explorarea și întrebuințarea plantelor medicinale în tratamentul bolilor este în continuă creștere. Plantele sunt o sursă importantă de medicamente și au rol considerabil în sănătatea globală și a atins un rol dominant în sistemul de sănătate din întreaga lume. Aceasta presupune utilizarea ierburilor medicinale nu numai pentru tratarea bolilor ci și ca material potențial pentru menținerea sănătății și condiției fizice prospere. Plantele medicinale conțin diverși compuși precum taninuri, terpenoide, alcaloizi, flavonoizi care asigură potența terapeutică a plantelor, în special activitățile antimicrobiene (Kumar et al., 2021). Produsele secundare din plante sunt folosite ca bază pentru producerea compușilor sintetici valoroși, cum ar fi produse farmaceutice, cosmetice și nutraceutice (Komolafe, 2014).

Sunt situații critice referitor la utilizarea antioxidanților fenolici sintetici, cum ar fi hidroxitoluenul butilat și hidroxianisolul butilat ca aditivi alimentari, motiv fiind reacțiile adverse asupra sănătății. În acest scop s-a propus o înlocuire a acestor aditivi cu diferite extracții antioxidante din diverse alimente. Fructele și legumele sunt sursele principale de antioxidanți naturali. Diverși compuși antioxidanți pot fi găsiți în fructe și legume, inclusiv fenolici, antociani, carotenoizi și tocoferoli. Plantele produc un număr mare de compuși bioactivi diverși, surse bogate de antioxidanți. De exemplu, vitaminele A, C, E și compușii fenolici, cum ar fi flavonoidele, taninurile și ligninele, care se găsesc în plante, acționează toate ca antioxidanți. Antioxidanții reduc daunele oxidative din alimente prin inhibarea oxidării cauzate de speciile reactive de oxigen, crescând în cele din urmă durata de valabilitate și calitatea acestor alimente (Altemimi et al., 2017).

Compușii fenolici sunt un grup de substanțe fitochimice, care au o structură fenolică cu un inel benzenic aromatic care poartă cel puțin un substituent hidroxil. Compușii fenolici se găsesc de obicei în tot regnul vegetal și ocrotesc plantele de radiații ultraviolete, factorii chimici și infecții microbiene (Kumar et al., 2012). Compușii secundari ai plantelor sunt de obicei clasificați în funcție de căile lor de biosinteză. Acești compuși sunt printre cele mai complexe grupuri de metaboliți secundari prezenți în plantele comestibile. Se găsesc într-o mare diversitate de legume,

nuci, semințe, fructe, tulpini și flori, precum și ceai, vin, propolis și miere. Sunt variate (diverse) clase de polifenoli cunoscute sub numele de taninuri, lignine și flavonoide și prin urmare fiecare dintre aceste clase au caracteristici chimice diferite ce îi deosebesc unii de alții. Subclasele de compuși fenolici clasificați în mod obișnuit sunt: fenolici simpli (rezorcinol și floroglucinol), acizi fenolici și aldehide, cumarine, flavonoide, calcone, aurone, benzofenone, xantone, stilbene, benzochinone, naftachinone, antrachinone, polifenoline (antrachinone, prolinanine) galoil, ester hexahidroxidifenilic, acid hidroxicinamic și derivați de floroglucinol). Alimentele care conțin substanțe fenolice devin o parte importantă a dietelor datorită potențialelor proprietăți antioxidante, iar acești compuși au proprietăți antimicrobiene puternice (Patra, 2012).

Flavonoizii sunt polifenolii cei mai răspândiți în natură și sunt prezenți aproximativ în orice vegetale consumate de om. Flavonoizii sunt antioxidanți intensi, captatori de radicali liberi și chelatori de metale, ele inhibă peroxidarea lipidelor și prezintă diverse activități fiziologice, inclusiv activități antiinflamatorii, antialergice, anticancerigene, antihipertensive, antiartrite și antimicrobiene. Flavonoizii pot fi divizați în șase subclase în funcție de gradul de oxidare al heterociclului de oxigen: flavone, flavonoli, izoflavone, antocianine, flavanone și flavanoli (catechine și antocianidine) (Cetin-Karaca, 2011). Cele mai active subclase de flavonoizi sunt: flavone - apigenină, luteloină, diosmetină; flavonoli - quercetină, miricetină, rutina; flavanone: naringenina, hesperidina; catechine (flavanoli): (-) epicatechină, galocatechină, (+) catechină; antocianidine: pelargonidină, malvidină; izoflavone: genisteina, daidzeina; acizi fenolici: acid clorogenic, acid tanic, acid ferulic (Cetin-Karaca, 2011).

Mai mult de 8000 de compuși polifenolici au fost identificați în variate specii de plante. Acești compuși fenolici provin dintr-un intermediar comun, fenilalanina, sau un precursor apropiat, acidul shikimic. Deosebirile particulare în cadrul fiecărui grup apar din diversitatea numărului și aranjarea grupărilor hidroxil și a gradului lor de alchilizare și glicozilare. Flavonolii au o grupare 3-hidroxi piran-4-onă pe inelul C. Flavanone (cum ar fi naringenina și taxifolina), au o legătură carbon-carbon nesaturată în inelul C. Flavanolii (cum ar fi catechinele), le lipsește atât o grupare 3-hidroxi, cât și structura 4-onă din inelul C. Antocianinele, sunt caracterizate prin prezența unui ion oxoniu pe inelul C și sunt foarte colorate (Pandey, 2009).

Substanțele fitochimice bioactive simple sunt formate dintr-un singur inel fenolic substituit. Există unele dovezi că situsurile și numărul de grupări hidroxil de pe inelul fenolic sunt legate de gradul de toxicitate pentru microorganisme, hidroxilarea crescută având ca rezultat o toxicitate crescută. Modul de acțiune este inhibiția enzimatică de către compușii oxidați. Compușii fenolici au capacitatea de a modifica permeabilitatea celulară microbială, ducând la pierderea de

macromoleculă și interacționează cu proteinele membranei, provocând modificări structurale și eliberarea conținutului celular (Hintz et. al., 2015).

Pe perioada ultimilor decenii fitochimicalele au fost testate *in vitro* și *in vivo* pentru a determina activitatea antimicrobiană contra microorganismelor patogene și acțiunea lor asupra microflorei normale, în special a celei intestinale. Studiile actuale sunt direcționate spre aprecierea mecanismelor de acțiune a substanțelor bioactive provenite din plante. Studiile se efectuează cu scop de a elabora biopreparate noi cu efect antimicrobian obținute din plante (Lozan-Tîrșu, 2016).

Acizii fenolici sunt prezenți într-o serie vastă de plante, cum ar fi ceaiul, cafeaua și fructele de pădure. La fel acizii fenolici și aldehidele se pot forma prin biotransformarea microbiană intestinală a altor compuși fenolici din intestin, unde pot influența microbiota intestinală. O serie de fenoli simpli și acizi fenolici posedă activități antibacteriene, antivirale și antifungice împotriva unei game largi de microbi, dar în cantități diferite. S-a constatat că, concentrația de 1 mg/L de acid galic este capabilă să inhibe viabilitatea *Campylobacter jejuni*. Acidul sinaptic, acidul vanilic și acidul cafeic au fost microbicide la concentrații începând de la 10 mg/L. Acidul ferulic și acidul cumaric au fost eficiente la o concentrație de 100 mg/L. Studiile au demonstrat că efectul antibacterian a acizilor fenolici este mai puternic împotriva bacteriilor Gram-pozitive decât a bacteriilor Gram-negative. Membrana exterioară a bacteriilor Gram-negative le oferă o structură de suprafață hidrofobă care este capabilă să excludă anumite molecule hidrofile, făcându-le rezistente în mod inerent la mulți agenți antimicrobieni, inclusiv acizii fenolici (Patra, 2012).

1.6 Concluzii la capitolul 1

1. Conform studiului bibliografic, bolile alimentare constituie o problemă pentru toate societățile de la începutul omenirii. Datorită globalizării comerțului cu alimente la nivel mondial, alimentele au devenit o cale majoră de expunere a populației la agenți patogeni, responsabili de infecții alimentare.

2. A fost estimat, că circa 600 milioane persoane se îmbolnăvesc după ce consuma produse alimentare contaminate și 420000 mor în fiecare an, ceea ce duce la pierderea a 33 de milioane de ani de viață.

3. Sistemele alimentare, la fel și sistemele de sănătate, sunt vulnerabile la contaminare. Alimentele prezintă vehiculul ideal pentru dispersia microorganismelor patogene. Bacteriile sunt cea mai frecventă cauză a bolilor transmise prin alimente. Mai frecvent în etiologia bolilor alimentare sunt implicați *Campylobacter spp.*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* și *B. subtilis*.

4. În Republica Moldova se înregistrează anual circa 18-20 mii de cazuri de boli diareice acute. Conform Agenției Naționale pentru Sănătate Publică, în Republica Moldova, în special în perioada verii, anual izbucnesc peste 20 de focare epidemice cu implicarea unui număr de până la 300 de bolnavi. Cele mai frecvente maladii diareice înregistrate în Republica Moldova sunt provocate de *Salmonella*, *Campylobacter* și *Escherichia coli* enterohemoragică.

5. Studiul bibliografic referitor la fenomenul de antibioretistență confirmă faptul că infecțiile cauzate de microorganismele rezistente la antibiotice constituie o problemă globală de sănătate publică. Literatura de specialitate dezvăluie informații referitoare la pericolul acestor bacterii pentru sănătate atât în întreaga lume, cât și în Republica Moldova.

6. Consumul de antimicrobiene la animale este aproape triplu față de cel al oamenilor și este un factor principal al creșterii producției de proteine animale. Antibioticele sunt cel mai des prescrise și administrate medicamente.

7. În Republica Moldova, antibioticele pentru consum uman constituie circa 10 % din volumul total al pieței de medicamente. Conceptul de rezistență antimicrobiană vizează, de asemenea, siguranța alimentară, deoarece microorganismele și genele rezistente la antimicrobiene se răspândesc de la animale la om prin intermediul lanțului alimentar. Bacteriile vor tinde să dezvolte rezistență atâta timp, cât se folosesc antibacterienele.

8. Datorită ritmului actual rapid de viață și a industriilor orientate spre profit, care minimizează costurile de producție și distribuție prin utilizarea conservanților și aditivilor sintetici, antibioticelor, hormonilor, sănătatea și imunitatea populației generale este grav afectată.

9. Cerința de alimente ecologice a crescut din ce în ce mai mult în ultimele decenii. În acest context, este imperativ să se vină cu alternative naturale fiabile la compușii sintetici, cu o viitoare speranță de-a reduce utilizarea aditivilor sintetici și a antibioticelor în calitate de conservanți.

2. MATERIALE ȘI METODE

Cercetările din cadrul tezei de doctorat **Acțiunea microbiostatică a extractelor vegetale de compuși fenolici asupra microorganismelor responsabile de alterarea alimentelor** au fost realizate în cadrul Departamentului Medicină Preventivă, Disciplina de microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și farmacie ”Nicolaie Testemițanu” pe parcursul anilor 2018 - 2022 și Universitatea Tehnică a Moldovei, Facultatea Tehnologia Alimentelor. O parte din testări au fost realizate în cadrul Universității Dunărea de jos, departamentul Știința Alimentelor, Ingineria Alimentelor, Biotehnologii și Acvacultură (SAIABA), Galați, România; Institutul de Plante și Științe a Mediului Nitra, Institutul de Horticultură, Facultatea de Horticultură, Ingineria Peisajului și Agrobiologie, Centrul de Cercetare AgoBioTech, Nitra, Slovacia (Institute of plants and environmental sciences Nitra Institute of Horticulture, Faculty of Horticulture and Landscape Engineering and Agrobiolgy, Research Centre AgoBioTech).

2.1 Materiale de cercetare

Materialele primare și auxiliare utilizate pentru cercetare în cadrul tezei de doctorat sunt prezentate în tabelul 2.1.

Tabelul 2.1 Materiale utilizate în cercetare

Nr	Materiale primare	Proveniența
1.	Pulbere și extracte vegetale de cătină, aronie, păducel, măceșe, tescovină de struguri, busuioc, cimbru, rozmarin, tarhon.	Pentru obținerea extractelor vegetale a fost utilizată materia vegetală autohtonă din Republica Moldova (RM) din fructe de cătină (<i>Hippophae rhamnoides</i> L.), măceș (<i>Roza canina</i> L.), păducel (<i>Crataegus monogyna</i>), aronia (<i>Aronia melanocarpa</i>), plante aromatice și tescovina de struguri (<i>Vitis vinifera</i> L.) din soiuri roșii. Materia primă vegetală a fost procurată de la întreprinderi specializate. Tescovina de struguri utilizată a provenit din secția de microvinificație, UTM.
2.	Tulpini de referință : <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Salmonella enterica</i> serovar Aboni NCTC 6017, <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028, <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC7953 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118	Tulpinele de referință provin din American Type Culture Collection (ATCC), Agenția Națională pentru Sănătate Publică Documente normative: 1. B. coliforme – SM ISO 4831 (metoda de detecție) 2. Clostridii sulfitreductoare – GOST 29185 (metoda de detecție) 3. <i>S. aureus</i> – SM SR EN ISO 6888-3 (metoda de detecție) 4. <i>Salmonella</i> – SM EN ISO 6579-1 (metoda de detecție) 5. <i>L. monocytogenes</i> – SM EN ISO 11290-1 (metoda de detecție).

Continuare tabelul 2.1

	<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	Echivalent <i>L. monocytogenes</i> ATCC BAA-679, Universitatea Dunărea de Jos, Galați, România.
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2461 <i>Listeria monocytogenes</i> CCM 4699 <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010 <i>Bacillus subtilis</i> CCM 1991 <i>Clostridium. perfringens</i> CCM 4991 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 <i>Shigella sonnei</i> CCM 4421 <i>Salmonella</i> Enteritidis, CCM 4420 <i>Escherichia coli</i> CCM 3954	Czech Collection of Microorganisms, (Institute of plants and environmental sciences Nitra Institute of Horticulture, Faculty of Horticulture and Landscape Engineering and Agrobiolology, Research Centre AgoBioTech (Eng.), Nitra, Slovacia.
3.	Produse alimentare cu adaosuri în diferite concentrații (pulbere vegetale și extracte): a) crenvurști; b) cremă de brânză; c) înghețată.	Produsele alimentare au fost preparate în cadrul Departamentelor Tehnologia Produselor Alimentare, Oenologie și Chimie, UTM, conform regulamentelor specifice : SM EN ISO 6887-2:1 - Reguli specifice pentru pregătirea cărnii și a produselor din carne. NGMAFA - SM EN ISO 4833-1; ISO 5534:2004 IDF 4:2004 -Brânză și brânză procesată; ISO 8968-1:2014/IDF 20-1:2014 –Lapte și produse lactate.

2.2 Caracteristica culturilor microbiene utilizate

În calitate de obiecte de studiu *in vitro* au fost incluse tulpini de referință, care provin din două colecții de culturi recunoscute în calitate de furnizori de material biologic de calitate pentru cercetări de performanță: American Type Culture Collection (ATCC) oferite de Agenția Națională pentru Sănătate Publică (ANSP) și Czech Collection of Microorganisms, oferite de Institute of plants and environmental sciences Nitra Institute of Horticulture, Faculty of Horticulture and Landscape Engineering and Agrobiolology, Research Centre AgoBioTech (tab. 1.5). S-au utilizat bacterii Gram pozitive și Gram negative, din genul fungilor s-a utilizat *C. albicans*. Tulpinile de referință sunt bacterii catalogate, caracterizate, cu fenotipuri de sensibilitate la antibiotice stabile, definite. Se utilizează pentru controlul intern de calitate.

Staphylococcus aureus este o bacterie Gram pozitivă (colorată violet prin colorație Gram) are formă de coci și tinde să fie aranjat în ciorchini „asemănătoare strugurilor”. *Staphylococcus aureus* este, catalazo-pozitiv, cu un diametru de 0,5 - 1,5 μm, care formează grupuri de celule. În condiții de laborator are o temperatură optimă pentru creștere de 37 °C cu un interval de 7 - 48 °C. Sunt imobili, aerobi, facultativi anaerobi, catalazo-pozitivi, nesporelați, de regulă necapsulați, mezofili (Hudson, 2014). Crește stafilococul pe medii simple, formează colonii rotunde, convexe, cu pigment auriu, pe geloză sânge produc o hemoliză completă. Cocii sunt capabili să crească pe medii suplimentate cu 10 % NaCl. *S. aureus* se găsește pe derm, 80 % din populație sunt purtători. *S. aureus* este considerat un agent patogen alimentar. Poate produce enterotoxine stabile la căldură în timpul dezvoltării sale în alimente, iar aceste enterotoxine pot provoca intoxicații alimentare la oameni și animale (Anderson et al., 2014).

Bacillus cereus este un bacil Gram pozitiv, aerob sau facultativ anaerob, încapsulat, mobil, patogen și oportunistic patogen, în formă de tijă, capabil să producă endospori rezistenți în prezența oxigenului. *B. cereus* este larg răspândit în mediul înconjurător, și anume sol, unde spori persistă în condiții nefavorabile. Temperatura optimă de dezvoltare a *B. cereus* este de (8 - 55 °C), însă nu tolerează valori scăzute ale pH-ului (minimum 5 - 6) sau conținutul de apă (activitate minimă a apei 0,95). Acest microorganism contaminează frecvent mediile clinice (infecții oportuniste), procesele biotehnologice și producția de alimente (Buckley et al., 2022).

Bacillus subtilis este un bacil aerob, Gram pozitiv, cu creștere rapidă, cu celule în formă de bastonaș, care au în mod obișnuit 2 - 6 μm lungime și doar mai puțin de 1 μm în diametru. Temperatura cardinală de dezvoltare este de aproximativ 30 - 35 °C. În unele condiții de creștere, celulele au tendința de a forma lanțuri lungi legate de peretele septal neclivat. Crește rapid pe medii de nutriție și nu este pretențios la cultivare. În natură, *B. subtilis* se găsește în sol, pe rădăcinile plantelor și mediile acvatică. Este un organism industrial important, fiind capabil la secreția proteinelor și producerea de substanțe chimice fine mici, precum și acționând ca un promotor de creștere a plantelor (Errington et al., 2020).

Listeria monocytogenes este o bacterie Gram pozitivă, care nu formează spori, de ordinul a 0,5 - 2 μm lungime. În rezultatul colorației Gram devine variabilă pe măsură ce cultura îmbătrânește. În froiturile directe care sunt colorate Gram, bacteria poate părea a fi aproape cocoidă, adesea fiind confundată cu streptococii. Organismul poate crește la temperaturi cuprinse între <1 °C și aproximativ 50 °C, cu o temperatură optimă de 30 - 37 °C (Bat, 2014). *Listeria monocytogenes* este unul dintre cei mai importanți agenți patogeni responsabili de infecțiile alimentare. *Listeria monocytogenes* este un agent patogen de origine alimentară care poate provoca maladii umane severe invazive (listerioză) la pacienții susceptibili. Majoritatea cazurilor de listerioză umană, sunt cauzate de consumul de alimente gata de consum (ready-to-eat foods) (Sandulachi et al., 2020).

Salmonella*, *Shigella* și *Escherichia sunt genuri din familia Enterobacteriaceae, sunt prezentate sub formă de bastonașe Gram negative, drepte sau ușor încurbate cu dimensiuni cuprinse între 1 - 3 μm lungime, cu capetele rotunjite, nesporulate, necapsulate. Sunt germeni facultativ anaerobi, nepretențioși nutritivi. Se dezvoltă atât pe mediile uzuale, cât și pe mediile selective lactozate pe care formează colonii lactozo-negative cu excepția *E. coli* deoarece este lactozo-pozitivă. În general cultural biochimic pe medii formează colonii de tip S, fermentează zaharuri cu producere de acizi, *E. coli* este producătoare de gaz și este lactozo-pozitivă. Sunt bacterii oxidazo-negative cu temperatura optimă de creștere de 37 °C. *Shigella* și *Salmonella* sunt agenți patogeni care provoacă gastroenteropatie la om. Infecțiile alimentare sunt cauzate în cea

mai mare parte de Salmonella, care are o răspândire largă în întreaga lume și o apariție pe scară largă la animale, în special la păsările de curte și la porci (Fukushima, et al., 2002).

Klebsiella pneumoniae este un bacil Gram negativ, imobilă, încapsulată, fermentatoare de lactoză, anaerobă facultativă, în formă de baston. Bacteriile aparțin familiei Enterobacteriaceae și este o bacterie încapsulată și imobilă. *K. pneumoniae* este facultativ anaerob, oxidază negativ și produce acid și gaz din lactoză. Formează colonii lactoza pozitive, te tip mucoid pe mediul Endo. Bacteria colonizează de obicei suprafețele mucoasei umane ale orofaringelui și tractului gastrointestinal (GI). Manifestă grade ridicate de virulență și rezistență la antibiotice. Este un agent cauzal al infecțiilor asociate asistenței medicale (Ashurst et al., 2023).

Pseudomonas aeruginosa este o bacterie heterotrofă, mobilă, Gram negativă, în formă de bastonaș, de aproximativ 1 - 5 μm lungime și 0,5 - 1,0 μm lățime. Este un m/o facultativ aerob, care poate crește în condiții aerobe și anaerobe. Are capacitatea de-a se dezvolta pe medii cu conținut limitat de clorură de Sodiu. *P. aeruginosa* crește la temperatura de 37 °C, dar poate supraviețui la temperaturi cuprinse între limitele 4 - 42 °C. Este o bacterie ce se găsește în sol și este capabilă să descompună hidrocarburile aromatice policiclice, dar este adesea detectată și în rezervoarele de apă poluate de animale și oameni, cum ar fi canalizarea și chiuvetele din interiorul și din exteriorul spitalelor. *Pseudomonas aeruginosa* este rezistent la diverse antibiotice și agenți terapeutici, iar acest lucru este un impediment în tratarea infecției. Este adesea numit un agent patogen „oportunist”, deoarece rareori infectează indivizi sănătoși și cauzează infecții intraspitalicești (Diggle et al., 2020).

Candida albicans este un fung dimorf, Gram pozitiv, care poate lua o formă unicelulară (levură) sau multicelulară (hife, pseudohife). Morfologic *C. albicans* este un fung de dimensiuni mici, oval, cu diametrul de 2 - 4 μm. Levură, unicelulară, se reproduce prin înmugurire. Atât drojdia, cât și pseudo-hifele sunt gram-pozitive. Încapsulate și diploide, formează și hife adevărate. *C. albicans* este una dintre puținele specii de ciuperci care provoacă boli la oameni. Este un membru al microflorei normale a omului, colonizează asimptomatic tractul gastro-intestinal (GI), tractul reproducător, cavitatea bucală și pielea majorității oamenilor. La persoanele cu sistem imunitar sănătos, *C. albicans* este inofensivă (Noble et al., 2017).

Standardul McFarland Standardul optic de turbiditate McFarland este folosit ca referință pentru a ajusta turbiditatea suspensiei bacteriene în soluție salină la o anumită concentrație. Ajută la menținerea și asigurarea faptului că numărul de bacterii va fi într-un anumit interval pentru a standardiza testarea microbiană. Standardul McFarland poate fi preparat cu o concentrație variabilă variind de la concentrația 0,5 la 4 și în funcție de concentrație, densitatea numărului de celule microbiene variază. Cu toate acestea, concentrația cea mai frecvent utilizată pentru testarea

sensibilității antimicrobiene și testarea performanței mediilor de cultură este de obicei efectuată conform standardului 0,5 McFarland în laboratoarele microbiologice. Standardul McFarland este un amestec chimic de clorură de bariu și acid sulfuric. Reacția chimică dintre aceste două substanțe chimice are ca rezultat producerea unui precipitat fin de sulfat de bariu. Turbiditatea unui standard McFarland este comparabilă vizual cu o suspensie bacteriană de concentrație cunoscută. Standardele de turbiditate McFarland se prepară prin amestecarea diferitelor volume de acid sulfuric 1 % și clorură de bariu 1 % pentru a obține soluții cu densități optice specifice. Prin ajustarea volumului acestor două reactivi chimice, pot fi preparate standarde McFarland cu diferite grade de turbiditate care reprezintă densitate bacteriană. Standardul de turbiditate 0,5 McFarland oferă o densitate optică comparabilă cu densitatea unei suspensii bacteriene cu unități formatoare de colonii de $1,5 \times 10^8$ (UFC/mL) (Aryal, 2021).

2.3 Reagenți chimici și materiale auxiliare

Obiectivele lucrării au necesitat un mare volum de lucru în laborator. Pentru aceasta au fost utilizați diferiți reactivi specifici, indicați în tabelul 2.2.

Tabelul 2.2 Reagenți chimici

Materiale	Standarde
Alcool de 96%	ISO 6353-2:1983
Tiosulfat de sodiu cristalin	ISO 6353-2:1983
Apă distilată	ISO 6353-2:1983
KOH	ISO 6353-2:1983
NaOH	ISO 6353-2:1983
KI	ISO 6353-2:1983
HCl	ISO 6353-2:1983 10% Sigma, Germania
Cloroform	ISO 6353-2:1983, Sigma, Germania
NaCl	STAS - 13830 – 84
Acid acetic glacial	STAS - 5815 – 77
Metanol	ISO 6353-2:1983, Sigma, Germania
Folin-Ciocâlțeu	ISO 6353-2:1983, 98% Merck, Germania
DPPH	ISO 6353-2:1983, 99% Sigma, Germania
Acetonitril	ISO 6353-2:1983 98% Merck, Germania
Hexan	ISO 6353-2:1983 99,5% Sigma, Germania
Izoctan	ISO 6353-2:1983 99,5% Sigma, Germania
Materiale de referință pentru detectarea polifenolilor	ISO 6353-2:1983, Sigma, Germania

Pentru realizarea cercetărilor au fost utilizate următoarele medii nutritive optime pentru tulpinile de referință testate. Agarul și bulionul Mueller Hinton au fost utilizate pentru a cultiva izolatele bacteriene și a testa sensibilitatea acestora la preparatele vegetale prin metoda difuzimetrică în godeuri. Pentru cultivarea bacteriilor Gram negative s-a folosit mediul Endo (mediu diferențial diagnostic pentru enterobacterii), mediul geloză salină cu manitol pentru *S. aureus* și Sabouraud Dextrose agar pentru fungi.

2.4 Tehnologii de fabricare a produselor alimentare

2.4.1 Pregătirea plantelor și extractelor

Pentru obținerea extractelor vegetale a fost utilizată materia vegetală autohtonă din Republica Moldova (RM) din fructe de cătină (*Hippophae rhamnoides L.*), măceș (*Roza canina L.*), scoruș (*Sorbus aucuparia L.*), păducel (*Crataegus monogyna*), aronia (*Aronia melanocarpa*) și tescovina de struguri (*Vitis vinifera L.*) din soiuri roșii. Ca materia vegetală a fost utilizate și plante aromatice (extracte și pulbere): rozmarin, busuioc și cimbru. S-au testat soiuri noi de cătină albă R1, R2, R4, R5, C6, AGG, AGA, Mr. Sandu și Seirola recolta anului 2020, provenită din satul Pohrebea, raionul Dubăsari. Recoltarea fructelor de cătină albă s-a făcut în faza de maturare completă (Macari et al., 2020; Macari et al., 2021).

Fructele de pădure și plantele aromatice au conținut ridicat de compuși biologic activi (polifenoli) și o activitate antioxidantă considerabilă au fost selectate pentru cercetare. Toate materialele vegetale provin din Republica Moldova. Pentru a obține extractele, boabele au fost congelate la -18 °C, uscate la temperatura camerei (20,0 ± 2,0 °C) și la o temperatură a agentului termic de 65,0 ± 1,0 °C. Materia vegetală uscată avea o umiditate finală de 8,0 ± 1,0%. Pentru extracție, substanța uscată a fost măcinată și cernută în pulbere. Procesul de extracție a fost realizat prin două metode: agitare și ultrasunete, respectând două regimuri de temperatură: 20,0 ± 1,0 °C și 45,0 ± 1,0 °C și 3 perioade de timp: 0,5 h, 1,0 h și 1,5 h. Raportul dintre cantitatea de materie vegetală și solvent a fost determinat experimental și depinde de tipul de materie vegetală: măceș (1:15), cătină albă și frasin de munte (1:12), păducel (1:20) și aronia melanocarpa (1:18). Pentru decantarea extractelor, probele obținute au fost centrifugate la 7000 min⁻¹ timp de 10 minute. Extractele obținute se păstrează în sticle de sticlă închisă la culoare la 4 °C.

2.4.2. Microincapsularea extractelor

Pentru încapsularea extractelor de plante aromatice în alginat de sodiu (Alg) a fost folosită tehnica picăturii (Rijo, 2016). Un amestec de alginat de sodiu (0,6 g) și apă ultrapură (20 mL) a fost agitat pe o placă la 40 °C timp de 1 oră și 400 min⁻¹. După răcire la temperatura camerei, s-au adăugat 10 mL de extract sub agitare, continuând agitarea timp de încă 10 min. Soluția rezultată a fost adăugată la o soluție de CaCl₂ 0,2 M folosind o seringă. Adăugarea amestecului a fost efectuată sub agitare continuă, într-un interval de timp de 20 min. Agitarea a continuat încă 15 min, după care microcapsulele au fost spălate de trei ori cu apă ultrapură și apoi liofilizate.

2.4.3 Prepararea produselor din carne cu adaosuri vegetale

Probele de crenvuști au fost pregătite în condiții de laborator (semi-industriale) după tehnologia clasică de fabricare a crenvuștilor „Lacta” incluși în grupa cârnaților fierți. Crenvuștii

s-au fabricat conform rețetei, în kilograme de materii prime pentru prepararea a 100 kg de produs finit (kg/100 kg) din: carne de vită de calitate superioară (35 kg), carne de porc semigrasă (48 kg), carne de porc grasă (12 kg), laptele praf (2 kg) și ouă (3 kg). Tocătura se amestecă cu condimente și materiale auxiliare formate din sare (1,87 kg), zahăr (0,12 kg), piper alb sau negru măcinat (0,12 kg) și nucșoară (0,04 kg). De asemenea, 25% gheață a fost adăugată în compoziția cârnaților. Proba martor a fost obținută conform tehnologiei clasice nemodificate. Apoi au fost preparate probe de crenvuști cu extracte de busuioc liofilizate, cimbru și tarhon, luate în proporție de 0,1%, 0,2%, 0,3% față de masa cărnii utilizate. Extractele liofilizate din plantele menționate au fost rehidratate și adăugate în compoziție în stadiul tehnologic de tăiere și omogenizare. În mod similar, au fost preparați și crenvurști cu adaosuri de pulbeie din fructe de cătină albă, măceș și păducel în concentrații de 0,25; 0,5 și 1 %, raportate la masa cărnii utilizate. Compoziția a fost introdusă mecanic într-o membrană de poliamidă. Crenvuștii au fost gătiți cu abur la 83 ± 2 °C timp de 40 de minute la o temperatură internă de 72 °C. După gătitul cu abur, probele au fost răcite cu duș cu apă rece. În final, probele au fost păstrate la 4 ± 1 °C timp de 6 zile.

2.4.4 Prepararea cremei de brânză cu extract de busuioc microîncapsulat

Laptele standardizat cu 3,8 % conținut de grăsime a fost pasteurizat la 63 - 68 °C timp de 30 de minute și răcit la 30 - 32 °C. Ulterior, la lapte s-au adăugat 5 DCU/100 L de cultură inițială mezofilă CHOOZIT MA 14 LYO și 0,05 % (v/v) și coagulant Marzyme XT 850 IMCU. Laptele a fost amestecat și coagulat timp de 2,0-2,5 ore, până când s-a format un caș ferm. Cașul a fost tăiat, amestecat și deshidratat în pungi de lavsan timp de 1 oră. Apoi, brânza a fost scoasă din pungi și răcită la 6 - 10 °C. Pentru a obține crema de brânză, brânza a fost lipită cu sare (0,7 % g/g) și diferite niveluri de MBE (0,3 %, 0,6 %, 0,9 % și 1,2 % g/g, raportat la masa cremei de brânză). Probele cu cremă de brânză au fost păstrate în recipiente ermetice sterilizate la 4 °C.

2.4.5 Prepararea înghețatei cu adaosuri vegetale

Procesul de fabricare a înghețatei a inclus obținerea mixului din lapte normalizat cu conținutul de grăsime de 2,5 %, smântână dulce cu conținutul de grăsime de 45 %, lapte degresat praf, zahăr, dextroză, sistem de stabilizare și emulgare, apă deionizată; filtrarea, omogenizarea la temperatura de 55 °C și presiunea de 150 atm, pasteurizarea la temperatura de 82 ± 1 °C timp de 25 s, răcirea mixului până la temperatura de 4 ± 1 °C; dozarea pudrei de aronia sau de cătină albă, sau de măceș, sau de păducel cu umiditatea de 5 ± 1 % și granulozitatea de 50 ± 10 μm în cantitate de 0,1 - 1,0 % și a extractul hidroalcoolic de aronia sau păducel cu conținut de substanță uscată de 75 ± 5 % în cantitate de 0,25 - 0,75 %, sau a extractului liposolubil de cătină albă sau măceș în

cantitate de 1 - 2 %; maturarea mixului la temperatura de 2-4 °C timp de 10 - 12 ore, freezerarea până la temperatura de minus 5 – minus 6 °C și capacitatea de aerare de 54 - 57 %; ambalarea înghețatei, călirea la temperatura minus 30 – minus 40 °C până la atingerea temperaturii din interiorul înghețatei de minus 27±1 °C; depozitarea la temperatura de minus 18±2 °C, conform (Popescu, L., 2020).

2.5 Metode de cercetare

În lucrare au fost folosite metodele de cercetare indicate în tabelul 2.3.

Tabelul 2.3 Metodele de cercetare

Metode	Materialul de examinat	Cercetările	Referințe bibliografice
1	2	3	4
Microbiologice: Microscopică Difuzimetrică (metoda godeurilor) Diluții duble succesive Spectrofotometrică Metoda improvizăției Metoda bacteriologică	<i>Preparate biologice (pulbere, extracte)</i> <i>Tulpinile standarte</i> <i>Crenvurști</i> <i>Cremă de brânză</i> <i>Înghețată</i>	Examinarea, verificarea și confirmarea tulpinilor. Screeningul și determinarea activității antibacteriene (calitativ). Determinarea CMI și CMB (cantitativ). Determinarea efectului antibacterian. Determinarea activității antibacteriene <i>in situ</i> . Determinarea indicatorilor sanitar-microbiologici.	Balouiri et al., 2016; CLSI, 2018; 2019 Improvizare 2014; SM ISO 4831:2010; ISO 6579-1:2017; ISO 6888-3:2011
Metoda DPPH (2,2-diphenil-1-picrilhidrazil) de determinare a activității antioxidante	<i>Extracte vegetale</i>	DPPH este un radical liber stabil. Soluția DPPH își pierde culoarea caracteristică violetă, atunci când acceptă hidrogenul de la un donator corespunzător. Măsurările s-au făcut la 515 nm. Rezultatele sunt exprimate în % inhibat și în mmol TE/g s.u.	Brand-Williams. et al., 1995
Metoda ABTS de determinare a activității antioxidante	<i>Extracte vegetale</i>	Activitatea antioxidantă folosind metoda ABTS a fost determinată prin adăugarea a 0,34 mL extract la 3,4 mL soluție ABTS. Amestecuri au fost lăsate să stea la întuneric timp de 6 minute, apoi absorbția la 734nm a fost citită cu spectrofotometrul UV-VIS T80 (PG Instruments Limited, Leicestershire, Marea Britanie). Rezultatele s-au calculat din curba de calibrare Trolox (R ² = 0,9982), trasă pentru concentrații în intervalul 0,01–0,4 mM, iar rezultatele au fost exprimate în mM Trolox/g s.u.	Thaipong, et al., 2006
Determinarea conținutului total de polifenoli, metoda Folin-Ciocalteu	<i>Extracte vegetale</i>	Rezultatele au fost exprimate în mg echivalent acid galic per g substanță uscată (s.u.) de extract (mg GAE/g s.u.).	Ivanova et al., 2010

Continuare tabelul 2.3

Analiza HPLC-DAD-ESI-MS a polifenolilor	<i>Extracte vegetale</i>	Analiza a fost efectuată utilizând cromatograful lichid Agilent HP-1200 echipat cu o pompă cuaternară, autosampler, detector DAD și detector de electrospray API cu un singur patrupol MS-6110. Modul de ionizare pozitivă a fost aplicat pentru a detecta compușii fenolici; au fost aplicate diferite fragmente, în intervalul 50–100V. Coloana a fost un Eclipse XDB-C18 (5 μm; 4,5 × 150 mm i.d.) de la Agilent. Faza mobilă a fost (A) apă acidulată cu acid acetic 0,1% și (B) acetonitril acidulată cu acid acetic 0,1%. Cromatogramele au fost înregistrate la lungimea de undă λ = 280, 340 și 520 nm, iar achiziția datelor a fost realizată cu software-ul Agilent ChemStation. Conținutul de polifenoli specifici a fost determinat utilizând o comparație a timpilor de retenție și a vârfurilor.	Popescu et al., 2023
Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)	Extractul de busuioc incapsulat	Spectrele FTIR au fost înregistrate utilizând un spectrometru FTIR FT/IR-6100 (JASCO International Co., Ltd., Tokyo, Japonia) în intervalul spectral 4000 până la 400 cm ⁻¹ , cu o rezoluție de 4 cm ⁻¹ prin tehnica peletelor KBr. În fiecare probă au fost dispersate 300 mg de KBr anhidru amestecat cu mortar de agat. Peletele au fost obținute prin presarea amestecului într-o matriță evacuată. Spectrele au fost colectate și analizate cu software-ul Jasco Spectra Manager v.2.	Popescu et al., 2023
Analize fizico-chimice	Cremă de brânză	Conținutul de lipide a fost determinat prin metode gravimetrice. Conținutul de substanță uscată a fost determinat folosind ISO 5534; 2004. Conținutul de proteine a fost determinat folosind metodele Kjeldahl. pH-ul a fost măsurat cu un Titrator SI Analytics TitroLine® 5000 (Xylem Analytics, Letchworth, Marea Britanie) la 20°C. Proprietățile fizico-chimice, cu excepția pH-ului, au fost determinate doar în prima zi de depozitare.	ISO 1211:2010 IDF 1:2010; ISO 5534:2004 IDF 4:2004
Analize senzoriale	Cremă de brânză	Analiza senzorială a probelor de cremă de brânză a fost determinată utilizând scala de notare de 5 puncte, conform unui grup de 11 evaluatori selectați, specializați în domeniul dat.	ISO 22935-3:2009; ISO 8586:2012
Analiza caracteristicilor de textură	Cremă de brânză	Analiza profilului de textură a probelor de cremă de brânză a fost realizată cu un analizor de textura TA HD Plus C (Stable Micro Systems, Godalming, Marea Britanie). Parametrii texturali au fost determinați în zilele 1, 7, 14, 21 și 28.	Popescu et al., 2022

Notă: HPLC – cromatografie lichidă de înaltă performanță; CMI - cantitatea minimă de inhibiție, CMB - cantitatea minimă bactericidă

2.6 Caracteristica metodelor microbiologice utilizate pentru testări in vitro

Metoda microscopică a fost folosită pentru identificarea microbiană a implicat utilizarea microscopului optic cu imersie pentru a observa morfologia microorganismelor. Această metodă permite să descriem forma celulei, aranjamentul și unele elemente de structură endosporul și capsula, precum și alte componente structurale. Metoda a fost utilizată pentru confirmarea morfologică a tulpinilor luate în studiu. Ca material s-au utilizat coloniile crescute pe mediile de nutriție cu identificarea morfologică prin tehnica Gram și colorația simplă cu albastru de metilen.

Metoda difuzimetrică în godeuri a fost utilizată pentru determinarea efectului antimicrobian al pudrelor și extractelor vegetale menționate în tabelul 2.1. Pentru evaluarea activității antimicrobiene a extractelor de plante și metaboliților secundari se folosește frecvent metoda difuziei în godeuri cu agar. Suprafața plăcii cu agar este inoculată folosind un proces similar cu abordarea metodei difuzimetrică cu discuri, în care un volum de inoculum microbian este repartizat pe întreaga suprafață a agarului.

Pregătirea inoculului microbian. Un volum de 1 mL de soluție fiziologică se transferă cu pipeta într-o eprubetă cu geloză în pantă ce conține cultură bacteriană de 18 - 24 de ore, după care aceasta se agită, astfel obținându-se o suspensie bacteriană de turbiditate înaltă. Din suspensia obținută se prepară inoculum ce va corespunde etalonului de turbiditate 0,5 McFarland.

Procedura. Prealabil au fost preparate mediile de nutriție (agarul Muller Hinton) conform instrucțiunii producătorului și a fost sterilizat prin autoclavare, apoi repartizat în cutii Petri. Pentru testarea sensibilității, în majoritatea cazurilor se folosește mediul MullerHinton, care are o valoare nutritivă ce permite dezvoltarea optimă a unei mari varietăți de bacterii și nu conține inhibitori ai acțiunii unor AB. Este mediu de cultură optim pentru majoritatea germenilor nepretențioși patogeni, folosit cu succes de mulți ani, demonstrându-și calitățile. Mediul trebuie să aibă o grosime de $4 \pm 0,5$ mm. Dimensiunile plăcilor pot varia în dimensiuni în dependență de producători: placă circulară de 90 mm (~25 mL); placă circulară de 100 mm (~31 mL); placă circulară de 150 mm (~71 mL) și placă patrată de 100 mm (~40 mL). Adâncimea mediului nu trebuie să depășească valorile stabilite, deoarece compusul testat difuzează în mediu atât la suprafață cât și în profunzime.

Însămânțarea plăcilor, imersăm tamponul de vată în inoculum etalonat. Stoarcem excesul de lichid prin rotire fermă a tamponului pe peretele tubului. Epuizăm tamponul în striuri paralele pe toată suprafața plăcii de geloză, succesiv în 3 direcții prin întoarcerea plăcii cu câte 60 °C. În final se parcurge cu vârful tamponului toată circumferința plăcii la limita cu sticla. Placa însămânțată se lasă timp de 3 - 5 min (nu mai mult de 15 min), pentru absorbția inoculului. Se decupează godeuri în placa de geloză prin intermediul unui cilindru cu diametrul de 8 mm,

prealabil sterilizat. S-au efectuat un godeu sau trei, echidistant. Din momentul etalonării culturii, plăcile trebuie însămânțate în maximum 15 min. Aplicăm în godeuri substanțele pentru testare, prealabil dizolvate în soluție fiziologică sterilă. În fiecare godeu s-au picurat 3 picături. Plăcile au fost introduse în frigider timp de 30 de minute pentru a permite extractelor să difuzeze mai bine în geloză, apoi au fost incubate la temperatura de 37 °C timp de 16 - 18 ore.

Citirea și interpretarea: Măsurăm cu șublerul sau rigla gradată în mm diametrul zonelor de inhibiție completă a creșterii. Lipsa creșterii sau „activitatea antimicrobiană” se referă la toți agenții care pot inhiba creșterea microorganismelor, pot preveni formarea de colonii microbiene și, eventual, chiar le pot distruge. Cu cât diametrul zonei de inhibiție este mai mare, cu atât compusul este mai activ (CLSI, 2018; 2019).

Produsele de testat au fost dizolvate: 1 g produs în 4 mL de soluție fiziologică. Doar Păducelul a fost dizolvat: 1 g produs în 6 mL de ser fiziologic. Testări similare au fost efectuate în laboratorul AgroBioTech, Nitra, Slovacia. În calitate de microorganisme de testat s-au utilizat tulpini din Colecția Cehă de Microorganisme (CCM), menționate în tabelul 2.1. Culturile au fost reactivitate conform instrucțiunilor producătorului. La 10 mL bulion Muller-Hinton s-a adăugat tulpinile de testat, respectiv în fiecare tub (dried disk (liofilizat) , cu excepția *S. Enteritidis* - 100 μL. Culturile de microorganisme au fost lăsate să crească într-un incubator la 37 °C timp de 24 de ore. Trebuie de menționat că preparatele utilizate în aceste testări au fost cu o vechime de 3 ani (obținute în a. 2019).

Procedeu: Din cultura microbiană de 18-24 ore, s-a preparat suspensia conform standardului optic de opalescență (OD). Inițial s-a verificat densitatea optică a apei, ce trebuie să corespundă valorii zero, apoi s-a standardizat suspensiile din culturile de testat. Incipient s-a agitat la 2500 rpm (shaker IKA VORTEX), ulterior s-a ajustat OD (densitatea optică) 10^5 . Din fiecare tulpină de testat s-au inoculat câte 100 μL pe placa cu Muller Hinton agar cu spatula (prin inundare), pentru a obține creștere uniformă. S-au efectuat godeuri (cu un cilindru steril) cu diametrul de 6 mm. În fiecare godeu s-au introdus câte 0,1 g de pulbere de fructe de pădure. Plăcile au fost incubate la termostat la temperatura de 37 °C pentru 18 - 24 ore. Plăcile inoculate cu *C. perfringens* s-au introdus în anaerostat (gaz pachet pentru generarea condițiilor de anaerobioză). S-au interpretat rezultatele. După expirarea timpului de incubare, plăcile se scot din termostat.

S-a observat o creștere bacteriană confluentă pe plăci. Inhibarea creșterii bacteriene s-a apreciat prin absența creșterii bacteriene în jurul godeurilor (zonă de inhibiție). S-a măsurat diametrul zonei de inhibiții cu ajutorul șublerului. Diametrul cel mai mare de inhibare (zona transparentă în jurul godeului) a creșterii s-a considerat cel mai bun rezultat (cel mai activ preparat).

Măsurarea ratei de creștere a tulpinilor individuale. Ratele de creștere specifice ale tulpinilor individuale au fost calculate conform relației (Sandulachi et al., 2021):

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{\Delta t}, \quad (2.1)$$

unde:

X reprezintă numărul de bacterii la sfârșitul fazei de creștere exponențială;

X₀ - numărul de bacterii la începutul fazei de creștere exponențială;

Δt — intervalul de timp dintre observații.

Metoda diluțiilor. Determinarea concentrațiilor minime de inhibiție și concentrațiilor minime bactericide ale compușilor naturali. Metoda diluțiilor permite determinarea valorilor CMI, deoarece oferă posibilitatea de a estima concentrația agentului antimicrobian testat în bulion (macrodiluiție sau microdiluiție). Valoarea CMI înregistrată este definită ca cea mai mică concentrație a agentului antimicrobian testat care inhibă creșterea vizibilă a microorganismului testat și este de obicei exprimată în μg/mL sau mg/L. În studiu a fost utilizată metoda diluțiilor succesive (macrodiluiții în tuburi). Bulionul nutritiv se repartizează în cantitate de 1 mL în fiecare eprubetă. Numărul de eprubete se selectează în conformitate cu numărul dorit de diluții cu luarea în calcul și a martorului negativ. Incipient s-a preparat soluția (amestecul) de bază, la 1 g preparat se adaugă 1 mL soluție salină. Concentrația soluțiilor de lucru este calculată pe baza concentrației maxime necesare într-o serie de diluții în serie, luându-se în calcul și diluția preparatului care reiese din adăugarea lui ulterioară în mediul nutritiv.

Soluția de bază, într-o cantitate de 1 mL, se introduce în primul tub care conține 1 mL de bulion, prin intermediul unei pipete sterile. Se agită tubul, cu o pipetă nouă sterilă, se colectează 1 mL de bulion, care se transferă într-un al doilea tub cu aceeași cantitate de mediu nutritiv. Această procedură se repetă până când se prepară numărul necesar de diluții. Din ultimul tub se înlătură 1 mL de bulion. Astfel, în lucru vor fi luate o serie de eprubete cu soluții ale preparatului cu proprietăți antibacteriene, concentrațiile cărora diferă în tuburi adiacente de 2 ori. Se prepară inoculum din microorganismele de cercetat ce conține $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, ce trebuie să fie în conformitate cu standardul de turbiditate 0,5 McFarland. Apoi în fiecare eprubetă se introduce același cantitate de suspensie microbiană (0,01 mL).

Eprubetele se închid cu dopuri sterile din bumbac și tifon și se incubează la o temperatură optimă de 37 °C pentru 18 - 24 ore. Ulterior, a fost determinată valoarea CMI prin examinarea macroscopică a tuburilor pentru a testa prezența sau absența creșterii microorganismelor testate. Cea mai mică concentrație din tubul în care a fost inhibată creșterea vizibilă a culturii reprezintă valoarea CMI (mg/mL) pentru compusul testat. În celelalte tuburi și în tubul de control, turbiditatea mediului este atestată ca urmare a multiplicării microorganismelor. Această metodă a permis, de

asemenea, determinarea valorii CMB pentru compusul testat. Pentru determinarea CMB, din fiecare diluție au fost subcultivate plăci cu agar Müller-Hinton și incubate ulterior în termostat la o temperatură de 37 °C pentru 18 - 24 ore. S-au interpretat rezultatele. Valoarea CMB este dată de cea mai mică concentrație a compusului testat care reduce numărul de colonii de pe placă cu până la 99,9 %. Toate testele au fost efectuate în trei repetiții (Balouiri et al., 2016; Lozan -Tîrșu, 2016; CLSI, 2018; 2019).

Metoda microdiluțiilor în placi. Cele mai frecvent utilizate metode pentru determinarea efectului antimicrobian al plantelor sunt testul de difuzie în geloză (metoda godeurilor), metoda macodiluțiilor și microdiluțiilor. Metoda difuziei în geloză este o metodă cantitativă și nu determină CMI și CMB. Metoda diluțiilor este utilă pentru determinarea CMI și CMB a unui număr mare de probe, care necesită cantități mici de substanțe. Acesta poate fi deosebit de important dacă antimicrobianul este limitat, așa cum este cazul pentru multe produse naturale. Această metodă poate fi folosită și pentru o mare varietate de microorganisme, nu este costisitoare și prezintă rezultate reproductibile. Scopul acestui studiu a fost evaluarea metodei microplăcilor pentru determinarea activității antimicrobiene ale extractelor și produselor naturale. În cercetare pentru metoda calitativă difuzimetrică cât și pentru metoda microdiluțiilor s-au utilizat preparate cu o vechime de doi ani (2020).

Metoda de extracție etanolică. Pentru determinarea CMI și CMB prealabil a avut loc extracția substanțelor active. Prealabil din fiecare preparat s-au cântărit câte 2,5 g după care s-au adăugat 25 mL de etanol de 96 %. Apoi preparatele s-au introdus în camera de incubare cu agitare (incubator shaker) pentru o săptămână la temperatura 25 °C cu frecvența de 150 min⁻¹. A fost utilizat dispozitivul „Shaker incubator GFL 3031”. După agitare timp de o săptămână, s-au filtrat preparatele (C6, R1, R4, AGA, Mr. Sandu) cele care au manifestat efect antibacterian, prin hârtie de filtru (hârtie de filtru Whatman Nr. 1). Extragerea substanței active (obținerea extractelor) s-a efectuat cu ajutorul aparatului „Rotary Vacuum Evaporator (witegvapor HS2005S-N)” la baia de apă la temperatura de 40 °C. Extracția s-a efectuat la 20 min⁻¹ în vid. Etanolul s-a obținut prin evaporare în vid. Ulterior DMSO (dimetil sulfoxid) 1 % s-a utilizat ca solvent. S-a adăugat 1000 μL de DMSO pentru fiecare extract.

Metode standard de verificare a indicatorilor. În lucrare s-au determinat: NGMAFA (Numărul total de germeni mezofili, aerobi, facultativ anaerobi); bacterii coliforme; *S. aureus*; Microorganisme patogene, inclusiv *Salmonella* spp. Verificarea, mai ales în caz de suspiciune de contaminare, prezintă informații despre gradul de încărcare bacteriană, tipul microorganismelor și implicit cu prospețimea cărnii. Se determină numărul total de germeni (NTG) aerobi mezofili, ce

reprezintă un indicator sanitar; furnizeaza date privind gradul de contaminare al produsului cercetat. Bacteriile coliforme indică contaminarea de origine fecală *Salmonella*.

Conform normativelor în vigoare crenvurști sunt cercetați la următorii indicatori:

- NGMAFA 1×10^3 UFC/g (nivel maxim admisibil).
- Bacterii coliforme în 1,0 g – absent.
- Clostridii sulfitreductoare în 0,01 g – absent.
- *S. aureus* în 1,0 g – absent.
- M/o patogene, inclusiv *Salmonella* spp. în 25,0 g – absent.
- *L. monocytogenes* în 25,0 g – absent.:

Toți indicatorii sunt investigați conform documentelor normative

Reguli specifice pentru pregătirea cărnii și a produselor din carne – SM EN ISO 6887-2:

- NGMAFA - SM EN ISO 4833-1 B. coliforme – SM ISO 4831 (metoda de detecție).
- *S. aureus* – SM SR EN ISO 6888-3 (metoda de detecție).
- *Salmonella* spp. – SM EN ISO 6579-1 (metoda de detecție).
- *L. monocytogenes* – SM EN ISO 11290-1 (metoda de detecție).

NGMAFA (SM EN ISO 4833-1) Se iau 10 g de produs și 90 mL de soluție pentru diluții (0,1 % apă peptonă). Se agită bine într-un mixer. Se obține o diluție 10^{-10} (SM EN ISO 6887-2). În acest caz, nivelul maxim admis de mezofili aerobi și facultativi anaerobi este de 1×10^3 UFC/g. Reșind din aceasta, se fac însămânțări pe două plăci din fiecare diluție. Din 10^{-1} câte 1 mL pe două plăci și din 10^{-2} câte 1 mL pe două plăci. Peste inoculum se toarnă 15 - 20 mL de agar nutritiv topit și răcit la 45 °C. Se agită plăcile prin rotație, apoi se lasă agarul să se răcească și să se solidifice (15 - 20 de minute). Se incubează pentru 72 ore la temperatura de 30 ± 1 °C. După 72 de ore se determină numărul de colonii.

Bacterii coliforme (SM ISO 4831) Din proba preparată, adică din diluția de 10^{-1} , se prelevă 10 mL de probă (corespunzător unui gram material de inoculat) și se introduce în bulion LST (lauryl tryptose broth), 90 mL concentrație standard sau 10 mL concentrație dublă. Se incubează pentru 24 de ore la 37 °C. Dacă în ziua următoare se observă turbiditate și formarea de gaz în proba testată, se fac însămânțări pe mediu de confirmare. Se incubează pentru 24 - 48 ore la 37 °C. Prezența turbidității, formarea acidului (fermentația lactozei) și a gazelor, indică prezența bacteriilor coliforme. Dacă nu se constată aceste schimbări, atunci rezultatul se consideră negativ. Bacteriile coliforme într-un gram produs trebuie să fie lipsă.

***S. aureus* (SM SR EN ISO 6888-3) Metoda de detecție** Din proba preparată, adică din diluția de 10^{-1} , se prelevă 10 mL de probă (corespunzător unui gram material de inoculat) și se introduce în GC bulion - mediu de îmbogățire (90 mL de concentrație standart sau 10 mL de

concentrație dublă), se toarnă ulei de vazelina pentru a crea condiții de anaerobioză. Se incubează pentru 24 de ore la 37 °C. După 24 - 48 de ore se inoculează pe geloza salină cu galbenuş de ou. Se incubează pentru 48 de ore la 37 °C. Coloniile caracteristice: diametru 1,5 - 2,5 mm, cu o zonă de lecitiniză (halou în jurul coloniei). Test de confirmare – plasmocoagulaza.

Salmonella (SM EN ISO 6579-1) Metoda de detecție Se cântărește 25 g de produs, la care se adaugă 225 mL apă peptonă de 1 %. Se termostatează 24 de ore la 37 °C. A doua zi, se efectuează însămânțări pe medii lichide de îmbogățire: 0,1 mL suspensie în 10 mL RVS. Se termostatează pentru 24 ore la 42 °C, după care 1,0 mL de suspensie se reînsămânțează în 10 mL mediu de îmbogățire cu incubare timp de 24 de ore la 37 °C. Dacă se determină creștere caracteristică, din fiecare placă se selectează minimum 5 colonii suspecte, care se repică pe mediu Kligler, apoi se identifică prin determinarea proprietăților biochimice și structurii antigenice.

2.7 Metode de testare *in situ* a efectului antibacterian al pulberilor și extractelor vegetale

A fost determinată acțiunea antibacteriană *in situ* a produselor extractelor și pulberilor vegetale (fructe de pădure, tescovină de struguri, busuioc, cimbru și tarhon) pe produse din carne (crenvuști) și lactate (cremă de brânză, înghețată). Pentru realizarea testărilor, produsele cu adaosuri vegetale și probele martor au fost infectate cu tulpini de referință (*S. aureus* ATCC 25923, *S. Abony* NCTC 6017 și *E. coli* ATCC 25922). Ulterior a fost testată capacitatea de proliferare a microorganismelor inoculate. Incipient s-au pregătit probele de crenvuști. Câte 1,0 gr de fiecare probă, s-a mărunțit în mojar, apoi s-au adăugat suspensia de culturi bacteriene *S. aureus*, *S. Abony* și *E. coli* câte 1 μl standardizate conform standardului de turbiditate 0,5 McFarland. Ulterior probele s-au incubat în termostat la temperatura de 37 °C pentru 24 ore, timp pentru dezvoltarea tulpinelor. Probele infectate ce conțin diferite extrase vegetale (martor, busuioc, cimbru, tarhon, cătină, măceșe) au fost pregătite și menținute 24 și 48 ore pentru a determina efectul antibacterian.

A doua zi s-au făcut diluții zecimale a fiecărei probe infectate. La 1g de proba infectată s-a adăugat 9 mL soluție fiziologică. S-au efectuat șase diluții. Ulterior, s-au făcut repicări pe medii optime tulpinelor de testat. Repicările s-au făcut din diluțiile -3 și -6, a câte 2 picături din diluțiile respective și însămânțate cu spatula Drigalski pe placi Petri. Plăcile inoculate au fost incubate la temperatura de 37 °C pentru 24 ore, s-au interpretat rezultatele, s-a determinat numărul de colonii.

2.8 Modelarea matematică

Analiza informațională a datelor experimentale permite stabilirea influențelor dintre diversele mărimi experimentale (Fellin, 2005; Fellin, W. Analyzing Uncertainty in Engineering.

Ed. Springer, Berlin, Germany, 2005). Informația mutuală reprezintă o măsură cantitativă a interdependenței caracteristicilor unui sistem și constituie un concept ce oferă măsura cantitativă a reducerii incertitudinii. Unitatea de măsură a informației este bitul, o măsură a interdependenței dintre variabile. Cu cât influența factorilor analizați (temperatură, timp de păstrare) asupra parametrilor de calitate este mai pronunțată, cu atât valoarea în biți este mai mare. Programul MATLAB (MathWorks, Inc., Natick, MA, SUA) a fost aplicat pentru analiza informațională. Au fost elucidate influența timpului de păstrare și a concentrației asupra parametrilor texturali, pH și acceptabilitatea generală a probelor de cremă de brânză.

2.9 Analiza statistică a rezultatelor

Toate calculele au fost efectuate folosind Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, SUA). Datele obținute în acest studiu sunt prezentate ca valori medii \pm eroarea standard a mediei, calculată din trei experimente paralele. A fost calculată abaterea medie pătratică:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (2.2)$$

Dispersia de selecție (2.3) și devierea standard a mediei (2.4) :

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.3)$$

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (2.4)$$

Ulterior a fost evaluat intervalul de certitudine folosind testul Student:

$$\bar{x} \pm t_s \cdot S_{\bar{x}}, \quad \text{sau} \quad \bar{x} \pm \frac{t_s \cdot S}{\sqrt{n}} \quad (2.5)$$

A fost aplicat un prag de certitudine de 95 %.

Compararea valorilor medii s-a bazat pe analiza unidirecțională a varianței (ANOVA) conform testului Tukey, la un nivel de semnificație de $p \leq 0,05$, folosind programul Statgraphics, Centurion XVI 16.1.17 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA, SUA).

2.10 Concluzii la capitolul 2

1. Cercetările au prevăzut un studiu analitic complex, care a oferit posibilitatea evidențierii efectului antimicrobian. Investigațiile au fost structurate și desfășurate în etape. Abordările

microbiologice, sociologice și biochimice corespund principiilor și tendințelor actuale de cercetare. Studiul a fost efectuat în mai multe etape cu utilizarea metodelor istorico-bibliografice, matematico-statistice, analitice, microbiologice, chimice și de comparare.

2. Pentru realizarea tezei de doctor în calitate de obiecte de studiu au fost utilizate tulpini de referință ce provin din American Type Culture Collection (ATCC), oferite de Agenția Națională pentru Sănătate Publică și Colecția Cehă de Microorganisme, care au permis de a evidenția corect și la nivel metodologic adecvat activitatea antimicrobiană a preparatelor biologice. În studiu au fost incluse microorganisme Gram pozitive, Gram negative și fungi.

3. În cercetare au fost utilizate metode calitative și cantitative. Pentru determinarea efectului antimicrobian au fost utilizate metoda difuzimetrică în godeuri și metoda diluțiilor succesive. Testările au fost efectuate *in vitro*.

4. S-a determinat *in vitro* efectul microbiostatic și microbicid la contact direct cu diferite tipuri de pulbere vegetală obținute din fructe de pădure (cățina albă, măceș, aronia, păducel) și șrot din fructe de cățina albă, măceș și tescovina de struguri, cu microorganisme patogene, care pot să cauzeze alterarea produselor alimentare.

5. S-a stabilit *in situ* a efectului microbiostatic a unor fracții vegetale bogate în compuși fenolici pe diferite matrici de produse alimentare (carne și mezeluri, produse lactate).

6. Metodele, utilizate în cercetare au permis determinarea la grad științific aprofundat a activității compușilor biologici asupra microorganismelor implicate în etiologia infecțiilor alimentare.

7. Rezultatele cercetării au fost supuse analizei statistice detaliate cu utilizarea diverselor metode matematice, ceea ce a permis aprecierea veridicității. Strategia analizei datelor a fost selectată în raport cu obiectivele propuse și tipul de date analizate, ceea ce a făcut posibilă formularea de concluzii și de recomandări practice.

3. EFECTUL ANTIMICROBIAN AL PREPARATELOR DE ORIGINE NATURALĂ

În lucrare a fost testat efectul antibacterian al preparatelor naturale pe diverse tipuri de microorganisme Gram-pozitive și Gram-negative: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Aboni* NCTC 6017, *Bacillus cereus*, ATCC11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, *Candida albicans* ATCC 10231 (Agenția Națională pentru Sănătate Publică) și *Staphylococcus aureus* CCM 2461, *Listeria monocytogenes* CCM 4699, *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* CCM 1991, *Clostridium perfringens* CCM 4991, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Shigella sonnei* CCM 4421, *Salmonella Enteritidis*, CCM 4420, *Escherichia coli* CCM 3954 (Colecția Cehă de Microorganisme, Nitra, Slovacia). În calitate de preparate naturale cu efect antibacterian au fost utilizate pulbere și extracte din următoarele fructe de pădure: cătină, măceșe, tescovină din struguri, aronie, păducel și plante aromatice: busuioc, cimbru, rozmarin.

3.1 Determinarea activității antimicrobiene a pulberilor vegetale prin metoda godeurilor

Testarea *in vitro* a probelor s-a realizat pe tulpini ATCC, oferite de Agenția Națională pentru Sănătate Publică (ANSP) și Czech Collection of Microorganisms, din cadrul Centrului de Cercetare AgroBioTeh, Nitra, Slovacia. Tulpinile ATCC utilizate au fost revigorate prin creștere peste noapte în bulionul Mueller Hinton, la 37 °C. Tulpinile au fost apoi diluate la o densitate optică (OD) de 0,5 McFarland standard ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Primul pas către validarea eficacității produsului natural ca potențial antibacterian este analiza activității antibacteriene *in vitro*, în care au fost utilizate în trecut multe metode de testare a sensibilității bacteriilor (Seidel, 2006).

Scopul studiului a fost de a determina dacă agenții etiologici sunt rezistent sau sensibil la agenții antimicrobieni naturali testați în condiții de laborator (*in situ*). Activitatea potențială antibacteriană a pulberilor din fructe de pădure și a extractelor a fost inițial determinată prin metoda difuziei în godeuri cu agar. În conformitate cu obiectivele preconizate, pe parcursul cercetării s-a determinat *in vitro* efectul microbiostatic și microbicid la contact direct cu diferite tipuri de pulbere vegetală obținute din fructe de pădure (cățina albă, măceș, aronia, păducel) și șrot din fructe de cățina albă, măceș și tescovina de struguri, cu microorganisme patogene, care pot provoca alterarea produselor alimentare – *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* și *Klebsiella pneumoniae* reprezintă cele mai frecvente cauze ale îmbolnăvirilor în masă a

populației din cauza alimente contaminate cu aceste bacterii ce prezintă riscuri pentru sănătatea umană (tab. 3.1). *Klepsiella pneumoniae* aparține familiei Enterobacteriaceae și prezintă un patogen important, responsabil pentru infecțiile asociate asistenței medicale, urinare, a tractului respirator și a infecțiilor de flux sangvin, fiind responsabil pentru mai mult de 70 % din infecții, contaminarea fiind posibilă în urma manipulării alimentelor (Ghendov-Moșanu et al., 2018; Sandulachi et al., 2021). Datele din tabelul 3.1 demonstrează existența impactului antimicrobian a pulberilor din fructe de pădure (cățina albă, măceș, aronia, păducel) și șrot din fructe de cățina albă, măceșe și tescovina de struguri din soiuri roșii, împotriva bacteriilor Gram negative și Gram pozitive.

Tabelul 3.1 Zonele de inhibiție a pulberilor vegetale asupra microorganismelor patogene

Pulbere	Diametrul zonei de inhibiție completă a creșterii, mm			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883
Cățina	22,0±0,2	20,0±0,2	18,2±0,3	17,4±0,4
Șrot de cățina	18,0±0,1	17,1±0,3	15,2±0,3	13,2±0,3
Măceș	16,0±0,3	15,1±0,2	10,3±0,4	9,3±0,3
Șrot de măceșe	12,0±0,2	12,2±0,2	9,3±0,3	8,1±0,1
Tescovina de struguri	11,0±0,1	11,0±0,3	9,2±0,2	7,3±0,2
Aronia	10,0±0,2	9,4±0,4	7,1±0,1	7,2±0,2
Păducel	10,0±0,1	11,2±0,2	8,2±0,2	7,2±0,2

Notă: *Valorile fiecărui test realizat în triplicate și calculat ca medie ±eroare standard (SE), analiza statistică - ANOVA, ($\alpha \leq 0,05$) cu GraphPad 5

Acțiunea pulberilor vegetale a fost studiată pe tulpini bacteriene Gram pozitive și Gram negative. Toate preparatele au manifestat activitate antimicrobiană. Pulberile vegetale din cățina albă au manifestat efect inhibitor față de toate tulpinile testate. Un efect accentuat au dovedit pulberile din cățina albă. Șrotul de cățina are de asemenea acțiune vădită asupra tuturor tulpinilor luate în studiu. Cățina și șrotul de cățina au fost foarte active față de *S. aureus*, diametrul zonei de inhibiție este de 22±0,2 mm și pentru șrotul de cățina de 18±0,1 mm în diametru (fig. 3.1).

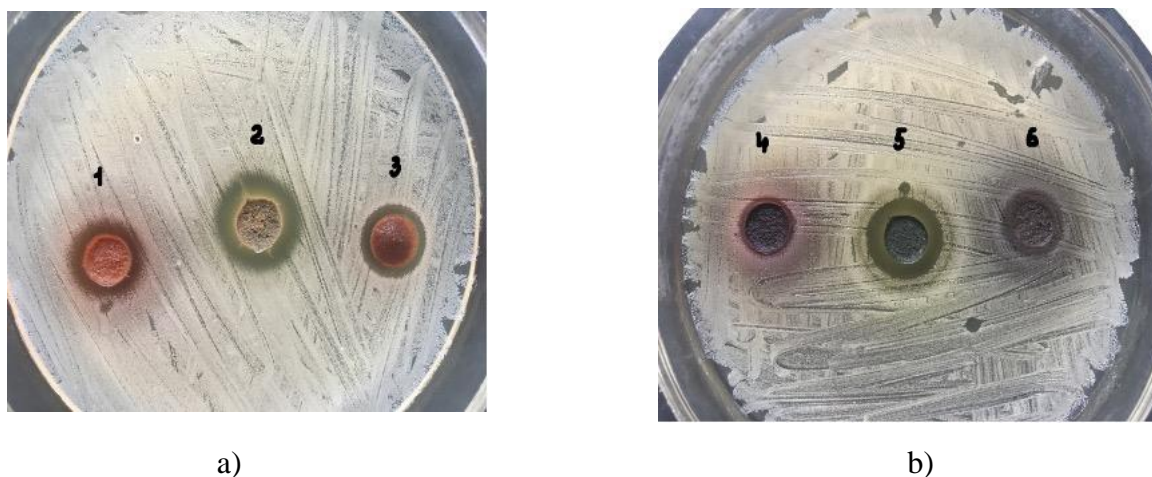


Figura 3.1 Acțiunea diferitor tipuri de materie vegetală asupra tulpinei de *S. aureus*.
a) 1 - păducel; 2 - șrot de cățină; 3 - măceș; b) 4 - aronia; 5 - cățină; 6 - tescovina de struguri.

Conform figurii 3.1, pulberea din măceșe a demonstrat un efect mai moderat, diametrul zonei de inhibiție $16\pm 0,3$ mm pentru *S. aureus* și $15\pm 0,2$ mm pentru *B. subtilis*. Aronia și păducelul au o valoare de activitate antibacteriană mai redusă, diametrul zonei de inhibiție este $10\pm 0,1$ mm pentru *S. aureus* și, respectiv, $9,3\pm 0,3$ și $11\pm 0,1$ mm pentru *B. subtilis*.

Aceleași pulberi vegetale au fost utilizate pentru bacteriile Gram negative. *E. coli* și *K. pneumoniae* au fost mai sensibile față de preparatele de cătină, diametrul de inhibiție fiind $18\pm 0,1$ mm pentru *E. coli* și $17\pm 0,3$ mm pentru *K. pneumoniae*. Măceșul și tescovina au manifestat efect moderat față de aceste bacterii. Activitatea antibacteriană cu valori mai reduse au manifestat aronia și păducelul cu un diametru inhibitor echitabil pentru ambele tulpini (tab. 3.1). Din datele obținute putem concluziona că preparatele de cătină sunt active asupra tulpinilor luate în studiu. Bacteriile Gram pozitive s-au dovedit a fi mai sensibile, în special *S. aureus*.

Conform unor autori, aronia a fost activă asupra *S. aureus* și *S. Typhimurium*, dar asupra *E. coli* nu a demonstrat eficacitate (Dilaranur, 2023). Potrivit Liepiņa și cercetătorii, studiile anterioare au arătat că extractele de aronia posedă proprietăți inhibitoare împotriva creșterii bacteriilor gram-negative, în special *P. aeruginosa* și *S. Typhimurium*, dar nu au fost detectate activități inhibitorii împotriva *E. coli* (Liepiņa et al., 2013). Liepiņa și colegii au remarcat că extractele etanolice și lichide derivate din *A. melanocarpa* sunt efective asupra bacteriilor gram- pozitive precum *B. cereus* și *S. aureus*. Autorii din Coreea au determinat activitatea antibacteriană a aroniei asupra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii* și *Salmonella* Enteritidis. Studiul lor a precizat că extractul de *Aronia melanocarpa* a fost mai eficient împotriva bacteriilor Gram-pozitive decât bacteriilor Gram negative (Kim, et al., 2018).

Prin metoda difuziei în godeuri s-a determinat activitatea antibacteriană a tescovinei de struguri de către cercetătorii Yixiang Xu, Sheanell Burton. Extractele au prezentat activitate antibacteriană împotriva *L. monocytogenes* și *S. aureus*, dar nu a fost detectată activitate antibacteriană împotriva *E. coli* O157:H7 și *S. Typhimurium* (Xu et al., 2016). Rezultatele noastre concordă parțial cu studiile anterioare ale tescovinei de struguri care au demonstrat activitate antibacteriană atât împotriva bacteriilor Gram-pozitive, cât și împotriva bacteriilor Gram-negative și că extractele au fost mai eficiente împotriva bacteriilor Gram-pozitive. Nada El Darra și colaboratorii (2012) au constatat că activitatea antimicrobiană a fost mai eficientă împotriva tulpinilor Gram-pozitive decât Gram-negative și a tulpinilor levuri. În plus, rezultatele noastre au evidențiat un rol semnificativ al efectului antimicrobian asupra *S. aureus* în comparație cu studiile efectuate de Yousef I. Hassan și colegii (2019).

Studiul lui Ocksook Ya (Yi et al., 2007) a detectat activitatea antibacteriană la măceșe. Creșterea bacteriilor Gram-pozitive, cum ar fi *E. faecalis*, *B. subtilis* și *S. aureus*, inclusiv o tulpină

rezistentă la meticilină, a fost inhibată de extractele de măceș, diametrul zonei de inhibiție constituind $15\pm 0,2$, $18\pm 0,3$ și $17\pm 0,3$ mm, iar a bacteriilor Gram-negative, *E. coli* și *P. aeruginosa* nu a fost inhibată de măceș. În studiul nostru măceșul a fost activ asupra *B. cereus* și *S. aureus* cu o zonă de inhibiție de 16 și 15 mm, iar bacteriile Gram negative *E. coli*, *K. pneumoniae* au fost sensibile (10 și 9 mm) la acțiune măceșului, dar mai moderat. Prerna et al. (2021) au arătat că preparatele din măceș au o activitate antibacteriană puternică împotriva *E. coli*, *P. aeruginosa*.

Cercetătorii din Serbia au efectuat screeningul păducelului asupra bacteriilor Gram pozitive (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*), Gram-negative (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. talaasii*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *P. mirabilis*) și levuri *C. albicans* prin metoda difuzimetrică. Conform rezultatelor obținute de ei păducelul a avut un efect bacteriostatic mai moderat în special împotriva bacteriilor Gram-pozitive *B. subtilis* și *L. monocytogenes*. Pe de altă parte, extractul nu a manifestat efect asupra levurilor *C. albicans* (Tadic et al., 2008). Alți cercetători au obținut rezultate similare studiului nostru și demonstrează o activitate diminuată a păducelului asupra microorganismelor luate în studiu (Güven et al., 2006).

3.1.1 Efectul antimicrobian a diferitor soiuri de cătină, determinat prin metoda godeurilor

În continuare au fost utilizate diverse tipuri de cătină sub formă de pudră (R1, 2, 4, 5; C6, AGG, AGA, Pomona, Mr. Sandu, Seirola). Spre testare au fost selectate tulpinile standard: *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *Stafilococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *B.subtilis* ATCC 6633, ce induc alterarea produselor alimentare (tab.3.2).

Tabelul 3.2. Zonele de inhibiție a diferitor soiuri de cătină asupra microorganismelor patogene

Cătina	Diametrul zonei de inhibiție completă a creșterii, mm				
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
R1	22,0±0,2	19,3±0,4	Lipsă	12,4±0,5	Lipsă
R2	24,2±0,3	22,2±0,2	13,1±0,2	13,5±0,6	Lipsă
R4	26,1±0,3	24,3±0,2	15,2±0,1	15,2±0,3	Lipsă
R5	26,2±0,4	25,2±0,3	14,3±0,3	15,4±0,4	Lipsă
C6	24,2±0,3	26,4±0,5	14,3±0,3	17,4±0,2	Lipsă
AGG	29,2±0,5	28,2±0,3	18,2±0,3	18,2±0,4	Lipsă
AGA	30,3±0,4	29,4±0,4	18,2±0,5	18,4±0,2	Lipsă
Pomona	21,3±0,2	22,2±0,1	Lipsă	12,3±0,2	Lipsă
Mr. Sandu	28,2±0,3	27,4±0,3	11,3±0,2	18,3±0,4	Lipsă
Seirola	25,4±0,3	26,4±0,2	13,2±0,4	15,2±0,3	Lipsă

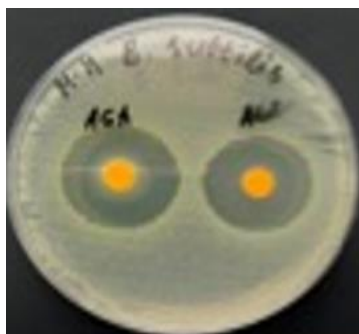
Notă: Valorile fiecărui test realizat în triplicate și calculat ca medie ±eroare standard (SE), analiza statistică - ANOVA, ($\alpha \leq 0,05$) cu GraphPad 5, Lipsa – lipsa efectului antimicrobian.

În categoria fungilor patogeni a fost utilizată *C. albicans* ATCC 10231. Conform rezultatelor obținute s-a constatat, că toate tipurile de cătină au activitate pronunțată asupra microorganismelor testate, excepție este *C. albicans* ATCC 10231.

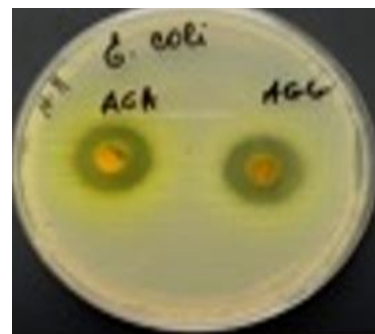
Cea mai înaltă activitate bacteriostatică asupra bacteriilor *S. aureus* ATCC 25923 au manifestat-o preparatele din soiurile de cătină AGA și AGG cu un diametru de 30 mm și respectiv 29 mm. Efectul antibacterian față de *B. subtilis* a fost semnificativ mai ridicat în cazul AGA și AGG, cu o zonă de inhibiție de 29 și 28 mm (fig. 3.2).



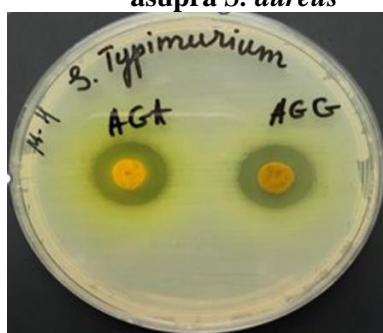
Activitatea AGA și AGG asupra *S. aureus*



Activitatea AGA și AGG asupra *B. subtilis*



Activitatea AGA și AGG asupra *E. coli*



Activitatea AGA și AGG asupra *S. Typhimurium*



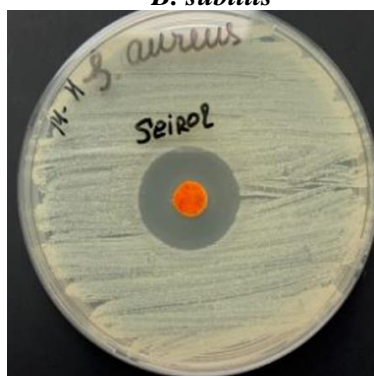
Activitatea C6 și R5 asupra *B. subtilis*



Activitatea R2, R4 asupra *E. coli*



Activitatea Seiroi asupra *B. subtilis*



Activitatea Seiroi asupra *S. aureus* ATCC 25923



Activitatea R2, R4 asupra *S. aureus* ATCC 25923

Figura 3.2 Acțiunea diferitor soiuri de cătină asupra bacteriilor Gram pozitive și Gram negative.

Alte tipuri de cătină de asemenea sunt active asupra tulpinilor Gram pozitive cu o diferență de 2-3 mm. A fost remarcat, că soiurile de cătină alba AGA și AGG sunt foarte active, inclusiv și pe tulpinile Gram negative, cu excepția *S. Typhimurium*. În cazul tulpinilor Gram negative *S. Typhimurium* și *E. coli* au dus la apariția zonelor de inhibiție semnificativ mai mici în comparație cu tulpinile Gram negative. Însă față de tipurile de cătină AGA și AGG aceste tulpini au manifestat același nivel de sensibilitate. Soiurile de cătină Pomona și R1 nu au inhibat creșterea *S. Typhimurium*. Cea mai sensibilă tulpină față de aceste preparate este *S. aureus*. În concluzie putem remarca că aceste preparate au acțiune antibacteriană diferită și depinde de tipul de microorganism. Bacteriile Gram pozitive sunt mai sensibile față de toate tipurile de cătină. Efectul antifungic al soiurilor noi de cătină asupra *C. albicans* ATCC 10231 nu a fost scos în evidență prin metoda difuziei în gel.

3.1.2 Rezistența în timp a activității antimicrobiene a pulberilor vegetale

A fost evaluat efectul antimicrobian pulberilor vegetale după doi ani de păstrare (2020 - 2022). Prezentul studiu a fost realizat pentru a determina impactul antimicrobian cu posibilitatea de-a evalua eficacitatea acestora la păstrare.

În acest scop au fost utilizate tulpinile de referință prezentate în tabelul 2.1. Tulpinile au fost oferite de Universitatea Slovacă de Agricultură din Nitra, Facultatea de Horticultură și Inginerie Peisagistică și Agrobiologie, Centrul de Cercetare AgoBioTech, Nitra, Slovacia. Testările s-au efectuat pe tulpini Gram pozitive (*Staphylococcus aureus* CCM 2461, *Listeria monocytogenes* CCM 4699, *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* CCM 1991, *Clostridium perfringens* CCM 4991) și Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Schigella sonnei* CCM 4421, *Salmonella. Enteritidis* CCM 4420, *Escherichia coli* CCM 3954).

Pentru testare s-au utilizat pulberile naturale de măceșe, tescovină și soiuri noi de cătină cultivate în Republica Moldova. Pulberile vegetale au fost testate după o perioadă de 2 ani de la producerea acestora (2020-2022). Pentru a aprecia eficacitatea acestor preparate în timp, după o perioadă de doi ani, s-au folosit metode cantitative (metoda diluțiilor) și calitative (metoda difuzinetrică în godeuri) de determinare a activității antibacteriene (tab. 3.3).

În perioada de doi ani și până la utilizare, aceste pulberi naturale din fructe de pădure și tescovina din struguri roșii au fost păstrate în condiții de vacuum, în mediu uscat, la întuneric și la temperatura camerei. Conform rezultatelor obținute în tabelul 3.3, se constată că diferitele tipuri de tescovină din soiuri de struguri roșii nu au manifestat activitate asupra tulpinelor de referință testate menționate în tabelul 3.3. Pe lângă aceasta, pulberile de măceșe de asemenea nu au manifestat activitate antibacteriană asupra tulpinilor de referință luate în studiu.

Tabelul 3.3 Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale în timp* asupra microorganismelor patogene

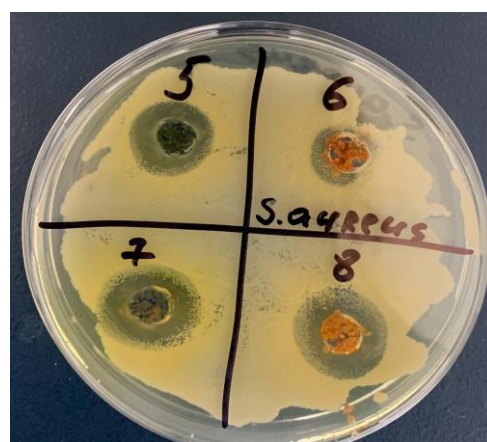
Pulbere	Diametrul zonei de inhibiție completă a creșterii (mm)								
	<i>S. aureus</i> CCM 2461	<i>L. monocytogene</i> CCM4699	<i>B. cereus</i> CCM2010	<i>B. subtilis</i> CCM1991	<i>C. perfringens</i> CCM4991	<i>E. coli</i> CCM3954	<i>S. sonnei</i> CCM 4421	<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	<i>S. Enteritidis</i> CCM 4420
1 -FN tescovina Bugac	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	6,8
2-FN mesca tescovina	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă
3- FN sem tescovina	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă
4-Măceșe	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă	Lipsă
5-C6-cătină	15,2±0,1	6,8±0,4	14,2±0,1	11,4±0,3	Lipsă	14,4±0,3	15,4±0,3	16,2±0,3	14,2±0,1
6-R1 cătină	12,3±0,2	Lipsă	11,3±0,1	6,8±0,4	Lipsă	Lipsă	12,2±0,2	12,5±0,3	16,4±0,3
7- AGA - cătină	18,3±0,1	13,2±0,3	15,3±0,2	14,2±0,3	Lipsă	12,5±0,2	19,3±0,3	15,2±0,4	18,6±0,5
8 -R4 - cătină	19,3±0,2	14,5±0,4	16,4±0,6	14,2±0,3	Lipsă	12,4±0,1	17,0±0,3	16,5±0,5	18,2±0,3
9 -Mr.Sandu - cătină	17,5±0,4	13,5±0,3	14,3±0,2	16,0±0,3	Lipsă	11,4±0,5	14,4±0,3	19,2±0,3	17,0±0,2

Notă: * - după o perioadă de păstrare de doi ani (2020 -2022), condiții ambientale. Lipsa efectului antibacterian. Valorile fiecărui test realizat în triplicate și calculat ca medie \pm eroare standard (SE), analiza statistică - ANOVA, ($\alpha \leq 0,05$) cu GraphPad 5.

Inițial s-a efectuat screeningul difuzimetric pentru a determina efectul antibacterian al tescovinei de struguri și măceșelor, iar deoarece prin această metodă nu s-a demonstrat activitate, în continuare nu s-a apreciat CMI și CMB al acestor preparate.



a)



b)

**Fig. 3.3 Acțiunea preparatelor (pulberilor) din cătină (5-C6); (6-R1); (7-AGA); (8-R4)
a) *S. sonnei*; b) *S. aureus***

Un efect minim la demonstrat preparatul FN Bugac cu o zonă de inhibiție de 6,8 mm pentru *S. Enteritidis* CCM 4420. Măceșele nu au manifestat efect antibacterian microorganismele testate. *Staphylococcus aureus* a prezentat cea mai mare sensibilitate față de preparatele de cătină iar zonele de inhibiție înregistrate au fost 15, 12, 18, 19 și 17 mm pentru C6, R1, AGA, și R4 respectiv, Mr. Sandu (fig. 3.3b). Cu toate acestea, zonele de inhibare înregistrate ale *Staphylococcus aureus* la pulberile AGA și R4 au fost mai pronunțat cu diametrul de 18 și 19 mm. În cazul *Listeria monocytogenes* acțiunea acestor preparate a dus la apariția unor zone de inhibiție semnificativ mai mici (13, 14 mm) iară față de R1 nu este sensibilă *Listeria monocytogenes*. Tulpinele de *Bacillus subtilis* și *Bacillus cereus*, ambele Gram pozitive, au manifestat sensibilitate echivalentă față de aceste pulbere vegetale.

Bacteriile Gram negative luate în studiu au demonstrat sensibilitate diferită față de pulberile vegetale. În urma testărilor in vitro s-a determinat că cele mai mari zone de inhibiție dintre preparatele vegetale au fost înregistrate la soiul de cătină albă - preparatul AGA, iar zonele de inhibiție au fost de 12, 19,15 și 18 mm la *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* (fig. 3.4a). Alte preparate din cătină au demonstrat activitate antibacteriană ne semnificativă.

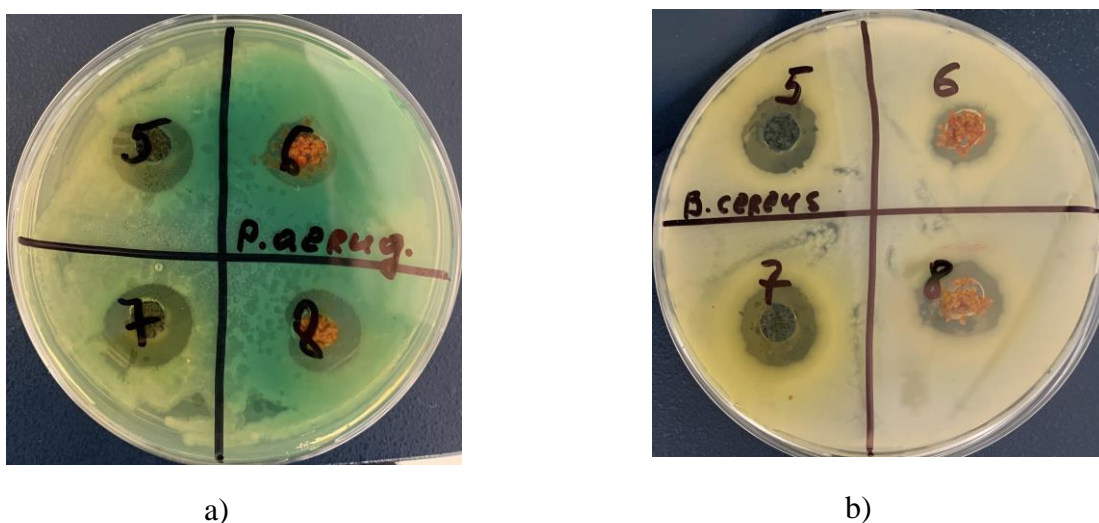


Fig. 3.4. Acțiunea pulberilor din cătină (5-C6); (6-R1); (7-AGA); (8-R4):

a) *P. aeruginosa*; b) *B. cereus*

În figurile 3.3 și 3.4 prin cifrele 5, 6, 7, 8 sunt indicate soiurile de cătină 5-C6;6-R1;7-AGA;8-R4. Cel mai sensibil microorganism gram negativ față de preparatele testate s-a dovedit a fi *S. Enteritidis* cu un diametru ce a variat între 14, 16, 18, 17 mm la preparatele C6, R1, AGA, R4 și respectiv M. Sandu, urmat de *Pseudomonas aeruginosa* și *Shigella sonnei*. Astfel din preparatele testate cel mai activ s-a dovedit a fi preparatul din cătină AGA, iar tulpina ce-a mai sensibilă este

Staphylococcus aureus dintre bacteriile Gram pozitive și *Salmonella* Enteritidis dintre bacteriile Gram negative testate.

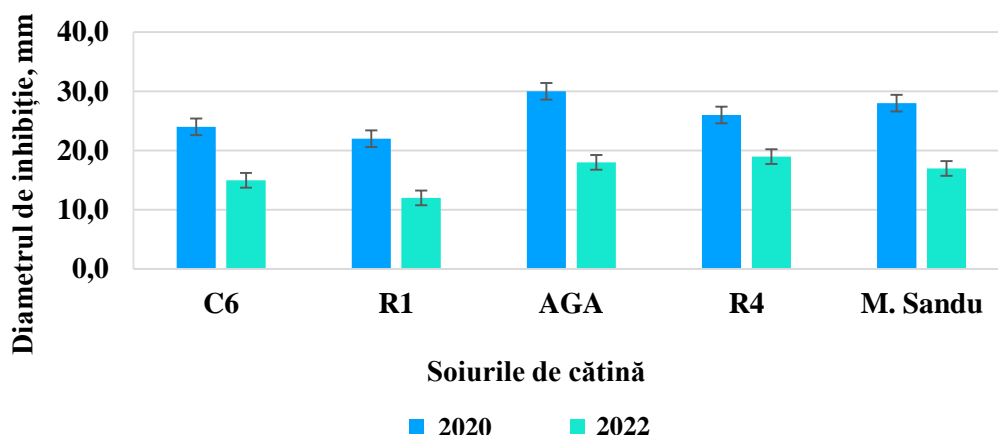


Fig. 3.5 Studiu comparativ al evoluției activității antibacteriene la păstrare (2020-2022) a pulberilor de cătină asupra microorganismelor patogene *S. aureus*.

Dacă se efectuează un studiu comparativ a pulberilor vegetale incipient și după o perioadă de doi ani se poate menționa că unele din pulberile vegetale (soiuri de cătină) și-au păstrat activitatea antibacteriană (fig. 3.5 - 3.8). În studiu au fost utilizate și pulberi din măceșe și tescovină (FN Bugac, FN masca, FN sem), la fel după o perioadă de doi ani. Însă pulberile din tescovină și măceșe nu au demonstrat activitate antibacteriană.

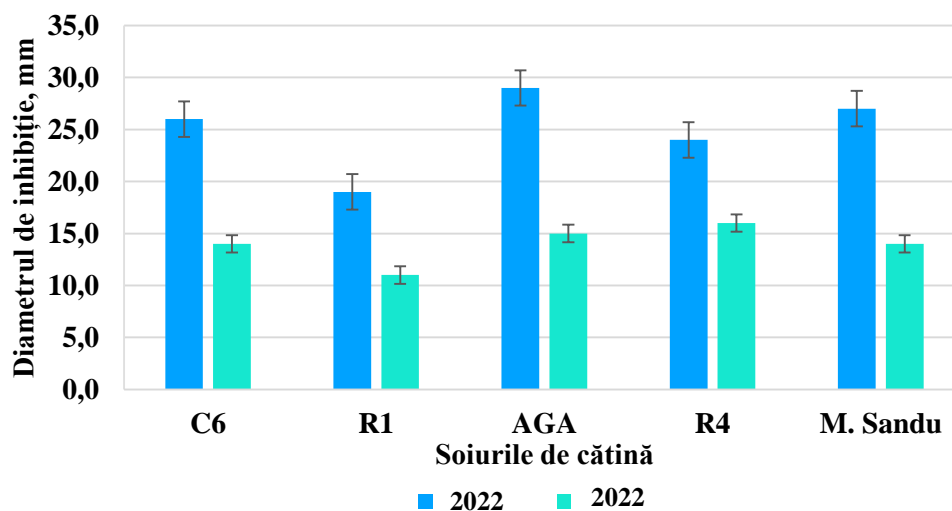


Fig. 3.6 Studiu comparativ al evoluției activității antibacteriene la păstrare (2020-2022) a pulberilor de cătină asupra microorganismelor patogene *B. subtilis*.

Se atestă o activitate antibacteriană mai diminuată după o perioadă de timp asupra bacteriilor gram pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*) cu o diferență a diametrului zonei de inhibiție de aproximativ 10 mm (fig.3.6).

Remarcăm că soiurile de cătină și-au păstrat activitatea antimicrobiană după o perioadă de doi ani cu o ușoară diminuare a efectului antibacterian asupra bacteriilor Gram pozitive.

Menționăm aceste soiuri de cătină au avut un efect nemodificat asupra bacteriilor Gram negative, cu excepția soiului de cătină R1 împotriva *Escherichia coli* CCM 3954 nu a manifestat activitate antibacteriană. Valorile testelor realizate au fost triplicate, și prezentate ca medie± eroare standard, iar analiza statistică a fost efectuată prin programul ANOVA, ($\alpha \leq 0,05$) cu GraphPad.

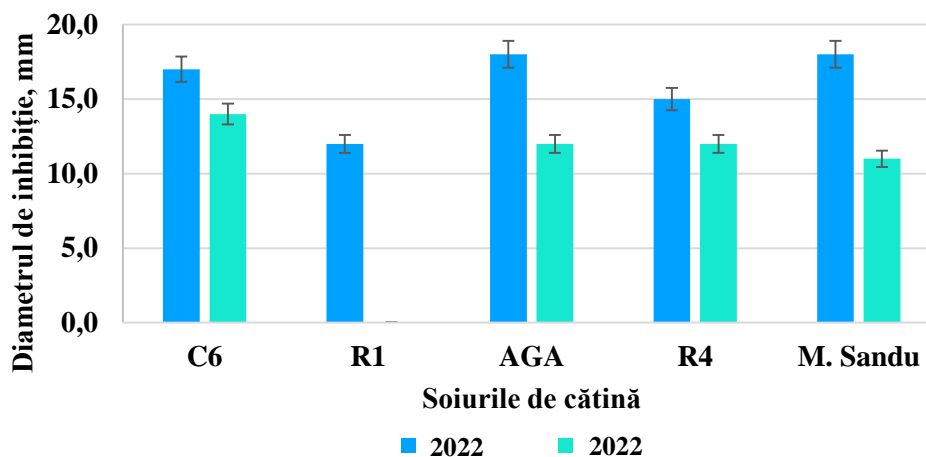


Fig. 3.7 Studiu comparativ al evoluției activității antibacteriene la păstrare (2020-2022) a pulberilor de cătină asupra microorganismelor patogene *E. coli*.

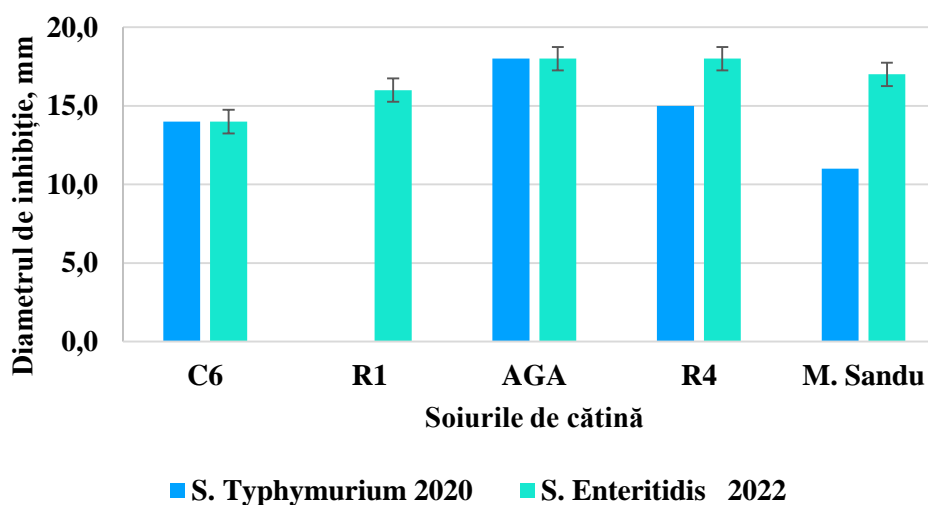


Fig. 3.8 Studiu comparativ al evoluției activității antibacteriene la păstrare (2020-2022) a pulberilor de cătină asupra microorganismelor patogene *S. Typhimurium* și *S. Enteritidis*

Se atestă o activitate antibacteriană mai diminuată după o perioadă de timp asupra bacteriilor gram pozitive (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*) cu o diferență a diametrului zonei de inhibiție de aproximativ 10 mm (fig. 3.5; fig. 3.6).

S-a remarcat că soiurile de cătină și-au păstrat activitatea antimicrobiană după o perioadă de doi ani, cu o ușoară diminuare mai pronunțată asupra efectului față de bacteriilor Gram pozitive.

S-a constatat că activitatea antibacteriană a soiurilor de cătină s-a diminuat în timp, iar soiul de cătină R1 nu a manifestat activitate antibacteriană asupra tulpinei de *Escherichia coli* CCM 3954.

3.1.3 Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale și extractelor de busuioc, cimbru și rozmarin asupra microorganismelor patogene

Prin metoda difuziei în godeuri, eficacitatea unei game de pulbere și extracte a fost determinată împotriva *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *G. stearothermophilus*, *E. coli*, *S. Abony*, *C. albicans* (tab. 3.4). Extractul de cimbru a prezentat cea mai mare zonă de inhibiție împotriva *C. albicans* (29,3 mm) și pentru *S. aureus* cu o zonă de inhibiție de 26,3 mm. Extractul de cimbru a manifestat activitate împotriva tuturor microorganismelor luate în studiu. O activitate remarcată a demonstrat-o și extractul de rozmarin cu o zonă de inhibiție de 27 mm pentru *G. stearothermophilus* urmată de extractul de busuioc cu inhibiția zonei de creștere de 26,3 mm pentru *S. aureus*. Rezultatele activității antibacteriene au arătat că toate extractele din plante au demonstrat activitate antibacteriană împotriva microorganismelor testate, cel mai activ extract s-a dovedit a fi extractul din cimbru.

Tabelul 3.4. Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale și extractelor din busuioc, rozmarin, cimbru asupra microorganismelor patogene

Tulpini de referință	Zone de inhibiție, mm (extracte)		
	Busuioc	Cimbru	Rozmarin
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	26,3±0,6	26,3±0,6	21,3±0,2
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	11,0±0,4	25,3±0,6	18,3±0,5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	8,3±0,6	13,7±0,7	18,7±0,3
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 7953	15,3±0,5	20,0±0,5	27,0±0,6
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	11,0±0,3	29,3±0,6	19,0±0,4
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8,6±0,7	10,0±0,7	15,0±0,6
<i>S. Abony</i> NCTC 6017	9,0±0,5	8,0±0,7	13,0±0,5

Notă: Valorile fiecărui test realizat în triplicate și calculat ca medie ±eroare standard (SE), analiza statistică - ANOVA, ($\alpha \leq 0,05$) cu GraphPad 5, Lipsa – lipsa efectului antimicrobian.

Extractele din busuioc au fost investigate pentru proprietățile lor antimicrobiene *in vitro* de către Ilhan Kaya și colegii (2008). Potrivit acestor cercetători, studiile anterioare au arătat că extractele de busuioc posedă proprietăți inhibitorii împotriva creșterii bacteriilor Gram-negative: *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (pentru toate cu un diametru similar de 13 mm) și bacterii gram pozitive: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (diametrul de

inhibiție a constituit 15mm). Când descoperirile lui Ilhan Kaya și colegii săi (2008) sunt comparate cu ale noastre, în studiul nostru s-au obținut rezultate similare cu privire la bacteriile comune testate. Cu excepția activității împotriva *C. albicans*, busuiocul a provocat inhibarea acestui microorganism, zona de inhibiție a constituit 11 mm.

Într-o altă lucrare, cercetătorii Gema Nieto et al. (2018) au analizat extractul de rozmarin și au determinat cea mai înaltă activitate inhibitorie împotriva *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus* și *Salmonella choleraesuis*. Susceptibilitatea la biopreparate a fost efectuată prin metoda difuzimetrică. Cercetătorii Baydaa Hameed și colaboratorii (2018) au testat rozmary oil împotriva tulpinilor multidrog rezistente: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*. Uleiul de rozmarin s-a dovedit a fi eficace împotriva tulpinelor rezistente la antibiotice.

A. baumannii s-a dovedit a fi cel mai sensibil la ulei de rozmarin cu un diametru al zonei de inhibiție de 35 mm, urmat de *P. aeruginosa* (34 mm). *S. aureus* și *E. faecalis* s-au dovedit a fi mai puțin sensibile la uleiul de testat cu un diametru al zonei de inhibiție de 30 mm și 32 mm, respectiv.

3.1.4 Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale asupra *L. monocytogenes* ATCC 19118, *L. monocytogenes* EGDe (godeuri)

Listeria monocytogenes este o bacterie facultativ anaerobă, temperatură optimă de creștere ce variază între limitele de la - 0,4 °C la 45 °C, cu un optim de 37 °C. Este capabilă să supraviețuiască la o activitate a apei relativ scăzută ($a_w < 0,90$) și pH între 4,6 și 9,5, precum și să tolereze condiții hipersaline până la 20 %. Aceste condiții de creștere au făcut ca aceste bacterii să poată supraviețui și să se înmulțească în condiții de mediu nefavorabile care sunt adesea prezente la unitățile de producție a alimentelor. *L. monocytogenes* este, prin urmare, un important agent patogen alimentar responsabil de boala numită listerioză, care poate apărea ca infecții sporadice sau focare de boală cu o rată semnificativă a mortalității de 20-30 % la nivel mondial (Osek et al., 2022). Majoritatea cazurilor de listerioză umană par să fie cauzate de consumul de alimente refrigerate gata de consum. În Uniunea Europeană (UE), 1763 de cazuri umane confirmate de listerioză au fost raportate în 2013 de către 27 de state membre. *Listeria monocytogenes* este un microorganism psicrotrofic (capabil să crească și să se înmulțească în timpul depozitării la rece) și doar câteva celule prezente în produsul final se pot înmulți până la un nivel periculos pentru consumatori. Cu toate acestea, aceste bacterii pot supraviețui în produsul final pentru un timp nedeterminat, în funcție de tipul de produs, de caracteristicile acestuia (de exemplu, pH-ul, microflora competitivă), condițiile de depozitare (temperatura) și alte circumstanțe de mediu (Sandulachi et al., 2020).

Reeșind din datele prezentate în literatură, scopul studiului a fost de-a determina activitatea antibacteriană a pulberilor și extractelor de fructe de pădure pe *L. monocytogenes*. S-a utilizat tulpina de referință *Listeria monocytogenes* ATCC 19118. S-a testat activitatea antibacteriană a pulberilor din fructe de pădure: cătina, aronia, măceșe, păducel și tescovina (tab. 3.5). Argumentele pentru determinarea sensibilității listeriilor față de aceste preparate a fost că aceste bacterii au capacitate de a se multiplica și a supraviețui în condiții extreme a mediului.

Tabelul 3.5. Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale asupra *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

Pulbere	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19118
	Diametrul zonei de inhibiție completă a creșterii (mm)
Cătina	22,5±0,3
Șrot de cătină	16,3±0,3
Aronia	Lipsă
Tescovina	12,5±0,3
Măceșe	16,3±0,3
Șrot de măceșe	17,8±0,4
Păducel	Lipsă

Conform rezultatelor obținute observăm ca cea mai înaltă activitate înregistrată față de *L. monocytogenes* ATCC 19118 a fost demonstrată de pulberile de cătină cu zona de inhibiție de 22,5 mm, urmată de măceș șrot cu zonă de inhibiție 17,8 mm. Cătina șrot și pudra de măceșe au fost la același nivel de activitate ce au indus o zonă de suprimare a creșterii de 16,3 mm.

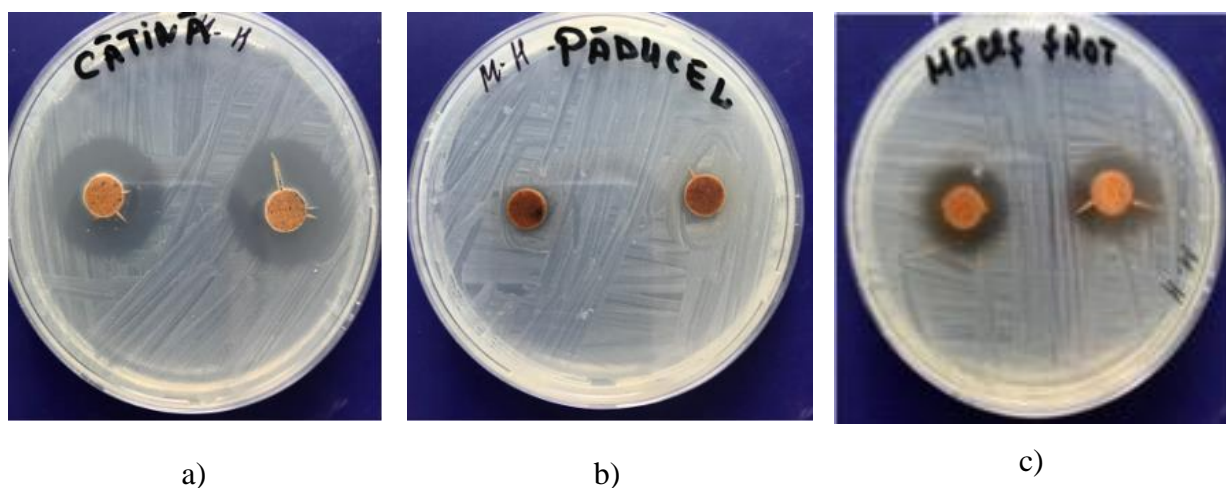


Fig. 3.9 Activitatea pulberilor vegetale asupra *L. monocytogenes* ATCC 19118:

a) cătină; b) păducel; c) măceșe.

Cel mai mic efect înregistrat împotriva *L. monocytogenes* ATCC 19118 l-a demonstrat tescovina, cu zonă de inhibiție de 12,5 mm în diametru (fig. 3.9).

Păducelul și aronia nu au activitate împotriva acestei tulpini. În concluzie putem afirma că asupra *L. monocytogenes* un efect semnificativ a demonstrat-o cătina, dar împotriva acțiunii

păducelului și aroniei este rezistentă. De asemenea, activitatea antimicrobiană a extractelor vegetale a fost determinată și pe tulpini din colecția EGDe (tab. 3.6).

Testări similare s-au efectuat asupra *L. monocytogenes* EGDe, oferită de universitatea Galați. Pentru determinarea efectului antibacterian s-au utilizat extracte hidrosolubile și liposolubile obținute din cătina, păducel, aronie, tescovină, măceșe. Ca și în cazul *L. monocytogenes* ATCC 19118, efectul antibacterian s-a studiat incipient calitativ (difuzimetric).

Tabelul 3.6. Activitatea antimicrobiană a pulberilor vegetale asupra *L. monocytogenes* EGDe

Extracte*	<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe				
	diametrul zonei de inhibiție a creșterii (mm)				
	Cătina	Măceș	Tescovină de struguri	Aronie	Păducel
C1	32,4±0,3	20,5±0,5	20,5±0,5	12,4±0,5	0
C2	30,2±0,4	21,5±0,4	20,5±0,5	9,5±0,4	0
H1	29,4±0,5	21,3±0,4	n/t	15,5±0,1	0
H2	30,2±0,3	22,2±0,3	n/t	16±0,2	0
P1	27,5±0,3	26,4±0,3	n/t	n/t	0
P2	27,4±0,3	25,5±0,5	n/t	n/t	0

Notă: C - concentrat 1,2; L - liposolubil 1,2; P. - proba 2016 1,2; n/t nu s-a testat din cauza extractelor nedisponibile, 0-efect

Drept preparate vegetale naturale cu efect antibacterian s-au utilizat aceleași mostre din cătina, măceșe, tescovină, păducel sub formă de extracte hidrosolubile și liposolubile. Conform datelor obținute putem relata, cătina este cea mai activă asupra *L. monocytogenes* EGDe. Extractul C1 din cătina a prezentat cel mai pronunțat efect față de *L. monocytogenes* EGDe (cu o zonă de inhibiție de 32 mm), urmată de C2 și H2, H1 (cu o zonă de inhibiție echivalentă de 30,29 mm pentru ambele) (fig. 3.10).

Activitatea antibacteriană manifestă față de *L. monocytogenes* EGDe au manifestat-o preparatele din cătina P1 și P2 cu un diametru de 27 mm. De remarcat este și efectul preparatelor de măceșe. Se atestă practic o zonă de inhibiție echivalentă pentru toate extractele (20-21 mm) cu o activitate mai pronunțată a P1 și P2 (diametrul 26,3 mm).

Extractele de tescovină C1 și C2 au prezentat activitate mai redusă împotriva *L. monocytogenes* EGDe, cu zona de inhibiție de 20 mm. Acțiunea extractelor din aronie constă în apariția unor zone de inhibiție semnificativ mai mici comparativ cu cele induse de cătina și măceșe, diametrul variază între 9,5 și 16 mm.

În cazul *L. monocytogenes* ATCC 19118, este de remarcat faptul că preparatele din păducel nu au fost active și la fel împotriva *L. monocytogenes* EGDe (tulpina de referință oferită de universitatea Dunărea de jos), deși, conform altor studii, extractele de *Crataegus monogyna* conduc la modificarea morfologiei bacteriilor (în special Gram pozitive); dereglarea permeabilității membranei celulare cu pierdere de K⁺, Ca²⁺, Na⁺; diminuarea potențialului

membranas; dereglarea integrității membranei celulare și reducerea activității enzimatică cu diminuarea metabolismului energetic (Puupponen-Pimiä et al., 2005).

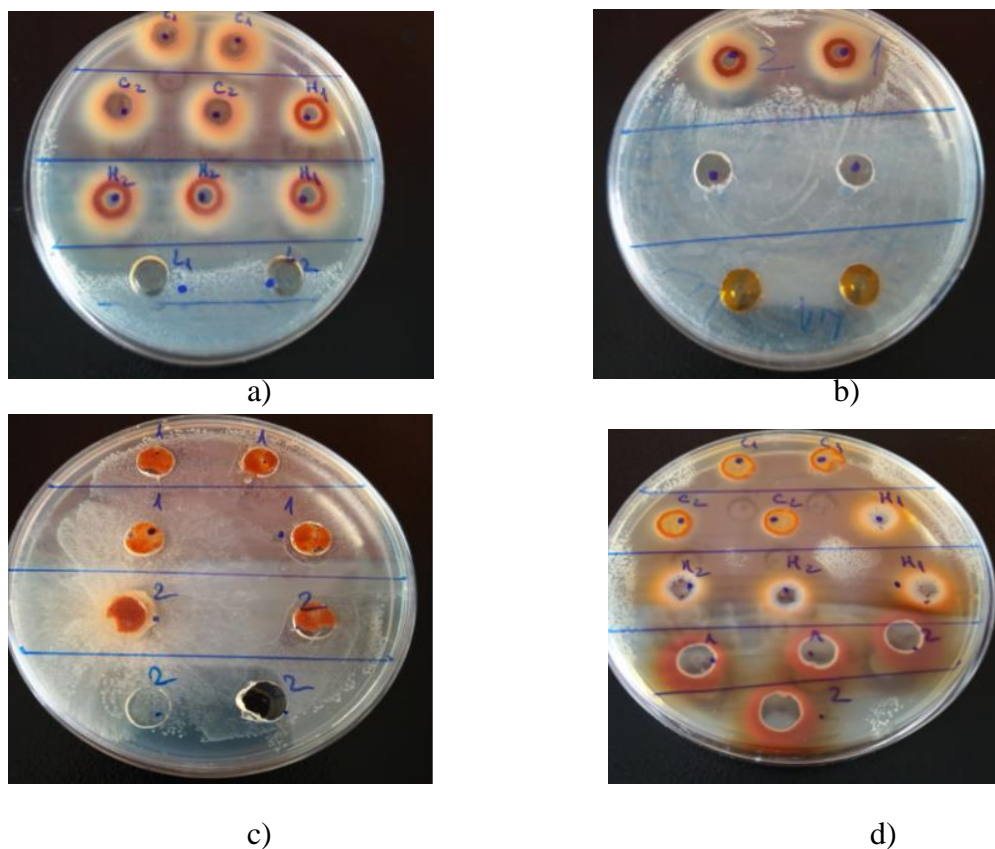


Fig. 3.10 Efectul extractelor vegetale asupra *L. monocytogenes* EGDe:

a) extract concentrat 1, b) cătină 2, c) extract de păducel, d) extract de măceșe.

Mecanismul de acțiune presupune și producerea speciilor reactive de oxigen (SRO). Efectul a fost testat asupra speciilor *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *P. aeruginosa*).

3.2 Determinarea concentrațiilor minime inhibitoare a pulberilor vegetale

Există diferite tehnici *in vitro* pentru a testa concentrațiile minime inhibitorii (CMI) și concentrațiile minime bactericide (CMB) pentru a determina sensibilitatea sau rezistența la antimicrobiene a microorganismelor. Scopul studiului a fost de-a determina dacă agentul etiologic este rezistent sau sensibil la agenții antimicrobieni naturali testați. CMI, fiind cea mai mică concentrație care inhibă creșterea vizibilă a organismului, a fost determinată în funcție de nivelul de inhibiție de 90 %. Agentul antimicrobian trebuie să inhibe 90 % din creșterea microbiană vizibilă pentru a fi considerat MIC al agentului antimicrobian împotriva organismului utilizat. Astfel, organismul testat a fost numit „susceptibil (sensibil)”.

3.2.1 Determinarea CMI și CMB ale pulberilor vegetale prin metoda diluțiilor succesive în medii lichide

Testările au fost efectuate prin metoda diluțiilor succesive în medii lichide, cu repicarea ulterioară pe mediul în plăci. Efectul antimicrobian a fost testată atât asupra bacteriilor gram-pozitive cât gram-negative. În urma testărilor efectuate s-a constatat că pulberile din cătina albă și șrot de cătina albă realizează o activitate antimicrobiană mai pronunțată față de toate microorganismele patogene cercetate (tab. 3.7).

S-a demonstrat că cea mai mică concentrație inhibitorie și bactericidă asupra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 o au pulberile vegetale din cătină albă, cu o concentrație minimă inhibitorii de $1,95 \pm 0,12$ mg/mL, urmată de șrot și de pulbere de măceș ($3,91 \pm 0,15$ mg/mL) și tescovina de struguri ($7,81 \pm 0,19$ mg/mL). În cazul *Escherichia coli* și *Klebsiella pneumoniae* concentrații minime inhibitorii și bactericide manifestă doar pulberea de cătină albă. Aronia nu manifestă activitate asupra bacteriilor Gram negative luate în studiu. Preparatele din măceșe și păducel atestă acțiune slabă asupra *E. coli* ATCC 25922, dar *K. pneumonie* ATCC 13883 este rezistentă la păducel. Este de remarcat că aceste preparate au efect manifest și asupra *B. subtilis*.

Tabelul 3.7. Concentrații minime inhibitoare (CMI*) și concentrații minime bactericide (CMB*) a pulberilor vegetale asupra microorganismelor patogene.

Pulberi	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
	CMI* mg/mL	CMB* mg/mL	CMI* mg/mL	CMB* mg/mL	CMI* mg/mL	CMB*m g/mL	CMI* mg/mL	CMB* mg/mL
Cătina	$1,95 \pm 0,12$	$3,90 \pm 0,23$	$7,81 \pm 0,37$	$15,6 \pm 0,7$	$15,6 \pm 0,5$	$31,25 \pm 1,25$	$3,90 \pm 0,15$	$7,81 \pm 0,21$
Șrot de cătina	$15,63 \pm 0,33$	$31,25 \pm 1,03$	$62,50 \pm 2,37$	$125 \pm 5,0$	$62,5 \pm 2,1$	$125 \pm 5,0$	$7,81 \pm 0,19$	$15,62 \pm 0,41$
Aronia	$15,63 \pm 0,37$	$31,25 \pm 0,62$	-	-	-	-	$31,25 \pm 0,98$	$62,5 \pm 1,8$
Tescovină de struguri	$7,81 \pm 0,19$	$15,62 \pm 0,41$	$62,50 \pm 1,57$	$125 \pm 5,0$	-	-	$7,81 \pm 0,37$	$15,6 \pm 0,7$
Măceșe	$3,91 \pm 0,15$	$7,81 \pm 0,21$	$31,25 \pm 0,98$	$62,5 \pm 1,8$	$62,5 \pm 2,1$	$125 \pm 5,0$	$7,81 \pm 0,37$	$15,6 \pm 0,7$
Păducel	$41,67 \pm 0,56$	$83,33 \pm 1,23$	$62,50 \pm 1,87$	$125 \pm 5,0$	-	-	$41,67 \pm 0,56$	$83,33 \pm 1,23$
Șrot de măceșe	$3,91 \pm 0,23$	$7,81 \pm 0,29$	$31,25 \pm 0,71$	$62,5 \pm 2,5$	$62,5 \pm 2,1$	$125 \pm 5,0$	$7,81 \pm 0,19$	$15,62 \pm 0,41$

Notă: *Valorile testelor realizate în triplicate, medie eroare standard, analiza statistică – ANOVA, ($\alpha \leq 0,05$), GraphPad 5.

S-au determinat concentrațiile minime inhibitoare și concentrațiile minime bactericide a pulberilor vegetale analizate asupra *B. subtilis* prezentate în tabelul 3.7. S-a demonstrat că cea mai mică concentrație inhibitorie și bactericidă asupra *B. subtilis* o au pulberea din cătina albă

($3,9 \pm 0,15$ mg/mL) urmată de șrot de cătină albă, tescovina de struguri, măceș și șrot de măceș. În comparație cu *S. aureus* susceptibilitatea față de aceste preparate este mai redusă.

Rezultatele obținute atestă faptul, că deși toate pulberile examinate sunt extrem de bogate în compuși biologic activi, efectele lor directe asupra microorganismelor patogene depind de o serie de factori. În primul rând, este extrem de importantă capacitatea de aderență bacteriană a compușilor biologic activi, care depinde de caracterul lor hidrofil.

În cazul microorganismelor examinate, capabile să colonizeze rapid produsele din carne și care au, evident un grad sporit de hidrofobicitate, efectul inhibitor și bactericid maxim a fost atestat pentru pulberile din cătină albă și măceșe, în care conținutul de compuși biologic activi lipofilici (lycopen, b-caroten, zeaxantină, clorofile) este considerabil mai înalt decât pulberile de aronia și tescovina de struguri, în care predomină flavonoidele. Dar și în cazul păducelului conținutul de compuși biologic activi lipofilici este important, însă efectul inhibitor și microbicid a fost mai redus decât pentru pulberile din cătină albă și măceșe (fig. 3.11).



Cățina,
S. aureus

Șrot de măceșe,
K. pneumoniae

Măceșe,
K. pneumoniae

Fig. 3.11 Determinarea CMI și CMB a preparatelor vegetale asupra bacteriilor patogene.

Aceste rezultate atestă faptul, că un rol extrem de important îl are prezența acizilor organici și aciditatea activă, care influențează direct aderența bacteriană și, finalmente, procesul de inhibiție a proliferării microorganismelor patogene.

Tanwar et al. 2022, au constatat că, pulbere de cățina a prezentat efecte antimicrobiene împotriva bacteriilor Gram-pozitive precum *B. cereus* și *S. aureus*, unde *S. aureus* a prezentat o inhibare completă a creșterii bacteriene la 250 $\mu\text{g/mL}$, *B. cereus* la 125 $\mu\text{g/mL}$, *E. coli* la 4 $\mu\text{g/mL}$ și *P. aeruginosa* la 300 $\mu\text{g/mL}$. Pulbere din fructe de *Hippophae rhamnoides* inhibă *E. coli* la concentrație foarte mică și a fost găsit mai sensibilă. Într-o altă lucrare, cercetătorii au analizat extractul de măceșe și au determinat cea mai mare activitate inhibitorie împotriva a 5 tulpini de bacterii Gram pozitive (*B. cereus* ATCC 11778, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228) și 5 tulpini de bacterii Gram-negative (*E. coli* ATCC 25922,

K. pneumoniae ATCC13883, *P. mirabilis* ATCC 35659, *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S. Enteritidis* 13076 ATCC (Cendrowski et al., 2020).

3.2.2 Determinarea concentrațiilor minime inhibitoare ale pulberilor vegetale (în timp) prin metoda microdiluțiilor

Datele obținute prin difuzie în godeuri a pulberilor brute și extractelor au sugerat că acestea au avut o activitate antibacteriană potențială împotriva bacteriilor Gram pozitive și Gram negative. Cu toate acestea, preparatele vegetale au arătat activitate antibacteriană împotriva bacteriilor testate în diferite grade, cu diametrul zonelor de inhibiție divers. Din acest motiv, aceste extracte au fost testate în continuare practic pe aceleași specii bacteriene pentru a determina concentrațiile minime inhibiție și concentrațiile minime bactericide. O evaluare precisă este determinarea concentrației minime inhibitorii produsului natural sau a antibioticului împotriva organismelor în cauză. În acest scop se utilizează macro și microdiluții în medii lichide. După obținerea extractelor din pulberile vegetale (măceșe, tescovină și cătină) după o perioadă de timp de păstrare s-a determinat activitatea lor antimicrobiană prin metoda microdiluțiilor, tabelul 3.8. Obținerea extractelor s-a efectuat conform metodologiei menționate în capitolul 2.

Tabelul 3.8. Determinarea CMI* și CMB* ale extractelor vegetale prin metoda microdiluțiilor asupra microorganismelor patogene

Tulpini de referință	CMI/CMB	Extr C6 (5)	Extr R1 (6)	Extr AGA (7)	Extr R4 (8)	Ms.S (9)
<i>E. coli</i> CCM 3954	CMI50	65,21	15,46	15,46	15,46	15,46
	CMB90	67,18	18,12	18,12	18,12	18,12
<i>B. cereus</i> CCM2010	CMI50	5,82	15,46	8,26	8,26	8,26
	CMB90	7,23	18,12	10,42	10,42	10,42
<i>L. monocytogenes</i> CCM 4699	CMI50	34,83	15,46	8,26	15,46	5,82
	CMB90	37,23	18,12	10,42	18,12	7,23
<i>B. subtilis</i> CCM 1991	CMI50	34,83	34,83	15,46	8,26	8,26
	CMB90	37,23	37,23	18,12	10,42	10,42
<i>P. aeruginosa</i> CCM3955	CMI50	34,83	65,21	15,46	15,46	8,26
	CMB90	37,23	67,18	18,12	18,12	10,42
<i>S. Enteritidis</i> CCM4420	CMI50	15,46	8,26	8,26	8,26	8,26
	CMB90	18,12	10,42	10,42	10,42	10,42
<i>S. sonnei</i> CCM 4421	CMI50	34,83	15,46	129,26	15,46	8,26
	CMB90	37,23	18,12	131,46	18,12	10,42
<i>C. perfringens</i> CCM 4991	CMI50	15,46	15,46	34,83	15,46	15,46
	CMB90	18,12	18,12	37,23	18,12	18,12
<i>S. aureus</i> CCM2461	CMI50	34,83	34,83	15,46	5,82	8,26
	CMB90	37,23	37,23	18,12	7,23	10,42

Notă: CMI - concentrația minimă inhibiție, CMB - concentrația minimă bactericidă; $p \leq 0,05$.

Rezultatele obținute (tab. 3.8) au indicat niveluri diferite a CMI în funcție de tulpina bacteriană testată. Astfel activitatea extractelor ale celor cinci tipuri de preparate naturale (obținute din cătină), CMI a variat de la 67,18 $\mu\text{g/mL}$ la 5,82 $\mu\text{g/mL}$. Extractul C6 a prezentat cele mai slabe CMI dintre toate extractele testate. Extractul C6 a dat valori CMI de 65,2; 34,83; 15,46 $\mu\text{g/mL}$ la *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*. Excepție este *B. cereus*, ce a realizat cea mai mică valoare CMI de 5,82 $\mu\text{g/mL}$ pentru acest extract. Toate bacteriile testate au prezentat niveluri diferite de CMI la R1 și C6. Cea mai scăzută CMI observată în extractul R1 a fost de 8,26 $\mu\text{g/mL}$ pentru *S. Enteritidis*, în timp ce extractul AGA din aceeași plantă a avut cel mai mic CMI pentru *B. cereus*, *L. monocytogenes* și *S. Enteritidis* de 8,26 $\mu\text{g/mL}$. Extractele R4 și Ms. Sandu au demonstrat o activitate pronunțată față de tulpinile luate în studiu. Valoarea minimă CMI pentru R4 a fost 5,82 $\mu\text{g/mL}$ la *S. aureus*, iar M. Sandu a fost CMI de 5,82 $\mu\text{g/mL}$ împotriva *L. monocytogenes*.

Cea mai mică valoare a CMB (7,23 $\mu\text{g/mL}$) a fost înregistrată la R4 împotriva *Staphylococcus aureus* și C6 cu aceeași valoare de 7,23 $\mu\text{g/mL}$ pentru *Bacillus cereus*. În timp ce, CMB pentru Ms. Sandu a constituit 7,23 $\mu\text{g/mL}$ pentru *Listeria monocytogenes*. Menționăm ca aceste preparate peste un interval de timp au demonstrat activitate antibacteriană, ceea ce a fost demonstrat prin metodele calitative și cantitative (tab. 3.8).

3.2.3 Determinarea CMI și CMB a extractelor din busuioc, cimbru, rozmarin

Analiza concentrației minime inhibitoare a demonstrat că toate extractele de plante testate au prezentat activitate antibacteriană împotriva tulpinelor de testat *B. cereus*, *E. faecalis*, *C. albicans*, *G. stearothermophilus* cu valori CMI variind de la 0,7 mg/mL până la 45 mg/mL.

Extractele testate au prezentat niveluri diferite de activitate antimicrobiană în funcție de speciile testate, așa cum se indică în tabelul 3.9.

Tabelul 3.9. CMI și CMB ale extractelor din busuioc, cimbru, rozmarin

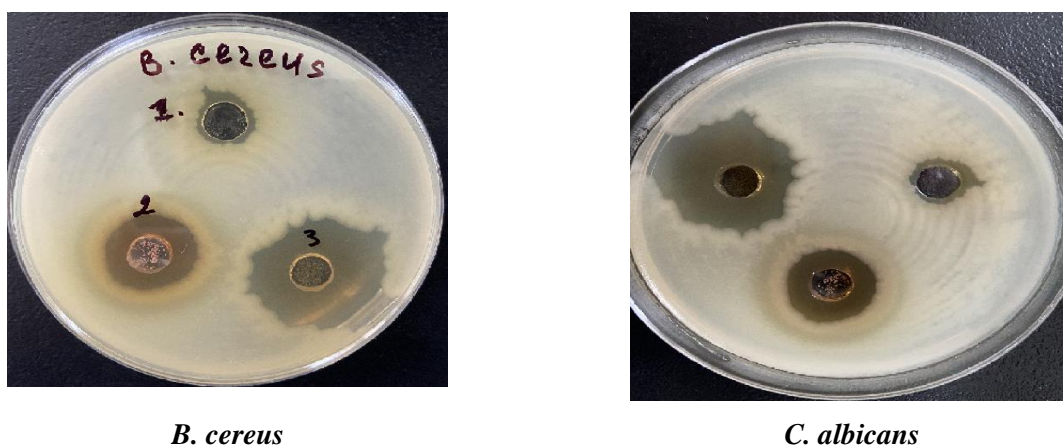
Tulpini de referință	Concentrația plantei din extract, mg/mL					
	Busuioc		Cimbru		Rozmarin	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>B. cereus</i>	22,5	22,5	2,8	5,6	0,7	0,7
<i>E. faecalis</i>	45,0	90,0	5,6	5,6	2,8	11,2
<i>C. albicans</i>	22,5	22,5	5,6	11,2	2,8	5,6
<i>G. stearothermophilus</i>	11,2	22,5	1,4	2,8	0,7	1,4

Notă: CMI – concentrația minimă inhibitoare; CMB – concentrația minimă bactericidă; $p \leq 0,05$.

Cel mai activ dintre extractele menționate în tabelul 3.9 a fost extractul de rozmarin. Acesta la concentrația de 0,7 mg/mL are acțiune bacteriostatică și bactericidă asupra *B. cereus* și *G. stearothermophilus* (CMB 1,4 mg/mL) și extractul de cimbru a demonstrat valori CMI între 1,4 și 5,6 mg/mL (fig. 3.12). Efect antibacterian vădit acest extract îl posedă asupra

G. stearothermophilus. Cele mai joase valori CMI a prezentat extractul de busuioc cu valori cuprinse între 11,2 și 45 mg/mL. Extractele de cimbru, busuioc și rozmarin au un efect pronunțat asupra *G. stearothermophilus*. Dintre toate preparatele naturale testate în acest studiu, doar extractele de cimbru, rozmarin și busuioc au manifestat activitate asupra *C. abicans* (tab. 3.9).

Extractul derivat din rozmarin (fig. 3.12) a demonstrat proprietăți inhibitoare față de proliferarea *B. cereus*, *E. faecalis*, *G. stearothermophilus* și *C. albicans*. Această investigație a demonstrat că extractul din cimbru și busuioc prezintă proprietăți inhibitoare mai reduse împotriva creșterii microorganismelor sus numite. Concluziile studiului indică faptul că extractul de rozmarin, busuioc cimbru posedă o eficacitate antimicrobiană largă, împiedicând proliferarea atât a speciilor bacteriene Gram pozitive, cât și a celor Gram negative, precum și a fungilor.



**Fig. 3.12 Activitatea antibacteriană a extractelor asupra *B. cereus* și *C. albicans*:
1) busuioc, 2) rozmarin, 3) cimbru.**

Conform Walid Yeddes et al. (2022), activitatea antibacteriană a extractului etanolic de rozmarin prin măsurarea diametrelor de inhibare a creșterii bacteriene a arătat că acest extract a prezentat activitate antibacteriană semnificativă împotriva *C. jejuni* ($\varnothing = 18,50$ mm), *S. enterica* ($\varnothing = 19,50$ mm), *B. subtilis* ($\varnothing = 14,33$ mm), *S. aureus* ($\varnothing = 16,00$ mm), *P. aeruginosa* ($\varnothing = 17,33$ mm), *E. faecalis* ($\varnothing = 16,50$ mm) și *E. coli* ($\varnothing = 15,33$ mm). Studiile evidențiază potențialul extractelor ca agenți antimicrobieni naturali cu aplicații diverse în conservarea alimentelor, îngrijirea sănătății și alte industrii conexe.

3.2.4 Determinarea concentrațiilor minime de inhibiție a pulberilor vegetale asupra *L. monocytogenes* ATCC 19118

Scopul acestui studiu a fost de a evalua efectele antimicrobiene ale pulberii și extractelor de fructe de pădure (măceșe, aronia, cătină, tescovina de struguri și păducel) asupra dezvoltării *L. monocytogenes*, rezistente la antibiotice. După ce s-a determinat activitatea antibacteriană a

preparatelor calitativ prin metoda difuzimetrică în godeuri, s-au determinat și valorile CMI și CMB prin metoda diluțiilor succesive în bulion asupra *L. monocytogenes* (tab. 3.10). Acest microorganism este considerat unul dintre cei mai importanți agenți patogeni responsabili de infecțiile alimentare. *L. monocytogenes* este un agent patogen bacterian oportunist care are capacitatea de a supraviețui în condiții extreme de mediu întâlnite în natură și în lanțul alimentar, cum ar fi concentrații mari de sare, interval mare de pH, uscure și temperaturi scăzute (Sandulache et al., 2020).

Tabelul 3.10. Determinarea CMI și CMB a pulberilor vegetale asupra *Listeria monocytogenes* ATCC 19118

Pulbere	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19118	
	CMI*, mg/mL	CMB*, mg/mL
Cătină	31,25	62,5
Șrot de cătină	62,5	125
Tescovina de struguri	125	250
Măceșe	62,5	125
Șrot de măceșe	62,5	125

*Nota: CMI- cantitatea minimă de inhibiție, CMB - cantitatea minimă bactericidă; $p \leq 0,05$.

Rezultatul testului de determinare a concentrației minime de inhibiție a indicat diferite valori a CMI în funcție de preparatul testat (pulbere vegetală). Cel mai puternic efect dintre preparate o are cătina. Acest preparat la concentrația de 62,5 mg/mL are acțiune bactericidă asupra *L. monocytogenes* ATCC19118. Rezultatele obținute corelează pozitiv cu datele bibliografice. Astfel, cătina (*Hippophae rhamnoides* L.) asigură destabilizarea și permeabilizarea membranei citoplasmatică, inhibarea enzimatică de către produșii oxidați (Negi et al., 2004). Are loc inhibarea sintezei acizilor nucleici a bacteriilor Gram-negative și Gram-pozitive. Se produce bacteriostază prin deteriorarea a membranelor celulare (Cristi et al., 2020).

Tescovina de struguri manifestă efect moderat asupra *L. monocytogenes* ATCC 19118, cu valorile CMI și CMB respective de 125 mg/mL și 250 mg/mL. Conform datelor bibliografice, tescovina de struguri poate acționa asupra microorganismelor patogene prin destabilizarea permeabilității membranei citoplasmatică (Hassan et al., 2019). Se produce inhibarea enzimei de către produșii oxidați, ceea ce duce la inhibarea sintezei acizilor nucleici de către bacteriile Gram-negative și Gram-pozitive. Flavonoidele din struguri formează complexe cu proteinele, fie prin legături covalente, fie prin legături de hidrogen, afectând adeziunea microbiană și proteinele de transport ale anvelopei celulare. Taninurile din struguri au capacitatea de a priva bacteriile de nutrienți și metalele necesare, cum ar fi fierul (Ghendov-Moșanu et al., 2022).

Pulberile vegetale de măceșe și șrot de măceșe au realizat un efect bacteriostatic și bactericid asupra *L. monocytogenes* la o concentrație de 62,5 mg/mL 125 mg/mL. Efectul bactericid al fructelor de măceșe (*Rosa canina* L.) este asigurat de încorporarea grupărilor OH în membrana și

peretele celular al bacteriei, ceea ce duce la schimbarea fluidității și permeabilității acestora (Rovná et al., 2015). Efectul a fost atestat pentru un grup mare de patogeni (*B. cereus*, *S. aureus*, *L. innocua*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *K. pneumoniae*, *P. Aeruginosa*). Conform altor grupuri de autori, acțiunea extractelor de *Rosa canina* produce inhibarea sintezei de ADN și ARN, a polizaharidelor, enzimelor și proteinelor. Dezechilibrarea sistemului enzimatic, diminuarea stabilității biochimice a membranei, ce contribuie la moartea celulei microbiene (Cendrowski et al., 2020).

3.2.5 Determinarea concentrațiilor minime de inhibiție a pulberilor vegetale asupra *L. monocytogenes* EGDe

Preparatele utilizate pentru a determina efectul antibacterian asupra *L. monocytogenes* ATCC19118 au fost testate și asupra tulpinei de *L. monocytogenes* EGDe. Au fost utilizate extracte și pulberile de cătină, măceșe, aronia și tescovina de struguri. S-a determinat CMI spectrofotometric la $\lambda = 600$ nm. Valoare $> 0,1$ se consideră creștere microbiană (tab. 3.11).

Tabelul 3.11 CMI a extractelor de fructe de pădure și tescovină asupra *L. monocytogenes* EGDe

Preparat	DO, 600 nm				Concentrația minimă inhibitorie, mg/mL			
	Cătină	Măceșe	Tescovină	Aronia	Cătină	Măceșe	Tescovină	Aronia
C1	0,071	0,059	0,051	0,052	2,6	4,2	15,6	7,8
C2	0,047	0,053	0,062	0,047	5,2	16,7	15,6	7,8
H1	0,061	0,020	nd	0,055	2,6	4,2	nd	1,95
H2	0,072	0,024	nd	0,077	2,6	4,2	nd	3,9
L1	0,091	0,058	nd	nd	2,6	4,2	nd	nd
L2	0,059	0,071	nd	nd	2,6	4,2	nd	nd

Notă: C - concentrat 1,2, H – hidrosolubil 1,2, L-liposolubil 1,2, nd – nu s-a determinat; DO – densitate optică; $p \leq 0,05$.

Rezultatele studiului (tab. 3.11) au arătat că extractele hidroalcoolice de cătină și măceșe au prezentat rezultate benefice asupra efectului inhibitor și bactericid al *L. monocytogenes* EGDe. Cățina a demonstrat proprietăți antimicrobiene pentru *L. monocytogenes* mai pronunțate decât măceșe. CMI a extractelor hidroalcoolice pentru fiecare dintre C1, H1, H2, proba 1, 2, împotriva *L. monocytogenes* au fost 2,6 mg/mL și respectiv pentru C2 – 5,2 mg/mL (fig. 3.13).

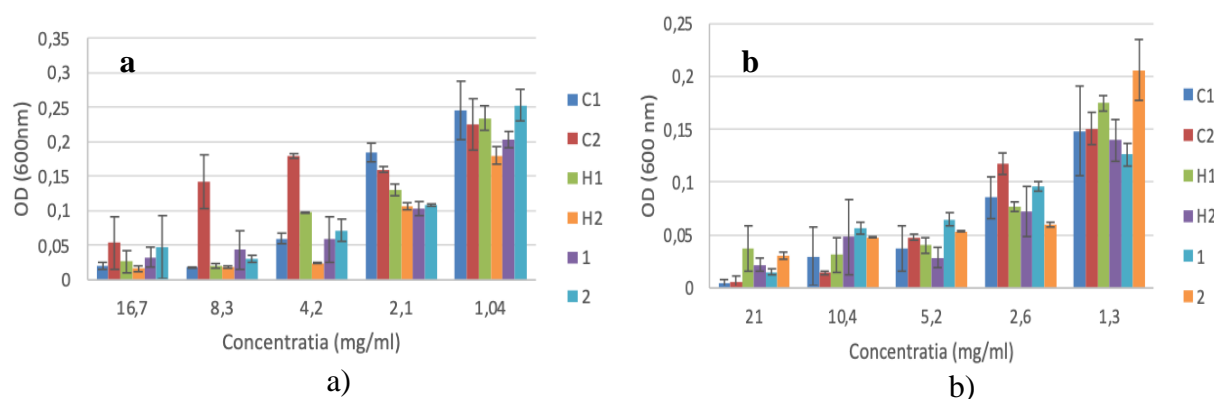


Fig. 3.13 Concentrația minimă inhibitorie a extractelor vegetale pentru *L. monocytogenes* EGDe a) măceșe, b) cătină.

Extracțele hidroalcoolice de măceșe au manifestat un efect mai diminuat asupra *L. monocytogenes* cu valori echitabile ale CMI de 4,2 mg/mL pentru C1, H1, H2, L1 și L2. Comparativ cu tescovina de struguri, aronia a fost mai activă CMI constitui e 1,9; 3,9 și 7,8 mg/mL pentru H1, H2, C1,2 (fig. 3.13). Probabil că aceste proprietăți se datorează compoziției chimice a cătinii și a măceșelor (Sandulache et al., 2020).

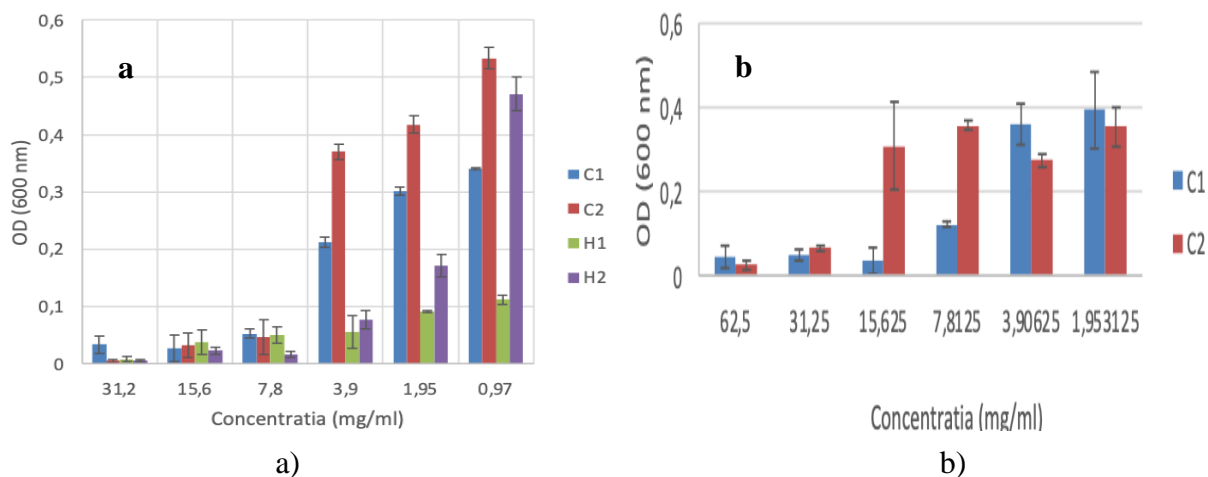


Fig. 3.14 Concentrația minimă inhibitorie a extractelor vegetale pentru *L. monocytogenes* EGDe a) aronia, b) tescovină de struguri.

În studiile anterioare s-a constatat că măceșe și cătina au efecte antimicrobiene asupra microorganismelor patogene (Efenberger et al., 2021; Sandulachi et al., 2020; Shah et al., 2020). Conform datelor obținute (fig. 3.14), s-a observat că, cătina are cel mai pronunțat efect asupra *L. monocytogenes*, în special extractul concentrat 1 și 2 urmat de măceșele și tescovina de struguri din soiuri roșii.

Extracțele de aronia au indicat o activitate slabă asupra *listeriei*, desi, conform datelor bibliografice, aroniei a demonstrat activitate antibacteriană și antioxidantă, inhibând generarea de SRO în celulele bacteriene și inducerea modificărilor morfologice a celulei bacteriene (Zhao et al., 2014; Kim et al., 2018; Efenberger-Szmechtyka, et al., 2021). Totuși, în aceste studii efectele bacteriostatice au fost obținute asupra altor tipuri de microorganism patogene (*E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *B. thermosphacta*, *P. fragi*).

Efectul antimicrobian amplificat se datorează prezenței grupărilor hidroxil în polifenoli, compușilor fenolici și alcoolici. Sensibilitatea bacteriilor la substanțe fitochimice fluctuează odată cu diferențele în structura învelișului celular bacterian și diferă între bacterii. Învelișul celular are rol de protecția osmotică a celulei bacteriene. Bacteriile Gram-negative au o membrana externă lipopolizaharidică care împiedică penetrarea polifenolilor la straturile de peptidoglicani. (Suriyaprom et al., 2022; Peabody, et al., 2016). Extracțele de fructe de pădure au fost responsabile

pentru o activitate antibacteriană puternică prin dezintegrarea membranei exterioare și creșterea permeabilității membranei citoplasmice (Nohynek et al., 2006; Peabody et al., 2016).

3.3 Activitatea antimicrobiană și antioxidantă a extractelor – mecanisme de interacțiune

Polifenolii și carotenoidele servesc drept conservanți în procesarea alimentelor. Mai multe studii au arătat că substanțele antioxidante pot acționa în diferite moduri, inclusiv ca captatori de radicali liberi sau chelatori, prevenind oxidarea lipidelor și, prin urmare, prevenind pierderile de nutrienți și inhibând formarea potențială de compuși toxici (Finley et al., 2011; Poljsak et al., 2021). Alterarea alimentelor și toxiinfecțiile alimentare cauzate de creșterea bacteriilor patogene sunt probleme majore în industria alimentară. Există un interes din ce în ce mai mare pentru utilizarea conservanților naturali activi. Astfel, prezintă un interes deosebit cercetarea mecanismelor de acțiune antimicrobiană și antioxidantă a compușilor bioactivi din plante.

3.3.1 Compoziția extractelor din tescovină de struguri și fructe de pădure

Efectele antioxidanților naturali depind de absorbția hidrogenului fenolic în reacțiile radicalice, de stabilitatea radicalului antioxidant natural format în timpul reacțiilor radicalice și de substituenții prezenți în structură. Un antioxidant este o moleculă care scade sau previne oxidarea altor substanțe chimice. Oxidarea face parte dintr-o reacție redox și constă în transferul de electroni de la o substanță la un agent oxidant. Această reacție poate produce radicali liberi, care provoacă reacții distructive în lanț. Antioxidanții sunt capabili să oprească aceste reacții în lanț prin oxidarea cu radicalii liberi și blocând astfel acțiunea lor. Aceste proprietăți sunt caracteristice mai multor familii de compuși chimici: tioli, fenoli, carotenoizi etc.

În tabelul 3.12 este prezentată compoziția polifenolilor individuali, identificați în extracte hidroetanolicе din fructe de pădure și tescovina de struguri (metoda HPLC) (Sandulachi et al., 2020; Ghendov-Moșanu et al., 2022).

Extractele hidroetanolicе din fructe de cătină conțin cantități semnificative de acid salicilic (24,48 mg/100 mL), hiperozidă (38,53 mg/100 mL), ester metilic al acidului ferulic (25,43 mg/100 mL), polidatină (5,4 mg/100mL), acid ferulic (2,19 mg/100 mL), acid clorogenic (1,43 mg/100mL), *cis*-resveratrol (4,17 mg/100mL) și *trans*- resveratrol (1,2 mg/100 mL). Extractele din măceșe au cantități importante de substanțe, precum derivații acidului hidroxibenzoic (salicilic, galic, protocatehic), acidului hidroxicinamic (ferulic), flavone (catehină, epicatehină), flavonoide (procianidină B2 și procianidină B1) și esterul metilic al acidului ferulic. Principalii compuși fenolici detectați în extractul de aronia au fost catechina (15,41 mg/100 mL), epicatechina (4,7

mg/100 mL), acizii ferulic (5,51 mg/100mL), salicilic (2,65 mg/100 mL), protocatehic (1,88 mg/100 mL), polidatina (1,27 mg/100 mL), esterul metilic al acidului ferulic (1,48 mg/100 mL), dar și acizii galic, para- și metabenzoic, procianidină B1 și B2.

Tabelul 3.12. Polifenoli individuali identificați în extracte hidroetanolicе din fructe de pădure și tescovina de struguri

Polifenoli	Cătină, mg/100mL	Măceșe, mg/100mL	Aronia, mg/100mL	Tescovină de struguri, mg/100mL
Acid galic	0,16±0,01	0,85±0,01	0,39±0,01	1,95±0,01
Acid <i>m</i> -hidroxibenzoic	0,020±0,002	0,020±0,001	0,13±0,01	0,010±0,002
Acid protocatehic	0,98±0,01	0,43±0,01	1,88±0,01	0,32±0,01
Acid <i>p</i> -hidroxibenzoic	0,21±0,01	0,19±0,01	0,21±0,01	0,34±0,01
Acid gentisic	0,15±0,01	0,27±0,01	-	-
Acid vanilic	0,17±0,01	0,13±0,01	0,09±0,01	-
Acid salicilic	24,48±0,05	1,07±0,01	2,65±0,02	-
Acid siringic	-	-	0,05±0,01	0,19±0,01
Acid <i>p</i> -cumaric	0,010±0,002	0,010±0,001	0,06±0,01	-
Acid ferulic	2,19±0,01	0,32±0,01	5,51±0,03	0,82±0,01
Acid cafeic	0,006±0,001	-	0,09±0,01	-
Acid sinapic	0,13±0,01	-	0,08±0,01	0,008±0,001
Catehină	-	2,05±0,01	15,41±0,15	1,34±0,01
Epicatehină	0,37±0,01	0,49±0,01	4,7±0,02	-
Quercetină	0,030±0,005	0,020±0,001	-	0,19±0,01
Hiperozidă	38,53±0,02	0,41±0,01	0,97±0,01	0,37±0,01
Procianidină B1	0,19±0,01	0,70±0,01	0,27±0,01	1,33±0,01
Procianidină B2	0,10±0,01	1,75±0,01	0,12±0,01	15,34±0,15
Acid clorogenic	1,43±0,02	-	-	-
Polidatină	5,40±0,01	0,06±0,01	1,27±0,01	-
<i>Trans</i> -resveratrol	1,20±0,01	-	0,005±0,001	-
<i>Cis</i> -resveratrol	4,17±0,01	0,010±0,001	0,011±0,001	-
Esterul metilic al acidului ferulic	25,43±0,02	1,44±0,01	1,48±0,02	0,74±0,01

Notă: *rezultatele sunt prezentate ca medie±abatere standard

Astfel, s-a constatat, că extractele utilizate prezintă surse bogate în substanțe bioactive. Extractele de tescovină de struguri conțin cantități semnificative de procianidină B2, acid galic, catehină, procianidina B1, acidul ferulic și esterul său metilic. Numeroase studii bibliografice demonstrează efectul antimicrobian al acestora (Palombo et al., 2011; Daglia, 2012; Borges et al., 2012; Abreu et al., 2013). Un rol deosebit este atribuit compușilor bioactivi naturali în combaterea rezistenței la antibiotice (LeBel, 1988).

3.3.2 Compoziția și activitatea antioxidantă a extractelor de busuioc

Conținutul total de polifenoli determinat din extractul de busuioc (*Ocimum basilicum L.*) a fost de 26,18 ± 0,21 mg GAE/g s.u. Comparând rezultatul obținut cu cel din literatură, s-a constatat că acestea sunt comparabile. Astfel, Nguyen et al., 2021 a determinat în frunzele de busuioc un conținut total de polifenoli de 29,60 mg GAE/g. În funcție de soiuri și de partea de plantă din care

a fost obținut extractul, acesta a variat între 2,30 – 7,11 mg GAE/g masă proaspătă (Prinsi et al., 2019). Conținutul total de polifenoli din busuioc colectat din diferite regiuni ale lumii a variat între 20, 86 – 25,593 mg GAE/100 g s.u. (Aburigal et al., 2017).

Compușii polifenolici individuali din extractele de busuioc au fost identificați utilizând cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu mass-spectrometrul ESI echipată și matrice de fotodiode (HPLC-DAD-ESI-MS) (tab. 3.13). Activitatea antioxidantă a extractului a fost evaluată folosind două metode spectrofotometrice diferite: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) și ABTS (2,2'-Azino-bis (3-etilbenziazolin-6-acid sulfonic).

După cum se arată în tabelul 3.13, un total de nouă compuși fenolici au fost detectați în extractul de busuioc. Compușii au fost atribuiți acizilor fenolici (metil-rosmarinat, acid rosmarinic, rosmadial, carnosol, acid dehidrodiferulic și acid cicoric) și clasei de flavonoide (luteo-lin-glucozidă, quercetin-rutinozidă și epigalocatechină).

Tabelul 3.13 Conținutul de polifenoli totali și individuali și activitatea antioxidantă a extractului de busuioc utilizat pentru experimente.

Indicatori	Valoare
Conținutul total de polifenoli (Folin–Ciocâlțeu), mg GAE/g s.u.	26,18 ± 0,21
Epigalocatechină, mg/g s.u.	0,72 ± 0,09
Acid cicoric, mg/g s.u.	1,00 ± 0,13
Quercetină-rutinozidă, mg/g s.u.	0,75 ± 0,02
Luteolin-glucozid, mg/g s.u.	0,85 ± 0,05
Acid dehidrodiferulic, mg/g s.u.	3,10 ± 0,26
Acid rosmarinic, mg/g s.u.	13,81 ± 0,57
Rosmarinat de metil, mg/g s.u.	17,08 ± 0,39
Carnosol, mg/g s.u.	4,78 ± 0,06
Rosmadial, mg/g s.u.	6,45 ± 0,01
Neidentificate	8,46 ± 0,17
Activitate antioxidantă (DPPH), mM TE/g s.u.	644 ± 21
Activitate antioxidantă (ABTS), mM TE/g s.u.	8,95 ± 0,03

Notă: DPPH—2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS—2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Valorile din tabel reprezintă mediile a trei încercări replicate ± abaterea standard.

Metil-rosmarinatul și acidul rosmarinic s-au dovedit a fi cele mai abundente (17,08 mg/g s.u. și respectiv 13,81 mg/g s.u.). Rezultatele obținute în acest studiu sunt în acord cu alte studii (Khatib et al., 2021; Romano et al., 2022) unde acidul rosmarinic este raportat ca fiind cel mai reprezentat acid fenolic în busuioc. Conținutul acidului cicoric și acidului dehidro-diferulic reprezintă 1,3 mg/g s.u. și, respectiv, 3,1 mg/g s.u.

În ceea ce privește flavonoidele, au fost detectate luteolin-glucozid (0,85 mg/g s.u.), quercetin-rutinozid (0,75 mg/g s.u.) și epigalocatechină (0,72 mg/g s.u.). Conținutul de quercetină și catechine în extractele de frunze de busuioc dulce raportat în studiile realizate de Ghasemzadeh

și colab. a fost de 2,73 și, respectiv, 2,61 mg/100 g s.u.; luteolina nu a fost identificată (Ghasemzadeh et al., 2016).

Conținutul de polifenoli totali și individuali ai extractului de busuioc este corelat cu activitatea sa antioxidantă. Capacitatea antioxidantă a fost determinată folosind metodele DPPH și ABTS. Valorile experimentale au constituit 644,75 mM TE/g s.u. și, respectiv, 8,95 mM TE/g s.u.. Alți autori au detectat 19,91 mM TE/g în extract de busuioc prin metoda DPPH (Vlaicu et al., 2021); 492,22 mM TE/g extract în 96 % extract de busuioc în etanol folosind metoda DPPH și extract de 541,16 mM TE/g folosind metoda ABTS (Chulova, 2016).

3.3.3 Activitatea antioxidantă a extractelor de fructe de pădure și tescovină de struguri

Activitatea antioxidantă a extractelor de fructe de pădure și tescovină a fost determinată după o perioadă de păstrare de 2 ani. Capacitatea de captare a radicalilor liberi a extractelor a fost evaluată utilizând testul DPPH care oferă un mod ușor și rapid de estimare a activității antioxidante. Reducerea DPPH-ului în prezența unui antioxidant sau a unui amestec de antioxidanți duce la formarea formei neradicale DPPH-H de culoare galbenă sau gălbuie. Culoarea amestecurilor finale poate fi violet deschis sau galben, în funcție de concentrația de antioxidanți. Cea mai importantă etapă a dezvoltării procedurii analitice a activității antioxidante totale măsurate prin testul DPPH este selectarea volumului unui extract sau a diluției sale adecvate pentru determinarea activității antioxidante totale fiabile a extractului (Hudz et al., 2017). Astfel, au fost efectuate testări ce vizau analiza comparativă a activității antioxidante a extractelor de cătină și tescovină de struguri în funcție de concentrația lor. Rezultatele testelor efectuate pentru extractul din soiul B1 (Bulgac) sunt prezentate în figura 3.15.

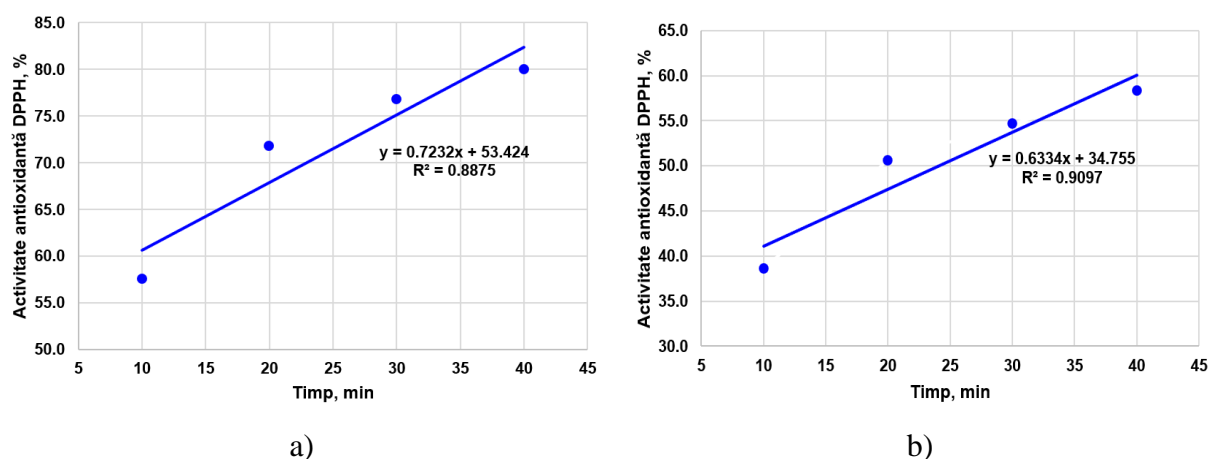


Fig. 3.15 Activitatea antioxidantă a extractului de tescovină de struguri (soiul B-1): a) extract pur (1 g extract uscat + 25 mL 96 % etanol); b) raport 1:2 (1 parte extract + 2 părți etanol).

S-a constatat, că extractul pur (fig. 3.15a) a asigurat o activitate oxidantă de 80 % DPPH inhibat. În cazul extractului diluat cu etanol în proporție de 1:2, activitatea antioxidantă a constituit 60 % (fig. 3.15b). Astfel, reducerea concentrației extractului la 50 % poate fi asociată scăderii potențialului antioxidant cu 25 %. Astfel, diluția finală selectată a fost 1:2 ($y = 0,6334x + 34,755$, $R^2 = 0,9097$). În cazul extractului de cătină, soiul RH-4 s-au efectuat diluțiile 1:2 și 1:4 (fig. 3.16).

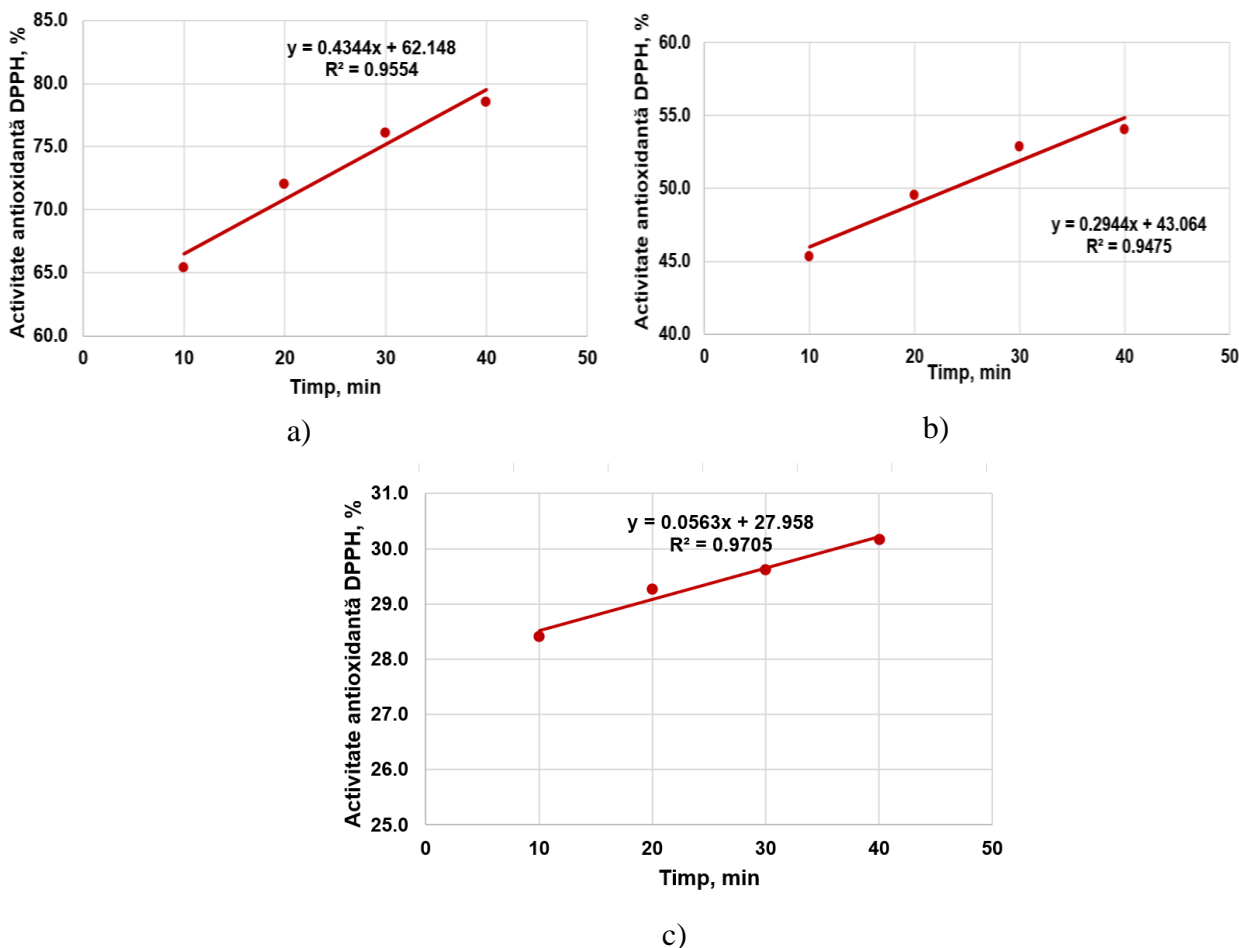


Fig. 3.16 Activitatea antioxidantă a extractului de cătină (soiul RH-4):

- a) extract pur (1 g extract + 25 mL 96% etanol); b) raport 1:2 (1 parte extract + 2 părți etanol);
c) raport 1:4 (1 parte extract + 4 părți etanol).

În cazul extractului nediluat (RH-4) se atestă o activitate antioxidantă de maxim 80 % ($y = 0.4344x + 62,148$, $R^2 = 0.9554$, fig. 3.16a). Diluția 1:2 asigură atestă o activitate antioxidantă de 55 % ($y = 0,29443x + 43,064$, $R^2 = 0,9475$; fig. 3.16b). Diluția 1:4 asigură inhibarea a doar 30 % radicali liberi DPPH ($y = 0,6633x + 41,005$, $R^2 = 0,8447$; fig. 3.16c). Testele efectuate au permis stabilirea diluției optime – 1:2.

Cercetările efectuate au demonstrat, cu cât rata consumului de DPPH este mai mare, cu atât potențialul antioxidant este mai puternic. Prin urmare, este necesară diluarea probei, adică selectarea condițiilor optime, ceea ce a fost realizat în prezentul studiu.

Una dintre funcțiile importante atribuite antioxidanților polifenolici este participarea acestora la reacțiile de apărare împotriva microorganismelor patogene, bacteriilor sau ciupercilor. Un interes deosebit de mare în utilizarea microbiologică a polifenolilor se referă la utilizarea acestora în industria alimentară ca bactericide pentru agenții patogeni alimentari, dar și ca agenți de susținere a antibioticelor disponibile în medicină. Rezultatele arată că extractele de plante polifenolice au adesea proprietăți antibacteriene atractive împotriva speciilor individuale de diferite tulpini bacteriene, cum ar fi streptococi, bacili, stafilococi și chiar multe altele (Nieto et al., 2018; Bouarab-Chibane et al., 2019; Mucha et al., 2021).

Însă există vreo relație între activitatea antioxidantă și cea antimicrobiană? Mulți CBA, în special polifenolii prezintă atât proprietăți antioxidante, cât și antimicrobiene. Activitatea antioxidantă se referă la reducerea sau eliminarea radicalilor liberi și a oxigenului în curs de dezvoltare dintr-un mediu. Pe de altă parte, multe bacterii ar putea depinde și de acest oxigen în curs de dezvoltare pentru supraviețuirea în orice mediu dat. Astfel, prin implicare, reducerea sau îndepărtarea radicalilor liberi sau a oxidanților ar putea avea legătură cu activitatea antimicrobiană. Acest lucru ar putea explica în parte de ce proprietățile antioxidante s-ar putea corela pozitiv cu activitatea antimicrobiană.

3.3.4 Mecanisme de inhibare a activității antioxidante și antimicrobiene

Fructele de pădure se disting de alte alimente grație compușilor lor unici cu efecte bioprotectoare și proprietăți antimicrobiene și prebiotice. Substanțele fitochimice din fructe de pădure au interacțiuni și efecte sinergice împotriva bacteriilor patogene, cu toate acestea mecanismul exact de acțiune rămâne necunoscut. Investigațiile prezente referitoare la inactivarea microbiană de compușii plantelor nu redau un mecanism concret de acțiune, dar indică dependența acestor mecanisme de condițiile de mediu și microorganismele specifice implicate în testări. Acțiunile directe sunt considerate reacții fitochimice cu membrana celulară care provoacă inactivarea enzimelor celulare esențiale. Acțiunile indirecte sunt considerate a fi efecte fitochimice asupra disponibilității nutrienților sau a expresiei genomice care au ca rezultat afectarea metabolismului și funcției microorganismului țintă (Lacomb et al., 2017).

Efectul antimicrobian amplificat se datorează prezenței grupărilor hidroxil în polifenoli, compușilor fenolici și alcoolici. Sensibilitatea bacteriilor la substanțe fitochimice fluctuează odată cu diferențele în structura învelișului celular bacterian și diferă între bacterii. Învelișul celular are rol de protecție osmotică a celulei bacteriene. Bacteriile Gram-negative au o membrană externă lipopolizaharidică care împiedică penetrarea polifenolilor la straturile de peptidoglicani. (Suriyaprom et al., 2022; Peabody et al., 2016). Nohynek și colegii au raportat că extracte fenolice

din fructe de pădure și zmeură în cantitatea de 1 mg/mL, descompun membrana externă a tuturor tulpinilor de *Salmonella* luate în studiu. Extractele fenolice de fructe de pădure, zmeură și căpșuni bogate în elagitanini au fost responsabile pentru o activitate antibacteriană puternică prin dezintegrarea membranei exterioare, eliberarea de LPS și creșterea permeabilității membranei citoplasmatică (Nohynek et al., 2006; Peabody et al., 2016). Efecte bactericide au demonstrat și moleculele hidrofobe din uleiurile esențiale de citrice. Aceste molecule se pot segrega în membrana bacteriană, ducând la distrugerea membranei, expansiunea membranei, fluiditatea și permeabilitatea membranei crescute, pierderea materialului citoplasmatic, inhibarea respirației și alterarea transportului ionic. Uleiurile esențiale funcționează ca dezinfectanți, ce denaturează proteinele și perturbă membrana exterioară, ducând la scurgeri de K^+ , inhibarea respirației și liză celulară a microorganismelor patogene (Suriyaprom et al., 2022).

Un element esențial pentru fiziologia celulei bacteriene este pH-ul celular. Unele activități intracelulare ca replicarea ADN-ului, reacțiile enzimatică, sistemele de transport de nutrienți, sinteza și rotația flagelilor și sinteza proteinelor, pot fi modificate și alterate când o formă nedisociată de acid organic difuzează prin membrana celulară și scade pH-ul intracelular, după disociere a ionilor de hidrogen acid. pH-ul fructelor de pădure este în intervalul 3-4, grație prezenței acizilor organici, care pot traversa membranele celulare bacteriene mai activ decât acizii tari, din cauza valorilor pKa variabile (pH de echilibru între formele nedisociate și disociate). Acizii nedisociați pot difuza liber prin membranele hidrofobe.

Extractele naturale derivate din grapefruit, mandarină, bergamotă și portocală sunt toate bogate în acid citric. Extractele pot inhiba creșterea *S. enterica*, *E. coli* la concentrații incredibil de scăzute și pot duce la scurgeri de material intracelular după 90 de minute de tratament, reflectând pierderea integrității membranei. Ținta celulară esențială este membrana, deoarece extractul de citrice poate modifica grupele carboxilice ale acizilor grași membranari (Lu et al., 2011; Salmond et al., 1984). Cercetătorii au investigat efectele antimicrobiene ale diferitelor flavonoide asupra creșterii celulelor *E. coli* O157:H7 și au descoperit că quercetina și hesperetina afectează morfologia *E. coli* O157:H7 perturbând integritatea membranei, ce a condus la pierderea vădită a materialului celular dens în electroni. Quercetina crește permeabilitatea membranei citoplasmatică a *S. pyogenes*, rezultând un efect bacteriostatic asupra bacteriilor Gram-pozitive la CMI de 128 $\mu\text{g/mL}$ (Qing-Yang Ji et al., 2023).

S-a demonstrat, că diverși polifenoli manifestă efecte inhibitoare asupra activității *B. subtilis*. Alte abordări denotă că diferite taninuri și compuși polifenolici sunt inhibitori ai enzimelor NADH-ubichinona-1 oxidoreductaze în *Paracoccus denitrificans*, *B. subtilis*, *Photobacterium phosphoreum* și *Thermus thermophilus*. Substanțele fitochimice din fructe pot

inhiba activitatea toxinelor bacteriene (Suriyaprom et al., 2022). Studiile au demonstrat aspectele anti-adezive ale fructelor de pădure împotriva *E. coli* uropatogenă. Se consideră că gradul de polimerizare a proantocianidinelor este principala caracteristică care contribuie la proprietățile lor anti-adezente. Cu toate acestea, mulți compuși, inclusiv acizi organici, alți compuși polifenolici și glicozide de flavonol, au fost specificați drept compuși anti-adezivi. Taninurile hidrolizabile și condensate din boabele de *Vaccinium* conțin structuri similare cu cele implicate în aderarea microorganismelor (bacteriilor) de suprafața celulelor vezicii urinare și a rinichilor (Lacomb et al., 2017).

Conform datelor din literatură, există trei mecanisme principale de acțiune a polifenolilor: a) inhibarea funcției membranei citoplasmatică; b) inhibarea sintezei acidului nucleic; c) inhibarea metabolismului energetic. Polifenolii modifică morfologia celulelor bacteriene, deteriorează peretele celular, declanșează scurgerea materialului intracelular. Polifenolii generează apariția de ROS (specii reactive de oxigen) și, în consecință, pot induce stres oxidativ în celulele bacteriene. Ei afectează biosinteza proteinelor, ceea ce duce la modificări ale proceselor metabolice. A fost demonstrat că polifenolii inhibă sinteza ATP și suprimă sinteza ADN-ului prin inhibarea activității ADN girazei (Efenberger-Szmechtyka et al., 2021).

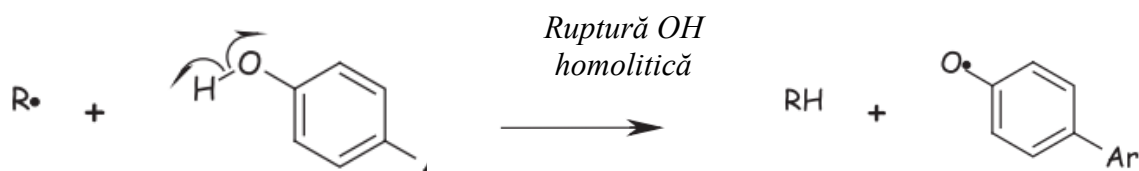
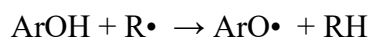
Cunoștințele despre compuși bioactivi din fructe de pădure, în special compușii fenolici, au crescut foarte mult în ultimii ani. Studiile demonstrează că compușii din fructe de pădure inhibă dezvoltarea bacteriilor patogene umane (de exemplu *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Helicobacter* spp. și *E. coli* O157:H7). Întrebuințarea activității antimicrobiene a compușilor fenolici ai fructelor de pădure ca agenți antimicrobieni naturali oferă posibilități noi pentru industria alimentară și medicină. Utilizarea conservanților naturali pentru alimentele ce ușor sunt contaminate de bacterii, cum ar fi *Salmonella* spp. și *Staphylococcus* spp., sunt foarte căutați. Dezvoltarea unui regim alternativ folosind compuși de fructe de pădure pentru prevenirea și controlul infecțiilor cauzate de bacterii rezistente la antibiotice va fi o problemă foarte importantă în viitor (Puupponen-Pimiä et al., 2005). Au fost studiate și determinate diverse mecanisme de acțiune a extractelor din plante vegetale (tab. 3.14).

Efectele moleculare responsabile pentru proprietățile antioxidante ale polifenolilor sunt recunoscute prin trei mecanisme principale, care decurg din reacția directă cu radicalii liberi și din chelatare de metale libere, acestea din urmă implicate în reacții, generând în final radicali liberi (fig. 3.17) (Costa et al., 2021).

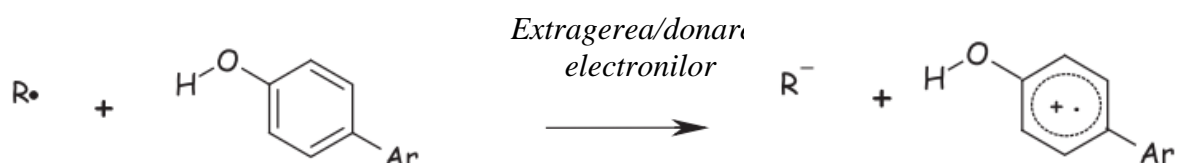
Tabelul 3.14. Mecanisme de acțiune a extractelor din fructe de pădure ca și agenți antimicrobieni

Extracte vegetale	Bacterii țintă	Mecanisme și efect asupra celulei bacteriene	Referințe
<i>Aronia melanocarpa</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. thermosphacta</i> , <i>P. fragi</i>	Reducerea viabilității bacteriilor, au demonstrat activitate antioxidantă, inhibând generarea de SRO în celulele bacteriene. Deteriorarea peretelui celulelor bacteriene cu eliberarea componentelor intracelulare, cum ar fi acizii nucleici (ADN, ARN) și proteine, Inducerea modificărilor morfologice a celulei bacteriene.	(Zhao et al., 2014; Kim et al., 2018; Efenberger-Szmechtyka, et al., 2021)
<i>Hippophae rhamnoides L.</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Y. enterocolitica</i>	Destabilizarea și permeabilizarea membranei citoplasmatică, inhibarea enzimatică de către produșii oxidați. Inhibarea sintezei acizilor nucleici a bacteriilor Gram-negative și Gram-pozitive. Bacteriostază prin deteriorarea peretelui celular și a membranelor celulare.	(Negi et al., 2004; Cristi et al., 2020)
<i>Rosa canina</i>	<i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. innocua</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Grupările OH se încorporează în membrana și peretele celular al bacteriei, ceea ce duce la schimbarea fluidității și permeabilității acestora. Inhibarea sintezei de ADN și ARN, polizaharidelor, enzimelor și proteinelor. Dezechilibrarea sistemului enzimatic, diminuarea stabilității biochimice a membranei, ce contribuie la moartea celulei microbiene.	(Rovná et al., 2015; Cendrowski et al., 2020)
<i>Crataegus monogyna</i>	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogene</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Modificarea morfologiei bacteriilor (în special Gram pozitive). Dereglarea permeabilității membranei celulare cu pierdere de K ⁺ , Ca ²⁺ , Na ⁺ . Diminuarea potențialului membranal. Dereglarea integrității membranei celulare. Reducerea activității enzimatice cu diminuarea metabolismului energetic. Producerea speciilor reactive de oxigen (SRO).	(Puupponen-Pimiä et al., 2005; Zhang et al., 2020)
Tescovină de struguri	<i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i> <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. Typhimurium</i>	Destabilizarea permeabilității membranei citoplasmatică. Inhibarea enzimei de către produșii oxidați, ce duce la inhibarea sintezei acizilor nucleici de către bacteriile Gram-negative și Gram-pozitive. Flavonoidele din struguri formează complexe cu proteinele, fie prin legături covalente, fie prin legături de hidrogen, afectând adeziunea microbiană și proteinele de transport ale anvelopei celulare. Taninele din struguri au capacitatea de a priva bacteriile de nutrienți și metalele necesare, cum ar fi fierul.	(Hassan et al., 2019; Ghendov-Moșanu et al., 2022)

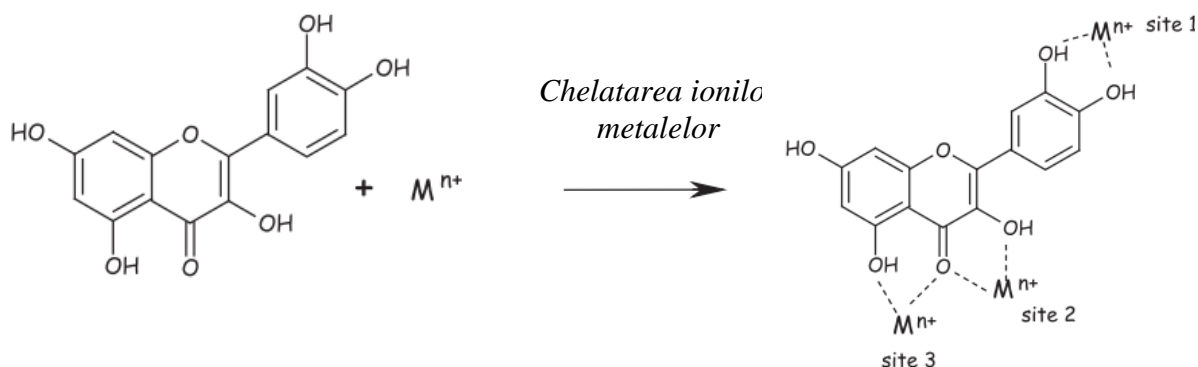
Ca antioxidanți primari, polifenolii inactivează radicalii liberi conform transferului de atom de hidrogen (HAT) (1) și prin mecanisme de transfer de electroni (SET) (2) (Santos-Sánchez et al., 2019). În mecanismul 1, antioxidantul, ArOH, reacționează cu radicalul liber R transferându-i un atom de hidrogen prin rupură omolotică a legăturii O–H:



a) Transferul de atom de hidrogen (HAT) (1)



b) Transfer de electroni (SET) (2)



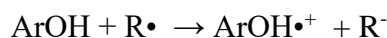
c) Chelatarea metalelor de tranziție

Fig. 3.17 Mecanisme responsabile pentru proprietățile antioxidante ale polifenolilor.

Produșii reacției sunt speciile inofensive RH și radicalul ArO• oxidat (fig. 3.17a). Chiar dacă reacția duce la formarea unui alt radical, acesta este mai puțin reactiv față de R, fiind stabilizat de mai mulți factori. Entalpia de disociere a legăturilor (EDL) al legăturii fenolice O–H este un

parametru important în evaluarea acțiunii antioxidante. Cu cât valoarea EDL este mai mică, cu atât mai ușor decurge disociația legăturii fenolice O–H și reacția cu radicalul liber.

Mecanismul SET (2) prevede donarea unui electron radicalului R•:



Anionul R⁻ este o specie stabilă energetic cu un număr par de electroni, în timp ce radicalul cationic ArOH•⁺ prezintă specii radicalice mai puțin reactive, în special deoarece polifenolii sunt structuri aromatice în care electronul impar, provenit din reacțiile cu radicalii liberi, are posibilitatea de a fi distribuit în întreaga moleculă, rezultând o stabilizare radicalică (fig. 3.17b) (Olvera-Aguirre et al., 2023). În mecanismul SET, potențialul de ionizare este cel mai semnificativ parametru pentru evaluarea activității de captare. Cu cât este mai mic potențialul de ionizare, cu atât este mai ușoară extragerea/donarea electronilor și reacția cu radicalii liberi.

Un alt mecanism antioxidant constă în chelatarea metalelor de tranziție, capabili de a genera radicali liberi. Ionii metalelor de tranziție pot fi chelatați de polifenoli, conducând la compuși compleși stabili (fig. 3.17c) (Flora, 2009). Unele metale în starea lor redusă de oxidare (în principal, ionul Fe²⁺) pot fi implicate în reacțiile Fenton, din care rezultă specii reactive de oxigen (ROS) foarte periculoase (Olufunmilayo et al., 2023).



HO• este în general acceptat ca fiind unul dintre cei mai reactivi radicali. Are un timp de înjumătățire foarte scurt (aproximativ 10⁻⁹ s) și o reactivitate foarte mare. Hidroperoxizii sunt metabolizați de superoxid dismutază, dar radicalii hidroxil nu pot fi eliminați prin reacții enzimatice.

Metalele de tranziție precum cuprul, manganul, cobaltul sunt capabile să catalizeze această reacție, în anumite condiții când ionii acestor metale nu sunt legați de proteine sau chelatori. Reacții similare pot provoca o acumulare specifică de radicali liberi, care inițiază procesele de deteriorare a biomoleculelor. Agenții de chelare a metalelor diminuează potențialele lor redox făcându-le inactive. Mai mult, chelatorii naturali ai metalelor, cum ar fi flavonoidele, manifestă efecte benefice asupra organismului, în timp ce chelatorii sintetici pot prezenta unele probleme de toxicitate. În cadrul mecanismului de transfer de electron, cei mai eficienți sunt compușii care prezintă conformație plană și delocalizare electronică extinsă, astfel încât valorile potențialelor de ionizare să fie mai mici decât a fenolul de referință, așa cum apare în tocoferol, reseveratrol, quercetină.

Majoritatea polifenolilor par să elimine radicalii liberi prin mecanismul de transfer al atomului de hidrogen, deoarece în procesul de transfer al unui singur electron sunt implicate

energii înalte. Flavonolii prezintă efect antiradicalic mai puternici decât flavonele corespunzătoare datorită prezenței grupării 3-hidroxil. Compușii polifenolici cei mai acizi sunt cei caracterizați printr-un grad ridicat de delocalizare a electronilor p, pentru care deprotonarea cedează speciilor anionice stabilizate prin fenomene de rezonanță, stabilitatea lor fiind sporită de prezența unui model de formare a legăturilor de hidrogen.

Polifenolii sunt capabili să chelateze metalele de tranziție prin intermediul grupărilor OH multiple și fragmentului carbonil. Flavonolul quercetină, spre exemplu, poate forma complecși stabili cu cationii Fe^{2+} și Cu^{2+} atât în formă neutră, cât și în formă ionizată. Printre posibilele locuri de chelatare, pozițiile 3-OH/4-ceto și 5-OH/4-ceto sunt cele care prezintă o capacitate mai mare de complexare, în timp ce catecolul pare a fi un agent de chelatare slab.

Mecanismele activității antibacteriene a antioxidanților polifenolici nu sunt încă pe deplin explorate și sunt propuse mai multe căi posibile ale mecanismelor moleculare (Finley et al. 2011). Diversitatea chimică a antioxidanților, precum și studiile efectuate nu pe substanțe unice, extrase, ci pe extracte ce conțin mai multe clase de compuși, fac dificilă identificarea clară a mecanismelor moleculare responsabile de inhibarea înmulțirii microorganismelor și a morții acestora.

Studii recente indică relația dintre structura chimică și activitatea antibacteriană a antioxidanților. Se crede că factorul cheie în modularea proprietăților microbiene este numărul și poziția grupărilor hidroxil și metoxil în structura antioxidantă. Un studiu cantitativ al relației structură-activitate a arătat că activitatea microbiană a polifenolilor este legată de caracterul hidrofob și amfifil al moleculei și al grupării OH din poziția 3 a inelului C (Wu et al., 2013; Bouarab-Chibane et al., 2019). S-a sugerat că bacteriile Gram negative sunt în general mai rezistente la efectele antioxidanților. Acest lucru se poate datora prezenței unei membrane exterioare lipofile formate din fosfolipide în aceste bacterii, ceea ce face peretele lor celular impermeabil. Mai mult, este indicat că bacteriile Gram-negative pot descompune chimic polifenolii de către enzimele lor (Konaté et al., 2012).

Unul dintre mecanismele propuse de acțiune antimicrobiană a antioxidanților este interacțiunea cu proteinele bacteriene prezente pe peretele lor celular. Efectul interacțiunii este deteriorarea membranelor bacteriene și permeabilizarea acestora, pierderea controlului chimiosmotic, scurgerea componentelor intracelulare, scurgerea componentelor citoplasmatică și eventuala moarte celulară (Bhattacharya et al., 2018; Cao et al., 2019). Mai mult decât atât, studii recente subliniază proprietățile inhibitoare ale polifenolilor în legătură cu producerea de biofilm de către bacterii, care sunt realizate prin suprimarea c-vorumului sensing și mișcarea bacteriilor (Antolak et al., 2017; Pellegrini et al., 2019).

În mod interesant, compușii polifenolici utilizați în mod obișnuit drept antioxidanți excelenți par să inducă stres oxidativ endogen în celulele bacteriene și să conducă la formarea ROS. Potrivit lui Xiong et. al, care a testat proprietățile microbiologice ale epigallocatechin galat împotriva *Escherichia coli*, s-a demonstrat că ROS generat în celulele bacteriene sunt responsabile de deteriorarea oxidativă a acizilor grași din membranele bacteriene și în cele din urmă duc la moartea agenților patogeni (Xiong et al., 2019). Rezultate similare care confirmă proprietățile pro-oxidative ale polifenolilor în raport cu celulele bacteriene au fost obținute în alte studii (Tang et al., 2016; Zhang et al., 2021).

Se constată, că activitatea de protecție microbiologică a polifenolilor rezultă și din capacitatea acestor compuși de-a influența biosinteza proteinelor care sunt cheie pentru procesele metabolice și pentru buna funcționare a bacteriilor. Modificările de expresie în funcție de antioxidanții proteinelor bacteriene respective implicate, de exemplu, în metabolismul energetic și în ciclul acidului tricarboxilic, metabolismul ADN și biosinteza acizilor grași au dus la modificări ireversibile ale metabolismului lor și moartea finală (Yi et al., 2010; Ulrey et al., 2014). Fără îndoială, o proprietate importantă în contextul activității antibacteriene a compușilor polifenolici este capacitatea acestora de a inhiba enzima ADN- giraza, care la rândul său duce la inhibarea sintezei ADN-ului bacterian (Wu et al., 2013). O altă enzimă esențială pentru metabolismul energetic al bacteriilor este ATP sintaza, care, așa cum a demonstrat Chinnam și colab (Chinnam et al., 2010) și Dadi și colab (Dadi et al., 2009), suferă o inhibare dependentă de polifenol, ducând la moartea microorganismelor.

3.4 Concluzii la capitolul 3

1. S-a demonstrat, că mulți compuși naturali găsiți în plante, ierburi și condimente (cătină, aronia, păducel, măceșe, tescovina de struguri), posedă acțiune antimicrobiană și servesc drept sursă de agenți antimicrobieni împotriva germenilor patogeni. Extractele din plante reprezintă o soluție alternativă, naturală, cu acțiune antibacteriană asupra compușilor chimici de sinteză. Rezultatele au arătat că compușii fenolici testați au efecte antimicrobiene diferite împotriva bacteriilor responsabile de alterarea alimentelor. Au fost observate diferite grade de sensibilitate antimicrobiană a bacteriilor Gram-negative (*E. coli* și *Salmonella* etc.) Gram-pozitive (*S. aureus*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, etc.) la preparatele naturale.

2. Difuzimetric s-a determinat activitatea pulberilor vegetale la contactul direct asupra tulpinilor de referință luate în studiu, menționăm că toate pulberile au manifestat activitate antibacteriană. Un efect accentuat au demonstrat pulberile din cătină albă asupra bacteriilor testate, preponderent au manifestat activitate asupra tulpinilor Gram pozitive *S. aureus* ATCC 25923 și

B. cereus ATCC 6633. Preparatele din măceșe au efect mai moderat față de microorganismele Gram pozitive testate, iar aronia și păducelul au o valoare de activitate antibacteriană mai redusă față de aceste microorganismele. Prin aceeași metodă s-a demonstrat efectul antibacterian asupra bacteriilor Gram negative. Pulberile de cătină au fost mai active asupra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, iar aronia și păducelul au demonstrat activitate mai redusă.

3. S-a efectuat screeningul calitativ a soiurilor noi de cătină (R1, R2, R4, R5, C6, AGG, AGA, Pomona, Mr. Sandu, Seirola) asupra bacteriilor Gram negative, Gram pozitive și levurilor. Efect antibacterian au demonstrat toate soiurile de cătină. Activitate remarcabilă au manifestat soiurile AGA și AGG asupra microorganismelor luate în studiu cu excepția *C. albicans*. Sensibilitate pronunțată împotriva acestor preparate au avut bacteriile Gram pozitive. Concluzionăm că aceste preparate au acțiune antibacteriană diferită și depinde de specia de microorganism. Bacteriile Gram pozitive sunt mai susceptibile față de toate tipurile de cătină. Constatăm că cătina AGA și AGG sunt foarte active, inclusiv și pe tulpinile Gram negative, excepție pentru *S. Typhimurium*. *C. albicans* ATCC 10231 a fost rezistentă la toate tipurile de cătină.

4. A fost determinat efectul antibacterian a tescovinei, măceșelor și soiurilor noi de cătină (C6, R1, R4, AGA, Mr. Sandu) după o perioadă de doi ani. Gradul de inhibiție a acestor preparate asupra bacteriilor Gram negative și Gram pozitive practic nu a fost modificat în timp (după 2 ani). Soiurile de cătină și-au păstrat activitatea antimicrobiană după o perioadă de doi ani cu o ușoară diminuare a efectului antibacterian asupra bacteriilor Gram pozitive. Activitatea în timp a diverselor soiuri de cătină nu a fost modificată esențial, iar asupra bacteriilor Gram negative s-a determinat o activitate mai înaltă. Pulberile de măceșe și tescovina (tescovina de struguri roșii) nu au fost active asupra tulpinilor testate.

5. S-a constatat, că pulberile de cătină, măceș și tescovină sunt semnificativ eficiente împotriva inhibării creșterii *Listeria monocytogenes* ATCC 19118. Pulberile de aronie și păducel nu au manifestat activitate împotriva acestei tulpini. Extractele hidrosolubile și liposolubile obținute din pulberile vegetale (cătină, măceș, tescovină) au demonstrat activitate antibacteriană asupra tulpinei de *L. monocytogenes* EGDe. Efect considerabil asupra *L. monocytogenes* EGDe le-au avut extractele de cătină urmate de măceș și tescovină. Activitatea inhibitorie a aroniei asupra acestei tulpini a fost mai redusă. Ca și în cazul *L. monocytogenes* ATCC 19118 este de remarcat faptul că preparatele din păducel nu au fost active împotriva *L. monocytogenes* EGDe.

6. Rezultatele obținute prin metoda diluțiilor duble succesive au arătat că diferite specii bacteriene prezintă sensibilități antimicrobiene diferite față de preparatele testate. În general, s-a

observat că bacteriile Gram pozitive (*S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*) sunt mai sensibile decât bacteriile Gram negative (*E. coli*, *S. Abony*, *K. pneumoniae*). În urma testărilor efectuate s-a constatat că pulberile din cătina albă și șrot de cătina albă realizează CMI pronunțată față de toate microorganismele patogene cercetate, preponderent asupra microorganismelor Gram pozitive. Pulberile de măceș posedă activitate antimicrobiană foarte înaltă față de *S. aureus* ATCC 25923 și *B. subtilis* ATCC 6633. Bacteriile Gram negative sunt mai puțin sensibile la efectul pulberilor vegetale. Activitatea antimicrobiană a păducelului este foarte redusă, iar *K. pneumoniae* este rezistentă.

7. Activitatea pudrelor și extractelor din soiurile noi de cătină a fost determinată cantitativ. Cum a fost menționat anterior s-a dovedit că extractele de cătină au fost active după o perioadă de 2 ani și au demonstrat nivel diferit de inhibare a creșterii bacteriilor luate în studiu. Valori mici de inhibiție au demonstrat extractul din soiul de cătină Mister Sandu, R4, urmat de C6 și R1. Bacteriile Gram pozitive sunt mai sensibile la aceste extracte în comparație cu bacteriile Gram negative. Menționăm că aceste preparate peste un interval de timp demonstrează activitate antibacteriană, ceea ce a fost demonstrat și prin metodele calitative și cantitative.

8. Studiul nostru indică faptul că extractul de rozmarin, busuioc cimbru posedă o eficacitate antimicrobiană largă, împiedicând proliferarea atât a speciilor bacteriene Gram pozitive, cât și a celor Gram negative, precum și a levurilor. Extractul de rozmarin a demonstrat cea mai înaltă activitate asupra tuturor tulpinilor luate în studiu.

9. Efect minim inhibitor asupra *L. monocytogenes* ATCC 19118 l-au demonstrat pulberile de cătină, urmat de măceș și tescovină. Aronia și păducelul nu au demonstrat efect antibacterian asupra acestui microorganism. Extractele hidroalcoolice de cătină și măceș au prezentat rezultate vădite asupra efectului inhibitor și bactericid al *L. monocytogenes* EGDe. Cătina a demonstrat proprietăți antimicrobiene mai pronunțate asupra *L. monocytogenes* decât măceșul. Paducelul nu a avut activitate inhibitorie asupra *L. monocytogenes* EGDe.

10. A fost testată activitatea antioxidantă a extractelor de fructe de pădure (cătină, măceș, aronia) și tescovină de struguri pentru diferite grade de diluție (1:1 – 1:8). S-a constatat, că deși la scăderea concentrației compușilor biologic activi se atestă reducerea activității antioxidante (testul DPPH), se păstrează capacitatea lor de inhibare a radicalilor liberi. A fost determinată compoziția polifenolilor individuali din extractele utilizate. Au fost analizate mecanismele probabile de inhibare a activității antioxidante și antimicrobiene ale extractelor.

4. ANALIZA *IN SITU* A ACȚIUNII MICROBIOSTATICE ȘI MICROBICIDE A UNOR EXTRACTE ȘI PULBERI VEGETALE

O problemă cardinală care amenință industria alimentară este contaminarea cu microorganisme a produselor alimentare ca rezultat a manipulării și procesării necorespunzătoare. Contaminarea microbială reduce perioada de valabilitate și calitatea alimentelor care duc la infecții alimentare și la izbucniri de toxii infecții alimentare, ce pot fi letale. Deși activitatea microbiostatică a unor plante vegetale reprezintă o sursă promițătoare de soluții alternative pentru utilizarea lor în scopul diminuării contaminării microbiene a materiei prime și produselor alimentare, eficacitatea acestor compuși se demonstrează a fi semnificativ mai redusă *in situ*, după includerea lor în matricea alimentelor reale, decât *in vitro*. Astfel, necesitatea conservării funcționalității biocomponentelor pe parcursul pretratării materiei prime și a incorporării extractelor în matricea alimentului implică cercetarea mecanismelor de interacțiune compuși bioactivi-matrice alimentară *in situ*, în matricea alimentului contaminat. Astfel, în cadrul tezei au fost examinate efectele microbiostatice și microbicide ale unor extracte și pulberi vegetale în diferite categorii de produse contaminate cu microorganisme, capabile să le colonizeze accidental.

4.1 Evaluarea *in situ* a acțiunii antimicrobiene a extractelor și pulberilor de fructe de pădure în produse din carne

Monitorizarea continuă a prelucrării produselor alimentare este esențială pentru a evita eventualele probleme de sănătate. *Staphylococcus aureus* este unul dintre principalii agenți patogeni din produse alimentare, care cauzează frecvent boli ca rezultat al consumului de alimente contaminate cu toxina stafilococică. *E. coli* poate contamina carnea în timpul procesării. Dacă carnea contaminată nu este tratată la temperatura de 71°C, bacteriile pot supraviețui și infecta consumatorul. Orice produs alimentar care a intrat în contact cu carnea crudă poate fi, de asemenea infectat. Pe baza evaluării riscurilor, producătorii trebuie să decidă ce măsuri sau combinație de măsuri trebuie să fie aplicate pentru a realiza obiectivul de reducere a riscului microbiologic. Unele dintre aceste măsuri pot fi aplicate cu ușurință, în timp ce altele necesită investiții semnificative. În ultimul timp tot mai mult se vorbește despre utilizarea adaosurilor din fructe de pădure pentru diminuarea riscului microbiologic și ținerea sub control a calității și siguranței produselor alimentare (Cojocari et al., 2019; Macari et al., 2021).

Inițial s-a efectuat analiza sanitar-microbiologică a crenvurștilor pentru determinarea indicatorilor sanitar - microbiologici, conform standardelor în vigoare enumerate în capitolul 2.

Conform normativelor în vigoare crenvurștii sunt cercetați la următorii indicatori: NGMAFA 1×10^3 UFC/g (nivel maxim admisibil); Bacterii coliforme în 1,0 g – absent; *S. aureus* în 1,0 g – absent; Microorganisme patogene, *Salmonella* spp. în 25,0 g – absent; *L. monocytogenes* în 25,0 g – absent (tab. 1, Anexa1).

Ulterior a fost analizat *in situ* efectul microbiostatic a pulberilor din fructe de măceș, păducel adăușonați în produse din carne (crenvurști), precum și tarhon, busuioc, cimbru. S-a constatat, că adăugarea acestora în produsele din carne oferă rezultate optimiste din punct de vedere bacteriologic. Au fost obținute probele de crenvurști cu adaosuri de pulbere din fructe de cătină albă, măceș și păducel în concentrații de 0,25; 0,5 și 1 % raportate la masa cărnii utilizate. S-a constatat că asupra dezvoltării microorganismelor în timpul păstrării crenvurștilor influențează tipul și concentrația adaosului vegetal utilizat.

Probele analizate corespund standardelor în vigoare, nu s-au depistat bacterii inadmisibile. *S. aureus* și bacterii coliforme nu au fost detectate într-un 1 g produs după I, III și a VII zi de păstrare (din momentul preparării). Bacterii din genul *Salmonella* și *L. monocytogenes* nu au fost depistate în 25 g în toate trei loturi examinate.

În studiu a fost analizat un lot de produse alimentare: crenvurști, în care au fost adăugate diferite concentrații din aceste preparate biologice. A fost determinată acțiunea antibacteriană *in situ* (crenvurști) a extractelor de măceș, păducel și probelor martor, crenvurștii prealabil fiind infectate cu *S. aureus*, *S. Abony*, *K. pneumoniae*, *E. coli*. După ce probele au fost pregătite după cum s-a menționat în capitolul 2, ulterior au fost contaminate cu bacterii ce adesea contaminează produsele alimentare. Drept substrat de contaminare au servit mostrele de crenvurști obținute în condiții de laborator la Departamentul Tehnologia Produselor Alimentare. Testările au fost realizate în laboratorul Disciplinei de microbiologie și imunologie a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (fig. 4.1).



Fig. 4.1 Crenvurști cu diferite adaosuri vegetale.

S-a determinat creșterea tulpinelor microbiene *in situ* (crenvurști), atât în mostrele martor (fără adaos de pulbere de fructe de pădure), cât și în cele cu adaos de măceșe și păducel. Probele contaminate s-au incubat în termostat la temperatura de 37 °C pentru 24 ore, 48 ore, 72 ore și 96 ore. În tabelul 4.1 sunt prezentate rezultatele monitorizării creșterii tulpinilor patogene *in situ*.

Tabelul 4.1. Numărul de colonii microbiene dezvoltate în probele de crenvurști contaminați

Tulpini* Ziua/Proba		<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>S. Abony</i> ATCC 6017		<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883		<i>E. coli</i> ATCC 25922	
		10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻³	10 ⁻⁶
Ziua 1	PM	552	78	difuz	>700	difuz	168	difuz	488
	Măceșe	228	16	difuz	120	difuz	88	difuz	64
	Păducel	96	1	difuz	248	difuz	103	difuz	88
Ziua 2	PM	>1000	268	difuz	>800	difuz	346	difuz	596
	Măceșe	440	23	difuz	228	difuz	114	difuz	264
	Păducel	176	3	difuz	480	difuz	144	difuz	152
Ziua 3	PM	>1000	396	difuz	difuz	difuz	412	difuz	>700
	Măceșe	560	49	difuz	392	difuz	300	difuz	960
	Păducel	222	4	difuz	>1000	difuz	760	difuz	344
Ziua 4	PM	difuz	416	difuz	difuz	difuz	560	difuz	difuz
	Măceșe	difuz	280	difuz	>1000	difuz	372	difuz	difuz
	Păducel	144	3	difuz	>1000	difuz	896	difuz	364

Notă: PM – proba martor; * tulpini de referință, difuz- creștere confluentă

După 24 de ore în mostrele în care s-au inoculat suspensii ale tulpinii *S. aureus* ATCC 25923 s-au obținut următoarele rezultate: pentru diluția 10⁻³ în proba martor au crescut 552 colonii, pe când în proba cu adaos de păducel, doar 96 colonii, iar în cea cu adaos de măceși 228 colonii. Pentru suspensia de microorganisme cu diluția 10⁻⁶ în proba martor au crescut 78 colonii, în proba cu adaos de măceși 16 și în cea cu adaos de păducel respectiv o colonie. În următoarele zile de incubare rata de creștere a microorganismelor patogene de asemenea a fost diferită. În unele plăci Petri s-a depistat o creștere abundentă ce s-a extins pe toată suprafața. S-a numărat numărul total de colonii care au crescut pe fiecare placă Petri după 24 ore, 48 ore, 72 ore și 96 ore, rezultatul a fost exprimat în UFC.

În probele de crenvurști ce au fost contaminate cu *Salmonella Abony* ATCC 6017 s-au determinat următoarele rezultate: după 24 ore din toate probele cu diluția 10⁻³ atestă o creștere difuză pe suprafața plăcilor. Un număr mai mic de colonii (120) se observă în proba cu măceș din diluția 10⁻⁶. În cazul *S. Abony*, după 48, 72, 96 ore în probele cu măceșe se constată un număr mai mic de colonii (228, 392, mai mult de 1000 colonii) în comparație cu probele martor și păducel.

În cazul *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 din diluția 10⁻³ se observă o creștere difuză pentru toate probele și perioadele de timp. Pentru *K. pneumoniae* din diluția 10⁻⁶ se constată un număr mai mic de colonii în probele cu măceș pentru toate perioadele de timp (24, 48, 72, 96 ore).

Păducelul a demonstrat o activitate mai redusă asupra *K. pneumoniae*, se observă un număr mai mare de UFC.

S-a demonstrat că în crenvurștii cu adaos de păducel, măceșe și proba martor ce au fost contaminați cu *E. coli* ATCC 25922, se constată un număr mai mare de colonii în toate perioadele de timp, preponderent peste 96 ore.

Comparând rezultatele obținute s-a constatat că probele ce conțin adaos de maceșe și păducel au o capacitate mai mare de-a inhiba dezvoltarea tulpinilor testate în comparație cu proba martor. Probele ce conțin păducel au demonstrat un efect mai pronunțat de inhibiție asupra tulpinilor de *S. aureus* ATCC 25923 (fig. 4.2). Probele cu adaos de fructe de pădure au efect mai diminuat asupra tulpinilor de bacterii Gram negative ce au fost luate în studiu (fig. 4.3), preponderent asupra tulpinelor de *S. Abony* ATCC 6017.

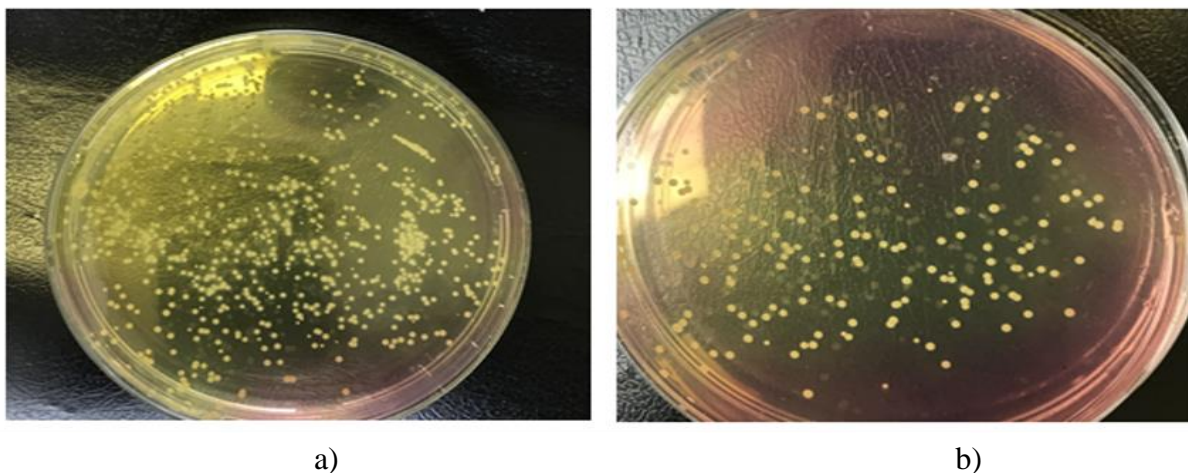


Fig. 4.2 Colonii de *S. aureus* ATCC 25923 dezvoltate din probele de crenvurști testate după 24 ore: a) proba martor; b) proba cu păducel.

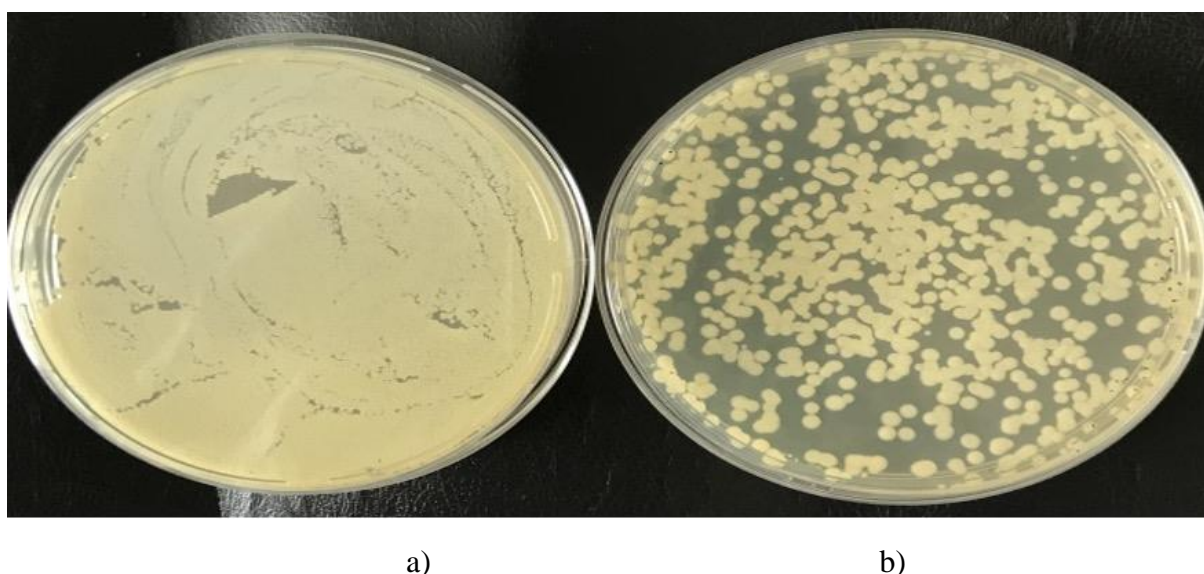
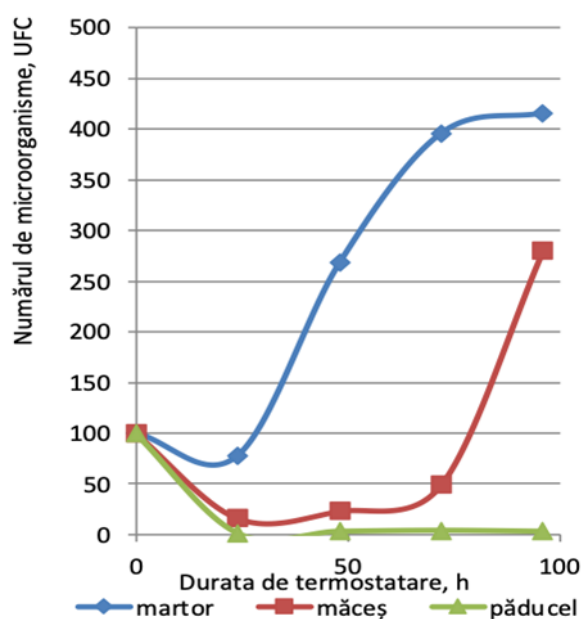


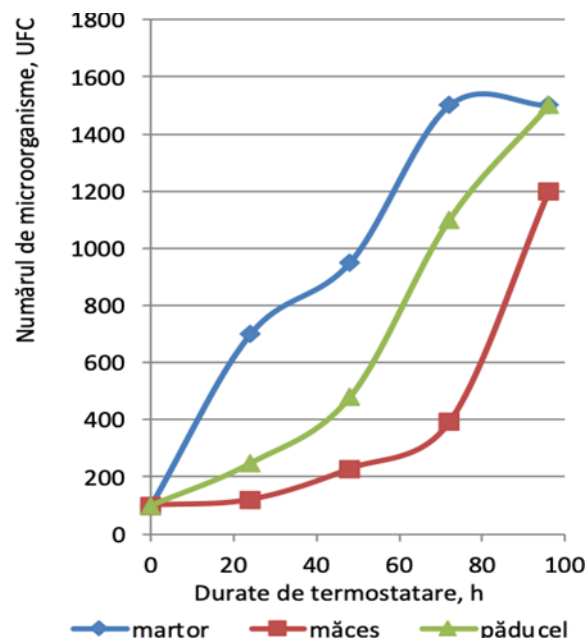
Fig. 4.3 Colonii de *Klebsiella pneumoniae* dezvoltate din probele de crenvurști testate după 96 ore: a) proba martor; b) proba cu păducel.

Conform rezultatelor obținute la numărarea coloniilor pe placa de mediu (fig. 4.3), s-a calculat numărul de microorganisme în dependență de diluțiile suspensiilor de tulpini inoculate și s-a construit curba de creștere a fiecărei tulpini pe o perioadă de patru zile (96 ore). Curba de creștere bacteriană reprezintă numărul de celule vii dintr-o populație bacteriană într-o perioadă de timp. În figura 4.4 sunt prezentate fazele *Lag* și faza *Exponențială* de creștere a microorganismelor testate. Din aceste faze ale curbei de creștere a microorganismelor este vizibilă influența diferitor adaosuri de fructe de pădure asupra diminuării creșterii tulpinelor de microorganisme patogene care pot contamina produsele din carne.

Faza *Lag* este definită ca perioada inițială din viața unei populații bacteriene când celulele se adaptează la un nou mediu înainte de a începe creșterea exponențială. Un mic grup de celule sunt plasate într-un mediu bogat în nutrienți, care le permite să sintetizeze proteine și alte molecule necesare pentru replicare. Aceste celule cresc în dimensiune, dar în fază nu apare nici o diviziune celulară (Cojocari et al., 2019). Faza de lag este cea mai insuficient înțeleasă fază de creștere din cauza lipsei de date care să descrie procesele fiziologice și moleculare subiacente (Matthew et al., 2012). După faza de întârziere, celulele bacteriene intră în faza exponențială sau logaritmică. Acesta este momentul în care celulele se împart prin divizare binară și se dublează după timpul de generație. Activitatea metabolică este ridicată, deoarece componentele ADN, ARN, componentele peretelui celular și alte substanțe necesare creșterii sunt generate pentru divizare. În această fază de creștere, antibioticele și dezinfectantele sunt cele mai eficiente, deoarece aceste substanțe vizează în mod obișnuit peretele celular sau procesele de sinteză a proteinelor de transcriere ADN și de translație a ARN (Cojocari et al., 2019).



a)



b)

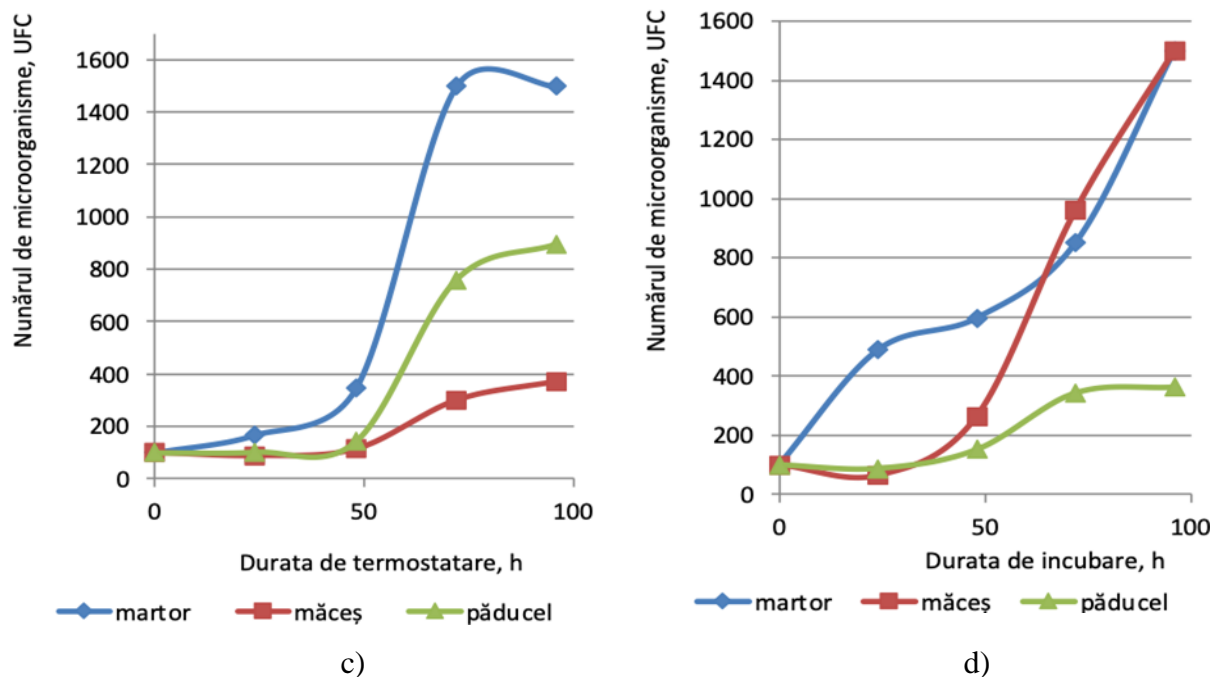


Fig. 4.4 Faza Lag și Faza Exponențială a tulpinelor patogene în probele de crenvurști (perioada de testare 96 h): a) *S. aureus* ATCC 25923; b) *S. Abony* ATCC 6017; c) *K. pneumoniae* ATCC 13883; d) *E. coli* ATCC 25922.

Faza Lag bacteriană a fost relatată pentru prima dată la sfârșitul secolului al XIX-lea, când "perioada latentă" a fost descrisă în studiile privind efectele temperaturii asupra *Salmonella enterica* serovar Typhi Typhimurium. S-a presupus că faza de întârziere permite adaptarea necesară pentru ca celulele bacteriene să înceapă să activeze în noile condiții de mediu (Matthew et al., 2012; Cojocari, et. al., 2019). În lucrarea realizată noi am testat efectul substanțelor biologic active asupra fazei Lag al unor tulpini microbiene patogene. În baza analizei datelor experimentale au fost trasate curbele cinetice de creștere a microorganismelor patogene (fig. 4.4). Din figura 4.4 este vizibil că adaosurile de păducel și măceș în probele de crenvurști au mărit faza de Lag pentru tulpinele de microorganisme inoculate și au diminuat rata de creștere a microorganismelor patogene. În cazul *S. aureus* (fig. 4.4a) adaosul de pudră de păducel inhibă vâdit creșterea microorganismelor în perioada evaluată. Pentru *E. coli* (fig. 4.4d) păducelul este, de asemenea, cel mai eficient pentru stagnarea dezvoltării microorganismelor patogene în produsele din carne. În cazul *Klebsiella pneumoniae* (fig. 4.4c) efectul pulberii de măceșe este cel mai marcant. Pentru *Salmonella Abony* faza Lag este observată pe parcursul a 80 ore (crenvurști cu pudră de măceșe) și de cca 40 h pentru produsele cu adaos de păducel (fig. 4.4b). Rezultatele experimentale obținute în acest studiu confirmă rezultatele altui studiu vizavi de proprietățile antimicrobine ale pulberilor de măceșe și păducel asupra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. Pulberile de plante investigate au arătat un potențial antimicrobian

promițător împotriva microorganismelor patogene și pot fi utilizate în industria alimentară pentru a reduce contaminarea microbiană a materiilor prime și a alimentelor.

În rezultatul testărilor efectuate s-a constatat că adaosul de măceș și păducel în rețeta de fabricare a crenvurștilor poate ține sub control rata de creștere a microorganismelor, inclusiv a celor patogene. Acest lucru a fost constatat prin evaluarea multiplicării unor tulpini de microorganisme precum ar fi: *S. aureus* ATCC 25923, *S. Abony* ATCC 6017, *K. pneumoniae* ATCC 13883 și *E. coli* ATCC 25922. Prin studierea fazei *Lag* și fazei *Logaritmice* de creștere a tulpinelor microbiene patogene s-a constatat că păducelul are un efect bacteriostatic mai mare asupra tulpinelor de *S. aureus* ATCC 25923 și *E. coli* ATCC 25922, iar măceșul are un efect bacteriostatic mai înalt asupra tulpinelor de *S. Abony* ATCC 6017 și *K. pneumoniae* ATCC 13883.

Utilizare adaosurilor de fructe de pădure în rețeta de fabricare a produselor din carne poate avea două semnificații: ameliorarea valorii nutritive a produsului și creșterea termenului de valabilitate al produsului prin ținerea sub control al riscului microbiologic. Prelungirea fazei *Lag* în mostrele de crenvurști cu adaos de pulbere de fructe de pădure demonstrează că aceste produse pot avea o durată mai mare de păstrare (conservabilitate), factor extrem de important din punct de vedere al siguranței alimentelor.

4.2 Analiza microbiologica a crenvurștilor cu adaos de busuioc, cimbru, tarhon

Utilizarea extractelor de plante drept sursă de compuși bioactivi devine o strategie atractivă pentru îmbunătățirea calității și a caracteristicilor cărnii proaspete și ale produselor din carne. Datorită originii naturale, compușii bioactivi obținuți din plante sunt candidații ideali pentru a înlocui antioxidanții sintetici și pentru a crește durata de conservare a produselor din carne. În același timp, pot îmbunătăți, fie direct, fie indirect, valoarea funcțională a produselor din carne. Compușii antimicrobieni sunt utilizați pentru a inhiba dezvoltarea microorganismelor care induc deteriorarea alimentelor, iar antioxidanții pentru a întârzia oxidarea lipidelor și decolorarea alimentelor (Macari et al., 2021).

Sectorul produselor din carne s-a confruntat ani la rând cu crize frecvente în ceea ce privește siguranța, calitatea și publicitatea negativă. Alterarea microbiană a produselor din carne tocată este un proces eterogen care implică dezvoltarea unor comunități microbiene diverse și slab caracterizate. În pofida faptului că dezvoltarea bacteriană este unul dintre principalii factori care fac carnea inacceptabilă pentru consumul uman, se cunoaște mai puțin despre dinamica comunităților acestora. Cercetătorii de la Universitatea Aarhus din Danemarca și de la Institutul danez de cercetare a cărnii au sugerat utilizarea ierburilor și a fructelor de pădure în produsele din carne ecologică, bazându-se pe faptul că unele fructe de pădure, frunze, bulbi, rădăcini și tulpini

ale unor plante sunt cunoscute pentru conținutul lor în substanțe cu proprietăți antibacteriene și antivirale. În unele plante, concentrația acestor compuși este atât de mare încât, probabil, pot fi folosite pentru conservarea alimentelor (Macari et al., 2021).

Crenvurștii cu adaos de extracte de plante liofilizate au fost supuși examenului microbiologic cu investigarea numărului total de microorganisme aerobe mezofile (tab.4.2).

Tabelul 4.2. Microorganisme identificate după o perioadă de timp de la fabricarea mezeturilor

Probe	NMMAFA, UFC/g	Bacterii coliform în 1g	<i>S. aureus</i> în 1 g	<i>Salmonell spp.</i> în 25 g
După 24 h				
Proba martor	10 ³	-	-	-
SBE 0,1 %	10 ³	-	-	-
SBE 0,2 %	10 ³	-	-	-
SBE 0,3 %	10 ³	-	-	-
SSE 0,05 %	10 ³	-	-	-
SSE 0,1 %	10 ²	-	-	-
SSE 0,2 %	10 ³	-	-	-
SET 0,1 %	10 ³	-	-	-
SET 0,2 %	10 ³	-	-	-
SET 0,3 %	10 ²	-	-	-
După 96 h				
Proba martor	10 ⁴	-	-	-
SBE 0,1 %	10 ³	-	-	-
SBE 0,2 %	10 ³	-	-	-
SBE 0,3 %	10 ²	-	-	-
SSE 0,05 %	10 ³	-	-	-
SSE 0,1 %	10 ³	-	-	-
SSE 0,2 %	10 ³	-	-	-
SET 0,1 %	10 ²	-	-	-
SET 0,2 %	10 ³	-	-	-
SET 0,3 %	10 ⁴	-	-	-
După 168 h				
Proba martor	10 ⁵	-	-	-
SBE 0,1 %	10 ⁴	-	-	-
SBE 0,2 %	10 ³	-	-	-
SBE 0,3 %	10 ⁴	-	-	-
SSE 0,05 %	10 ⁴	-	-	-
SSE 0,1 %	10 ⁴	-	-	-
SSE 0,2 %	10 ⁴	-	-	-
SET 0,1 %	10 ⁴	-	-	-
SET 0,2 %	10 ⁴	-	-	-
SET 0,3 %	10 ⁵	-	-	-

Notă: NMMAFA - numărul total de microorganisme mezofile aerobe și facultativ anaerobe; "-" absența creșterii; UFC - unități formatoare de colonii; SBE - crenvurști cu extract de busuioc; SSE - crenvurști cu cimbru; STE - crenvurști cu tarhon.

Tabelul 4.2 oferă date despre gradul de contaminare a produsului, a bacteriilor coliforme care indică contaminarea fecală și detectarea microorganismelor patogene din genul *Staphylococcus* și *Salmonella*, corespunderea probelor standardelor în vigoare. Datele experimentale reprezintă rata de creștere a microorganismelor identificate după 24 h, 96 h (4 zile) și 168 h (7 zile) de la fabricare. După 24 de ore de la fabricație, toate probele corespund indicatorilor microbiologici standard; nu au fost detectate bacterii coliforme, *S. aureus* sau *Salmonella* spp. După 96 de ore (4 zile) de la fabricare, în proba de control și în cea cu conținut de 0,3% tarhon și au fost identificate un număr de 10^4 UFC; acest lucru depășește cerințele normative. Nu au fost detectate bacterii coliforme, *S. aureus* sau *Salmonella* spp. După 168 h de la fabricație, în toate probele a fost identificat un număr de UFC care depășea cerințele normative, cu excepția probei cu 0,2% busuioc. Nu au fost detectate bacterii coliforme, *S. aureus* sau *Salmonella* spp.

Ulterior a fost efectuată analiza microbiologică a crenvurștilor contaminați cu tulpini de referință (tab. 4.3). Activitatea antibacteriană a extractelor de busuioc, cimbru și tarhon adăugate la crenvurști a fost determinată *in situ*. Proba de control și probele cu adaos de extracte de plante liofilizate au fost infectate în prealabil cu tulpini bacteriene: *S. aureus*, *E. coli* și *S. Abony*. Probele au fost incubate la 37 °C timp de 24 h. Conform rezultatelor obținute, se observă un număr mai mic de colonii în probele care conțin extracte în comparație cu probele martor (fig. 4.6).

Tabelul 4.3. Rezultatele monitorizării *in situ* a creșterii tulpinilor patogene în crenvurști contaminați cu tulpini de referință

Probe	Diluții	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. Abony</i>	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Proba Martor	10^{-3}	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz
	10^{-6}	320	650	528	788	546	1000
Busuioc 0,1 %	10^{-3}	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz
	10^{-6}	312	26	67	232	424	812
Busuioc 0,2 %	10^{-3}	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz
	10^{-6}	286	160	52	184	384	404
Busuioc 0,3 %	10^{-3}	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz
	10^{-6}	242	74	46	242	228	156
Cimbru 0,1 %	10^{-3}	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz
	10^{-6}	263	316	216	244	218	840
Cimbru 0,2 %	10^{-3}	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz
	10^{-6}	146	136	104	103	224	755
Cimbru 0,3 %	10^{-3}	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz
	10^{-6}	102	216	88	196	186	184
Tarhon 0,1 %	10^{-3}	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz
	10^{-6}	316	236	146	702	364	976
Tarhon 0,2 %	10^{-3}	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz
	10^{-6}	206	256	128	248	282	805
Tarhon 0,3 %	10^{-3}	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz	difuz
	10^{-6}	112	221	106	256	208	232

Notă: difuz - creștere difuză a tulpinelor pe placă

În probele SBE (busuioc) s-a observat un număr mai mic de colonii pentru *S. aureus* după 48 h (160 colonii), iar pentru bacilii Gram negativi extractele de busuioc au prezentat o activitate mai mare după 24 h (67 colonii pentru *E. coli*) pentru *S. Abony* o capacitate redusă cu un număr de 424 colonii. Extractele de busuioc în concentrații de 0,1 % și 0,3 % au fost mai active asupra *Staphylococcus aureus* (160 colonii), dar concentrațiile de 0,2 % și 0,3 % au avut activitate asupra bacililor Gram-negativi, 184 colonii pentru *E. coli* și 404 *S. Abony*. În probele cu busuioc contaminate cu bacterii gram negative se observă un număr mai mic de colonii, în special pentru *E. coli*. O activitate mai pronunțată asupra tuturor bacteriilor testate a fost remarcată în crenvurștii cu concentrația de 0,3 % (tab. 4.3).

Ratele de creștere specifice ale tulpinilor individuale a bacteriilor *Salmonella* Abony pe diferite substraturi nutritive sunt prezentate în tabelul 4.4.

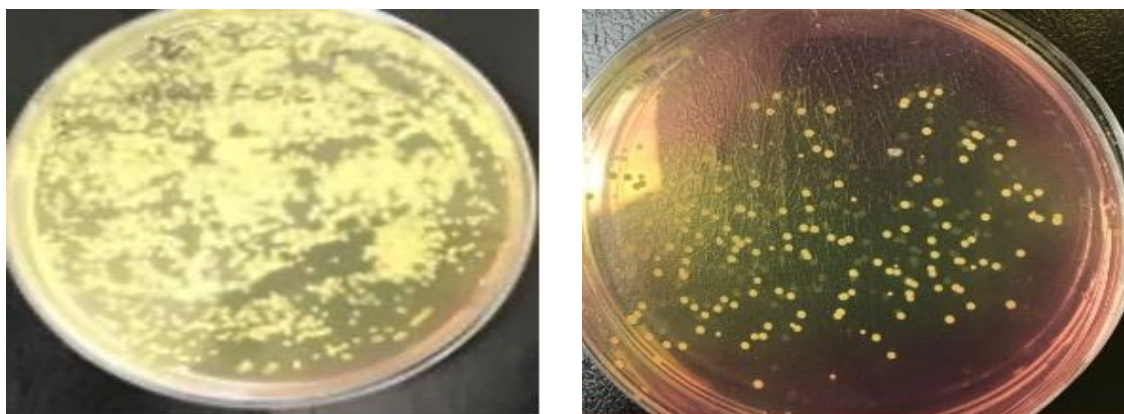
Tabelul 4.4. Ratele de creștere specifice ale tulpinilor individuale S. Abony

Probă	Concentrație %	Timpul de incubare, h						
		0	24		48		72	
		lnX	lnX	GM*, μ	lnX	GM, μ	lnX	GM, μ
Proba martor		12,21	20,11	0,33 ± 0,01	20,72	0,18 ± 0,02	20,99	0,12 ± 0,01
Busuioc	0,1	12,21	19,87	0,32 ± 0,02	20,52	0,17 ± 0,01	19,30	0,10 ± 0,01
	0,2	12,21	19,76	0,31 ± 0,01	19,24	0,15 ± 0,02	19,03	0,09 ± 0,01
	0,3	12,21	10,82	0,32 ± 0,01	18,87	0,14 ± 0,01	18,40	0,09 ± 0,01
Cimbru	0,1	12,21	19,20	0,29 ± 0,01	20,55	0,17 ± 0,01	19,37	0,10 ± 0,01
	0,2	12,21	19,23	0,29 ± 0,01	20,44	0,17 ± 0,01	18,79	0,09 ± 0,01
	0,3	12,21	19,04	0,28 ± 0,02	19,03	0,14 ± 0,02	17,18	0,07 ± 0,01
Taragon	0,1	12,21	19,71	0,31 ± 0,01	20,70	0,18 ± 0,01	20,18	0,11 ± 0,01
	0,2	12,21	19,46	0,30 ± 0,02	20,51	0,17 ± 0,01	19,80	0,11 ± 0,01
	0,3	12,21	19,15	0,29 ± 0,01	19,26	0,15 ± 0,01	17,69	0,08 ± 0,01

Notă: $p \leq 0,05$.

După 24 de ore, rata de creștere a bacteriilor *S. Abony* a fost de 0,3 în toate probele. După 48 și 72 de ore de incubare la 37 °C s-au obținut rezultate diferite. În proba martor rata de creștere a *S. Abony* a fost de 0,18 și respectiv 0,12; în probele cu adaos de busuioc, cimbru și tarhon rata de concentrație de 0,3% a fost de 0,14 - 0,15 și respectiv 0,07 - 0,09 (Sandulachi et al., 2021).

Extractele de cimbru și tarhon au avut o activitate mai vădită după 24 h asupra tuturor speciilor de bacterii testate. Extractul de cimbru în concentrații de 0,1 % și extractul de tarhon în concentrații de 0,2 % și 0,3 % au prezentat o activitate antimicrobiană mai pronunțată (fig. 4.6). Probele cu extract de cimbru de 0,3 % au fost cele mai active asupra tulpinelor luate în studiu. Un efect manifest s-a constatat asupra *Staphylococcus aureus* (102 și 26 colonii) (fig. 4.5).



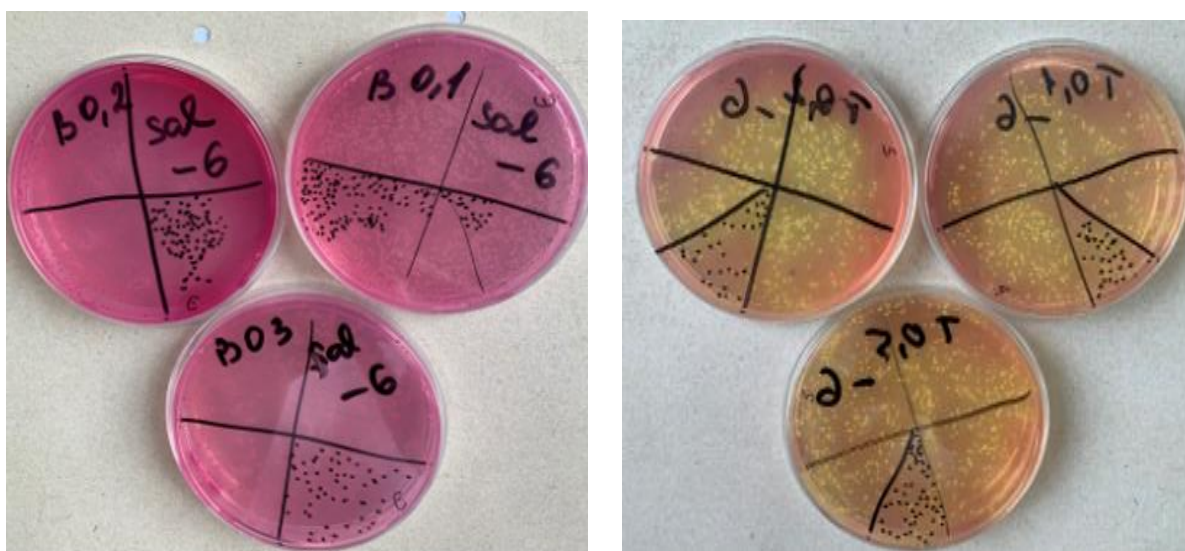
a)

b)

Figura 4.5 Creșterea tulpinelor de *S. aureus* ATCC 25923 în probele de crenvurști:

a) proba martor; b) proba cu cimbru.

În probele de crenvurști cu tarhon 0,1 % s-a observat un număr mai mare de colonii pentru toate tulpinele testate. Probele cu extract de tarhon 0,3 % au avut un efect manifest asupra *S. aureus* - 112/221 colonii (fig. 4.6).



a)

b)

Fig. 4.6 Creșterea tulpinilor de *S. Abony* și *S. aureus* în probele de crenvurști: a) proba cu busuioc martor; b) proba cu tarhon.

În concluzie se remarca că extractele de plante pot fi utilizate ca ingredient sau ca o componentă de ambalare pentru perioade de depozitare scurte sau lungi (cum ar fi carnea proaspătă și crenvurști). În cele din urmă, căutarea unor soluții eficiente și practice pentru implementarea acestor extracte în ambalaje active este recomandabilă și ar putea găsi un interes imens în viitor.

În urma testelor efectuate, s-a stabilit că aditivii vegetali-extracte liofilizate de busuioc și cimbru din rețeta de fabricare a crenvurștilor pot controla rata de creștere a microorganismelor,

inclusiv a celor patogene. Acest lucru a fost determinat prin evaluarea înmulțirii unor tulpini de microorganisme precum *Staphylococcus aureus* (fig. 4.6), *Escherichia coli* și *S. Aboni*.

NMMAFA în probele cu aditivi vegetali în diferite concentrații este mult mai mică în comparație cu proba martor. Tulpinile infectate din aceste probe prezintă o creștere progresivă dirijată și o dezvoltare a coloniilor de microorganisme. Prin urmare, utilizarea aditivilor vegetali în rețeta produselor din carne poate îmbunătăți calitatea produsului și durata de conservare a produsului prin menținerea sub control a riscului microbiologic.

4.3 Evaluarea *in situ* a acțiunii antimicrobiene a unor extracte și pulberi vegetale în crema de brânză

Crema de brânză prezintă un mediu favorabil pentru creșterea microorganismelor patogene și oferă condiții facile de alterare a produsului (Popescu et al., 2023). Laptele și produsele lactate datorită compoziției și proprietăților lor unice, favorizează creșterea multor microorganisme patogene. Contaminarea microbială a alimentelor precum laptele a fost remarcată și abordată în mai multe cercetări. Majoritatea cercetărilor includ influența tratamentului termic sau a sării în monitorizarea acestui risc de contaminare microbială. Obiectivul studiului a fost investigarea altor metode de reducere și control al riscului microbiologic în alimente (Sturza et al., 2019). Studiile anterioare au remarcat că pulberea de fructe de pădure are un efect inhibitor asupra microorganismelor patogene (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. mesentericus*), inclusiv produsele din carne (Ghendov-Moșanu et al., 2018; Cojocari et al., 2019). Pasteurizarea eficientă a laptelui elimină riscul dezvoltării organismelor patogene, dar nu distruge organismele cu creștere lentă sau produc spori. Pasteurizarea distruge microorganismele din lapte, dar manipularea necorespunzătoare după pasteurizare îl poate recontamina. Atât laptele crud, cât și cel pasteurizat pot fi contaminați în timpul îmbutelierii, transportului și depozitării. Pasteurizarea nu distruge decât agenții patogeni din lapte în momentul prelucrării, dacă condițiile insalubre permit agenților patogeni să reintre mai târziu în lapte, acesta va fi din nou contaminat (Sturza et al., 2019).

Scopul acestui studiu a fost de-a evalua efectul adăugării de pulberi de fructe de pădure la rețeta de cremă de brânză asupra microorganismelor patogene care pot infecta accidental produsul finit. Inițial sa-au testat probele conform următoarelor standarde indicate în tabelul 4.5. Toți indicatorii sunt investigați conform documentelor normative:

1. NGMAFA- SN EN ISO 4833-1.
2. B. coliforme – SM ISO 483 (metoda de detecție).
3. Levuri și micete – FOCT 10444, 12.
4. Salmonella – SM EN ISO 6579-1 (metoda de detecție).

Tabelul 4.5. Determinarea NGMAFA și a micetelor conform standardului

Proba crema de brânză	Diluția 10 ⁻² NGMAFA UFC	Diluția 10 ⁻³ NGMAFA UFC	Micete UFC
Proba Martor	32	10	4
Măceșe	13	3	1
Cătina	8	l/c	1
Aronia	4	l/c	0
Păducel	15	2	5

Notă: NTMFC - Numarul total de germeni mezofili aerobi și facultativi anaerobi, L/c - lipsa creșterii, UFC - unități formatoare de colonii.

Se denotă lipsa bacteriilor coliforme în 1 g produs pentru toate probele luate în studiu. La fel nu s-au determinat specii de stafilococi din probele studiate din diluțiile 10⁻² și 10⁻³. Toate probele corespund standardelor în vigoare. În proba Nr 12 (proba cu pulbere de păducel) s-au depistat 4 colonii de fungi filamentoși și o colonie de levuri. Conform standardelor nu s-au depistat microorganisme patogene (tab. 4.5).

O cerere în creștere pentru produse alimentare sigure și naturale fără conservanți sintetici îi determină pe cercetători să dezvolte noi alternative și abordări durabile pentru conservarea alimentelor. Cremă de brânză este o brânză moale proaspătă folosită ca ingredient în multe aplicații alimentare. Crema de brânză este considerată un mediu favorabil pentru creșterea microorganismelor patogene. Adăugarea de conservanți este una dintre cele mai utilizate metode de asigurare a stabilității antimicrobiene a brânzeturilor. Înlocuirea eficientă a conservanților (de exemplu, sorbați, etc.) este în centrul atenției diferitelor studii, revizuite recent. Adăugarea directă a plantelor aromatice la produsele alimentare este cea mai comună metodă aplicată în industrie. Cu toate acestea, utilizarea lor este încă limitată în produsele alimentare deoarece pot afecta negativ caracteristicile senzoriale și fizico-chimice ale produselor, pot interacționa cu componentele din matricea alimentară, precum și sunt instabile la variațiile de pH, temperatură, prezență de lumină etc. (Popescu et al., 2023).

După evaluarea activității antibacteriene la contact direct (calitativ și cantitativ) a extractelor și pulberilor din diverse fructe de pădure și plante, s-a determinat efectul lor bacteriostatic *in situ*, pe crema de brânză (tab. 4.6). Au fost investigate microbiologic următoarele probe cu adaos de pulbere de fructe de pădure (tab. 4.6).

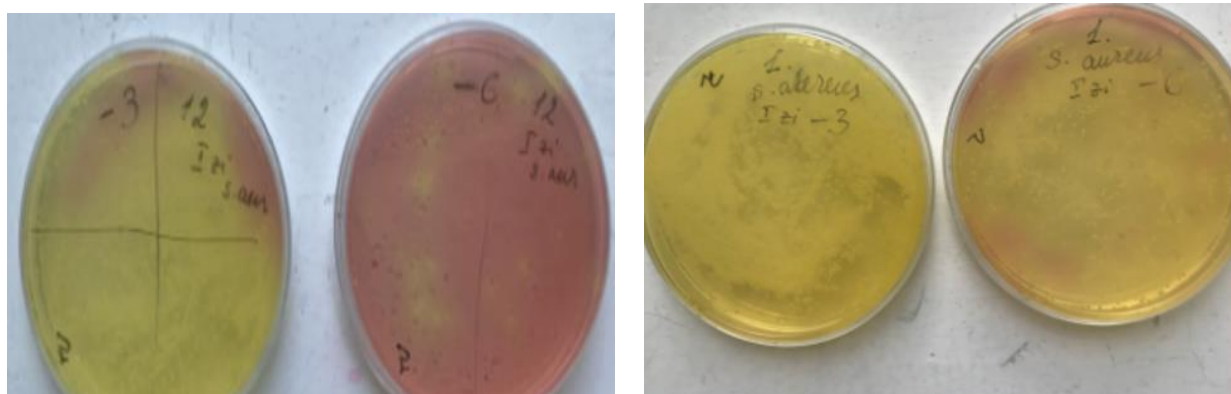
- Cremă de brânză – probă de control – (S1);
- Cremă de brânză cu 2 % pudră de măceșe – (S3);
- Cremă de brânză cu 2 % pudră de cătină – (S6);
- Cremă de brânză cu pulbere de aronia 2 % – (S9);
- Cremă de brânză cu 2 % pudră de păducel – (S12).

Tabelul 4.6. Reducerea creșterii microbiene în probele cu cremă de brânză cu adaos de pulberi de fructe de pădure

Proba	Diluții	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Salmonella</i> Abony ATCC 6017		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	
		I zi, UFC	II zi, UFC	I zi, UFC	II zi, UFC	I zi, UFC	II zi, UFC
S1	10 ⁻⁶	>1000	171	>1000	432	242	125
S3	10 ⁻⁶	38	1	11	1/c	12	1/c
S6	10 ⁻⁶	40	28	42	5	1/c	1/c
S9	10 ⁻⁶	71	51	1/c	1/c	2	1/c
S12	10 ⁻⁶	28	1/c	66	10	6	1/c

Notă: UFC - unități formatoare de colonii, 1/c - lipsa creșterii

Pentru contaminarea probelor experimentale de cremă de brânză s-au utilizat tulpinile microbiene (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Abony ATCC 6017, *Escherichia coli* ATCC 25922). Probele infectate au fost incubate în termostat la temperatura de 37 °C pentru 48 ore. După prima zi de incubare în proba martor (S1) s-a constatat un număr mai mare de colonii pentru toate tulpinile testate în comparație cu probele nr 3, 6, 9, 12. Un efect mai pronunțat asupra tulpinilor de *Staphylococcus aureus* au manifestat-o probele cu cătină (40 colonii din diluția 10⁻⁶) și păducel (28 colonii din diluția 10⁻⁶). În ziua a doua (48 ore) în proba de control se constată o diminuare a numărului de colonii (171) și la fel o scădere a numărului de colonii în toate probele, peponderent în probele cu măceș și păducel -11 colonii, din diluția 10⁻⁶, unde a fost constatat absența creșterii (fig. 4.7).



a)

b)

Fig. 4.7 Efectul pulberilor încorporate în crema de brânză asupra *S. aureus*:

a) proba S1 - măceș, martor; b) proba S12 – martor, păducel).

Asupra *S. Abony* un efect vădit a avut-o proba S9 (aronia). Pe plăci au lipsit coloniile din ambele diluții, atât în prima cât și în a doua zi. S-a remarcat că în proba S6 (cătină) coloniile au fost mai puține (42 și respectiv 5 din diluțiile respective) în comparație cu proba martor.

Probele cu adaos de preparate vegetale s-au dovedit a fi mai active asupra speciei *E. coli*. La fel ca și în cazul *S. aureus* și *S. Abony* în proba martor se observă o creștere mai intensă pe plăci (242 colonii în prima zi și 125 în a doua zi). Un efect mai diminuat asupra *E. coli* s-a remarcat

la probele S3 și S12. Efect pronunțat au demonstrat probele S6, S3 și S9 (tab. 4.6). După a doua zi de testare conform datelor obținute am constatat că a scăzut numărul de colonii, preponderent în cazul *E. coli*, creșterea lipsește în toate probele cu excepția probei martor. Cele mai efective sunt probele S6, S9, S3 (fig. 4.7).

Diverse studii publicate au arătat că mai mulți agenți patogeni de origine alimentară sunt prezenți în laptele crud din diferite categorii de lactate, iar acești microbi patogeni pot fi prezenți și în produsele fabricate, deoarece pot pătrunde oportunist în produsele fabricate în timpul proceselor de procesare, ambalare, distribuție și depozitare. Eficiența unei anumite soluții antimicrobiene va depinde, de asemenea, de tipul, genul, speciile și tulpina microorganismului țintă. De asemenea, va depinde și de factorii de mediu, cum ar fi pH-ul, activitatea apei, temperatura, compoziția atmosferei, încărcarea microbiană inițială și aciditatea substratului alimentar.

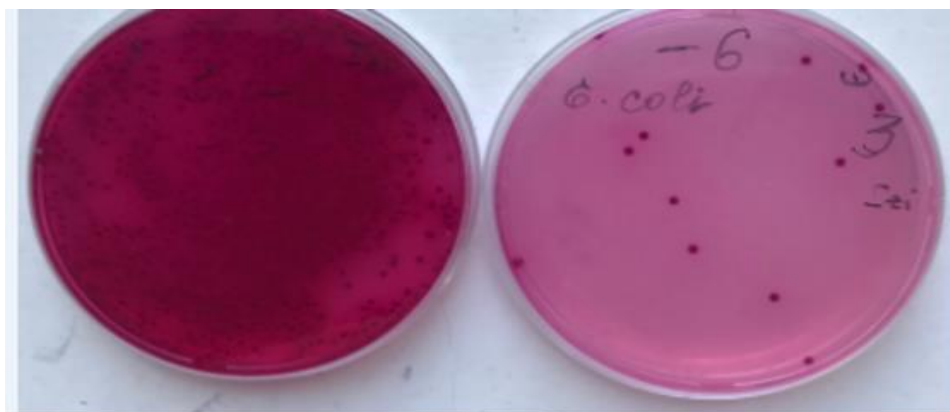


Fig. 4.8 Efectul pulberilor încorporate în crema de brânză asupra *E. coli* (proba S3 -proba martor).

Rezultatele testelor au evaluat efectul antimicrobian al pulberilor de fructe de pădure asupra microorganismelor patogene (*Salmonella* Abony ATCC 6017, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și *Escherichia coli* ATCC 25922). S-a stabilit că adăugarea de pulberi de fructe de pădure (măceș, aronia, cătină și păducel) poate menține sub control rata de creștere a microorganismelor, inclusiv a agenților patogeni. Majoritatea microorganismelor inoculate în probele de cremă de brânză testate cu adaos de pulberi de fructe de pădure au fost distruse după 48 de ore de termostatare la 37 °C.

Cel mai relevant efect antimicrobian a fost observat în cazul pulberilor de fructe de pădure adăugate în cremă de brânză asupra tulpinilor testate de *E. coli*. Pulberile de măceș și aronia adăugate în cremă au manifestat un efect antimicrobian major asupra tulpinilor de *Salmonella*. Adăugarea pulberilor de păducel a manifestat un efect antimicrobian major asupra *S. aureus*.

4.4 Efectul extractului de busuioc microîncapsulat asupra calității și stabilității cremei de brânză

Extractul de busuioc se caracterizează printr-o activitate antioxidantă și antimicrobiană ridicată (Leri et al., 2020; Romano et al., 2022) contribuind la reducerea populației de microorganisme patogene și la extinderea termenului de valabilitate al produselor alimentare perisabile (Fратиanni et al., 2013). Adăugarea directă a plantelor aromatice la produsele alimentare este cea mai comună metodă aplicată în industrie (Eghbal et al., 2022). Însă utilizarea lor este limitată în produsele alimentare deoarece pot afecta negativ caracteristicile senzoriale și fizico-chimice ale produselor (Nwabor et al., 2020), interacționează cu componentele din matricea alimentară (Haratifar et al., 2014) și sunt instabile la variațiile de pH, temperatură, prezență de lumină etc. (Massounga Bora et al., 2018). Necesitatea compușilor bioactivi este, indispensabil, legată de biodisponibilitatea acestora (Soltanzadeh et al., 2021). Microîncapsularea este considerată o tehnologie eficientă care asigură o stabilitate mai mare a compușilor bioactivi în timpul fabricării brânzeturilor, păstrând activitatea lor antioxidantă și antimicrobiană pe toată durata de valabilitate a produselor (Saikia et al., 2015; Gouvea et al., 2017). Recent, a fost raportată activitatea funcțională a compușilor bioactivi din extracte de plante încapsulate în diverse produse lactate, în special brânzeturi și iaurturi (Caleja et al., 2016; El-Messery et al., 2019; Farrag et al., 2020; Soliman et al., 2022). Obiectivul studiului a fost de a evalua activitatea antioxidantă și antimicrobiană a extractului de busuioc (*Ocimum basilicum* L.), eficiența microîncapsulării acestuia și efectul adăugării extractului de busuioc microîncapsulat asupra efectelor senzoriale, fizico-chimice și proprietățile texturale ale cremei de brânză în timpul termenului de valabilitate.

Extractul de busuioc (EB) a fost încapsulat în alginat de sodiu (Alg) folosind tehnica picăturii. Parametrii fizico-chimici ai extractului de busuioc microîncapsulat (MBE) obținut au fost umiditatea – $6,21 \pm 0,08$ %, indicele de umflare – $87,4 \pm 0,4$ % și solubilitatea – $22,1 \pm 1,1$ %. Imaginile extractului de busuioc microîncapsulat (EBM) obținute la microscopul electronic cu scanare (MES) sunt prezentate în figura 4.9.

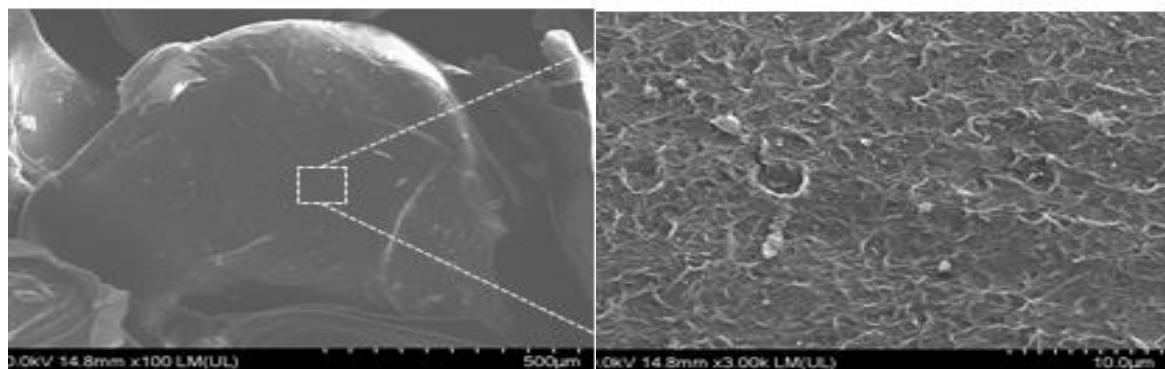


Fig. 4.9 Micrografii MES ale probei de extract de busuioc microîncapsulat.

Analiza imaginilor SEM a arătat că EBM se caracterizează ca microsferă cu suprafață rugoasă. Microsferele au fost deformate ușor în timpul măsurătorilor SEM datorită creării vidului, dimensiunile medii variind de la $0,81 \pm 0,13$ mm până la $1,08 \pm 0,42$ mm. Rezultate similare au fost obținute și de alți autori (Petchsomrit et al., 2013, Yang et al., 2019).

Picurile de absorbție caracteristice Alg (fig. 4.10) pot fi atribuite după cum urmează: 3434 cm^{-1} (vibrații de întindere ale grupurilor -OH), 2924 și 2855 cm^{-1} (vârfulurile de întindere asimetrice și simetrice ale grupelor CH_2), 1624 și 1416 cm^{-1} (picurile de întindere asimetrice și simetrice ale grupelor COO^-), 1301 cm^{-1} (întinderea C-O), 1173 și 1124 cm^{-1} (întinderea C-C), 1095 și 1031 cm^{-1} (întinderea grupelor C-O și C-O-C în unități manuronice și guluronice, respectiv) (Sarker et al., 2014) 946 cm^{-1} (întinderea C-O a inelului piranozic și întinderea C-O cu contribuții în deformarea C-C-H și C-O-H), 818 cm^{-1} (vibrația C-O a grupurilor în configurația α a unităților glucuronice) (Derkach et al., 2019).

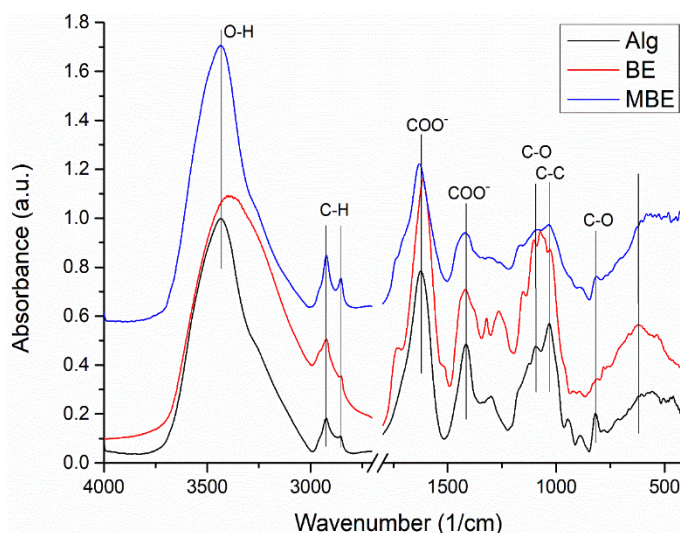


Fig. 4.10 Spectrele FT-IR ale alginatului de sodiu (Alg), extractului de busuioc (BE) și extractului de busuioc microîncapsulat (MBE), domeniu spectral $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ și $2700\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$.

Spectrul infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) al EB (fig. 4.10) a evidențiat benzile de vibrație caracteristice ale grupelor funcționale O-H fenolice la 3395 cm^{-1} , alcanilor C-H la 2851 și 2923 cm^{-1} , grupărilor carbonil -C=O – la 1728 cm^{-1} , alchenelor -C=C- la 1615 cm^{-1} , grupărilor aromatice -C=C- la 1518 cm^{-1} , grupărilor de eter C-O-C la 1265 cm^{-1} , grupărilor alcoolice -C-O la 1154 și 1103 cm^{-1} și grupărilor C-Cl la 622 cm^{-1} (Sukardi et al., 2020).

Spectrul FT-IR al EBM (fig. 4.10) prezintă benzi de absorbție mai largi de intensitate mai mică, dar benzile de vibrație caracteristice Alg și EB se regăsesc în spectru, ușor deplasate. Astfel, întinderea -C=O este deplasată de la 1728 cm^{-1} până la 1740 cm^{-1} , iar -C=C- ale extractului și vibrația -COO- ale alginatului s-au deplasat de la 1615 cm^{-1} până la 1624 cm^{-1} și 1629 cm^{-1} ,

respectiv. Benzile de vibrație ale EB de la 1103 cm⁻¹ și 1072 cm⁻¹ au fost deplasate și apar ca o bandă largă cu un maxim la 1086 cm⁻¹.

Modificările identificate în spectrul EBM în comparație cu spectrele componentelor sale, Alg și EB, pot fi atribuite existenței unor interacțiuni fizice slabe între componente. Prin urmare, prin încapsularea extractului de busuioc cu alginat de sodiu ca material de acoperire, microcapsulele formate pot servi ca purtători de polifenoli pentru alimente.

Spectrul FTIR al MBE (fig. 4.10) prezintă benzi de absorbție mai largi de intensitate mai mică, dar benzile vibraționale caracteristice ambelor componente se regăsesc în spectru, ușor deplasate. Astfel, întinderea -C=O este deplasată de la 1728 cm⁻¹ la 1740 cm⁻¹, iar -C=C- a extractului și vibrația -COO- a alginatului s-au deplasat de la 1615 cm⁻¹ și, respectiv, 1624 cm⁻¹, la 1629 cm⁻¹. Benzile vibraționale ale BE de la 1103 cm⁻¹ și 1072 cm⁻¹ au fost deplasate și apar ca o bandă largă cu un maxim la 1086 cm⁻¹. Modificările identificate în spectrul amestecului MBE (extractului de busuioc microîncapsulat) în comparație cu spectrele componentelor sale, Alg și BE, pot fi atribuite existenței unor interacțiuni fizice slabe între componente. Prin urmare, prin încapsularea extractului de busuioc cu alginat de sodiu ca material de acoperire, microcapsulele formate pot servi ca purtători de polifenoli pentru alimente.

Eficiența de încapsulare a MBE a fost de 78,59 ± 0,01 %, indicând un nivel ridicat de eficiență în procesul de încapsulare. Conform studiilor efectuate de Tomé și colegii (2022) eficiența de încapsulare a extractelor hidroetanolice de busuioc, pătrunjel, rozmarin, cimbru a variat de la 68,24 % la 93,39 %, cu rezultate mai pronunțate pentru rozmarin. Eficiența ridicată de încapsulare a MBE demonstrează formarea de interacțiuni stabile între situsurile reactive ale Alg și BE. Parametrii fizico-chimici ai cremei de brânză fortificate cu MBE în prima zi de depozitare sunt prezentați în tabelul 4.7.

Tabelul 4.7. Parametrii fizico-chimici ai cremei de brânză fortificate cu extract de busuioc microîncapsulat*

Parametrii	Probe				
	CB	0.3% CBMBE	0.6% CBMBE	0.9% CBMBE	1.2% CBMBE
Substanță uscată, %	34,32 ± 0,02	34,50 ± 0,01	34,69 ± 0,02	34,89 ± 0,03	35,09 ± 0,03
Conținut de proteine, %	5,82 ± 0,00	5,78 ± 0,01	5,77 ± 0,01	5,75 ± 0,01	5,73 ± 0,01
Conținut de grăsime, %	23,04 ± 0,00	22,93 ± 0,01	22,86 ± 0,01	22,79 ± 0,01	22,72 ± 0,02

Notă: * CB - cremă de brânză fără extract de busuioc microîncapsulat; CBMBE - cremă de brânză cu extract de busuioc microîncapsulat; mediile a trei încercări ± abaterea standard (p ≤ 0,05)

Parametrii fizico-chimici ai cremei de brânză nu au fost influențați nesemnificativ de adăugarea de MBE. Creșterea concentrației de MBE în cremă de brânză a condus la o scădere ușoară a conținutului de proteine și grăsimi în intervalele de 5,82 – 5,73 % și, respectiv,

23,04 - 22,72 %. Alginatul de sodiu din compoziția MBE a condus la reținerea apei libere și la zăbircirea (smochinirea) conținutului de substanță uscată a probelor de cremă de brânză. Efectul pozitiv al hidrocoloizilor asupra retenției de apă în brânza Labneh fortificată cu extracte de ardei încapsulate în alginat a fost observat și de Balabanova și colab. (2020). Un efect similar a fost raportat anterior în brânzeturile de vaci cu extract de fenicul microîncapsulat (Caleja et al., 2016), brânza moale suplimentată cu compuși fenolici de măsline încapsulate (Farrag et al., 2020) și brânza ultrafiltrată cu extracte fenolice vegetale încapsulate (Soliman et al., 2022).

Evoluția caracteristicilor cremei de brânză fortificată cu extract de busuioc microîncapsulat în timpul depozitării. Proprietățile senzoriale ale cremei de brânză îmbogățită cu MBE, inclusiv aspectul, textura, mirosul, gustul și acceptabilitatea generală, au fost evaluate în timpul de depozitare de 28 de zile la 4 °C, iar rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.8.

Tabelul 4.8. Evoluția proprietăților senzoriale (scor) în cremă de brânză fortificată cu extract de busuioc microîncapsulat, în timpul depozitării.

Proprietăți senzoriale	Durata de depozitare, zile	Probe				
		CB	0,3% CBEBM	0,6% CBEBM	0,9% CBEBM	1,2% CBEBM
Aspect	1	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b
	7	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b
	14	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b
	21	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b
	28	3,53 ± 0,01 ^a	3,60 ± 0,1 ^a	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b	5,00 ± 0,0 ^b
Textura	1	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c
	7	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c
	14	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c
	21	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c
	28	4,42 ± 0,01 ^a	4,69 ± 0,01 ^b	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c	5,00 ± 0,0 ^c
Miros	1	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	4,62 ± 0,02 ^d
	7	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	4,50 ± 0,01 ^c
	14	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	4,42 ± 0,01 ^{b,c}
	21	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	4,12 ± 0,01 ^a
	28	4,48 ± 0,1 ^b	4,62 ± 0,01 ^d	5,00 ± 0,0 ^e	5,00 ± 0,0 ^e	4,10 ± 0,01 ^a
Gust	1	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	4,20 ± 0,01 ^e
	7	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	4,18 ± 0,01 ^{d,e}
	14	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	4,10 ± 0,02 ^d
	21	4,32 ± 0,01 ^f	4,56 ± 0,01 ^g	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	4,00 ± 0,01 ^c
	28	3,60 ± 0,02 ^{a,b}	3,68 ± 0,01 ^b	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	4,00 ± 0,01 ^c
Acceptabilitate totală	1	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	4,71 ± 0,01 ^{d,e}
	7	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	4,67 ± 0,01 ^{d,e}
	14	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	4,63 ± 0,01 ^d
	21	4,83 ± 0,01 ^f	4,89 ± 0,01 ^g	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	4,53 ± 0,01 ^c
	28	4,01 ± 0,01 ^a	4,15 ± 0,01 ^b	5,00 ± 0,0 ^h	5,00 ± 0,0 ^h	4,53 ± 0,01 ^c

Notă: CB—cremă de brânză fără extract de busuioc microîncapsulat; CBMBE—cremă de brânză cu extract de busuioc microîncapsulat; mediile a trei încercări ± abaterea standard ($p \leq 0,05$). Litere diferite (a–g) desemnează rezultate diferite din punct de vedere statistic ($p \leq 0,05$).

Aspectul cremei de brânză în prima zi de depozitare s-a caracterizat printr-o pastă omogenă, ușor gălbuie, fără îndepărtarea zerului, în cazul cremei de brânză fortificată cu MBE — o distribuție uniformă a microcapsulelor în masa cremă de brânză. Toate probele de cremă de brânză au fost evaluate cu 5,00 puncte. Textura CB, precum și cea fortificată cu MBE în prima zi de depozitare, a fost caracterizată de o pastă fină, cremoasă. Adăugarea de extract încapsulat de busuioc de 1,2 % a dat cremei de brânză un miros persistent și un gust de busuioc care s-au intensificat în timpul depozitării, ducând la o scădere a scorului de gust la 4,20.

În a 21-a zi, gustul de CB și 0,3 % CBEBI (cremă de brânză cu extract încapsulat de busuioc) a devenit ușor mai acru și, ca urmare, acceptabilitate totală acumulată a fost de 4,83, respectiv 4,15 puncte. În a 28-a zi de depozitare, textura acestor probe a devenit puțin mai moale, iar la nivel de gust a apărut un gust ușor ranced ca urmare a reacțiilor chimice și oxidative ale lipidelor.

În cazul probelor de 0,6 % CBMBE și 0,9 % CCMBE, nu s-au observat modificări ale calității senzoriale pe parcursul celor 28 de zile de depozitare. Adăugarea de MBE la concentrații mai mari de 0,3 % a avut un impact favorabil asupra stabilității la păstrare a cremei de brânză în comparație cu CB. Acest fapt se datorează stabilității și eliberării treptate a compușilor polifenolici din microcapsule cu efect antioxidant și antimicrobian din brânzeturi (Sturza et al., 2019).

Conform rezultatelor analizei senzoriale, concentrația optimă de MBE în cremă de brânză este în intervalul 0,6 – 0,9 %, un adaos de 0,3 % MBE la cremă de brânză nu asigură o stabilitate suficientă a produsului în timpul depozitării și când concentrația de MBE crește peste 0,9 %, apare un gust rezidual de busuioc chiar și în prima zi de depozitare. Aceste constatări sunt în conformitate cu cele ale studiului efectuat de Azarashkan și colab. (2022), în care s-a demonstrat că fortificarea brânzei ricotta cu extract nano-încapsulat de germen de broccoli nu a avut un efect semnificativ asupra texturii, culorii și mirosului brânzeturilor în prima zi. Cercetările privind efectul fortificării brânzei moale albe cu capsule polifenolice de măslină albă (Farrag et al., 2020) și brânzei ultrafiltrate cu extracte fenolice de sfeclă roșie albă, broccoli și frunze de spanac încapsulate prin coacervare complexă (Soliman et al., 2022) au remarcat că probele fortificate au obținut o acceptabilitate generală mai mare comparativ cu proba martor. Valorile pH-ului cremei de brânză îmbogățite cu extract încapsulat de busuioc în timpul de depozitare de 28 de zile la 4 °C sunt prezentate în tabelul 4.9.

Ulterior, în timpul de păstrare, pH-ul probei de CB martor, cât și al cremei de brânză cu MBE a scăzut treptat. Deși pH-ul inițial al probei martor a fost mai mare decât cel al probelor CBMBE, la sfârșitul depozitării, pH-ul a fost mai mic decât cel al restului probelor. În a 28-a zi de păstrare, valorile pH-ului cremei de brânză au variat între 5,12 (CB) și 5,20 (1,2 % CBMBE).

Adăugarea de MBE în probele de cremă de brânză de la 0,6 la 1,2 % a inhibat procesul de post-fermentare în timpul depozitării, scăderea pH-ului fiind mai evidentă în CB. Prin urmare, MBE previne dezvoltarea microorganismelor în timpul depozitării, ceea ce demonstrează potențialul lor de conservare.

Tabelul 4.9. Evoluția valorii pH cremă de brânză fortificată cu extract de busuioc microîncapsulat în timpul păstrării.

Termen de pastrare zile	Probe				
	CB	0.3% CBMBE	0.6% CBMBE	0.9% CBMBE	1.2% CBMBE
1	5,41 ± 0,0 ^h	5,35 ± 0,01 ^g	5,31 ± 0,01 ^f	5,30 ± 0,02 ^{e,f}	5,26 ± 0,01 ^d
7	5,41 ± 0,0 ^h	5,34 ± 0,01 ^g	5,30 ± 0,01 ^{e,f}	5,28 ± 0,01 ^{d,e}	5,24 ± 0,02 ^{c,d}
14	5,35 ± 0,01 ^g	5,31 ± 0,01 ^f	5,30 ± 0,01 ^{e,f}	5,27 ± 0,02 ^{d,e}	5,21 ± 0,01 ^{b,c}
21	5,24 ± 0,01 ^{c,d}	5,27 ± 0,01 ^{d,e}	5,28 ± 0,01 ^{d,e}	5,26 ± 0,01 ^d	5,21 ± 0,01 ^{b,c}
28	5,12 ± 0,01 ^a	5,19 ± 0,01 ^b	5,27 ± 0,01 ^{d,e}	5,25 ± 0,01 ^{c,d}	5,20 ± 0,01 ^b

Notă: CB—cremă de brânză fără extract de busuioc microîncapsulat; CBMBE—cremă de brânză cu extract de busuioc microîncapsulat. Valorile din tabel reprezintă mediile a trei încercări replicate ± abaterea standard. Litere diferite (a–h) desemnează rezultate diferite din punct de vedere statistic ($p \leq 0,05$).

În mod similar, Weragama et al. (2021) au observat că crema de brânză netratată a prezentat valori mai scăzute ale pH-ului în comparație cu mostrele de brânzeturi cremă fortificate cu pulbere din frunze uscate de curry (*Murraya koenigii* L.) în timpul păstrării. Azarashkan și colab. (2022) au raportat că valoarea pH-ului probelor de brânză ricotta cu extract de germen de broccoli nano-încapsulat a fost mai mare decât cea a matorului. În studiul lui Balabanova și colab. (2020), încorporarea extractelor de ardei încapsulate în brânza Labneh nu a arătat un efect semnificativ asupra pH-ului probelor.

Analiza profilului texturii (APT) a fost determinată de tipul de brânză și a corespuns caracteristicilor sale senzoriale (Soodam et al., 2015).

Tabelul 4.10 prezintă parametrii de textură (duritate, elasticitate, coezivitate, adezivitate și gumozitate) ai cremei de brânză analizate în timpul de depozitare de 28 de zile la 4 °C.

Tabelul 4.10 Evoluția parametrilor de textură a cremei de brânză fortificată cu extract de busuioc microîncapsulat în timpul păstrării.

Parametrii de textură	Durata de depozitare, zile	Probe				
		CB	0,3% CBEBM	0,6% CBEBM	0,9% CBEBM	1,2% CBEBM
Fermitate, g	1	1914,1 ± 43,5 ^b	1914,8 ± 34,1 ^b	1913,5 ± 28,6 ^b	1891,2 ± 10,2 ^b	1439,8 ± 42,3 ^a
	7	2951,8 ± 60,2 ^e	2568,8 ± 25,2 ^d	2476,1 ± 25,4 ^d	2405,1 ± 27,8 ^c	1960,9 ± 52,3 ^b
	14	4123,5 ± 32,5 ^{h,i}	2807,2 ± 19,7 ^e	2637,3 ± 32,5 ^d	2506,9 ± 31,5 ^d	2034,01 ± 39,6 ^b
	21	4180,3 ± 22 ⁱ	3254,3 ± 26,8 ^f	2962,4 ± 31,6 ^e	2960,8 ± 26,8 ^e	2502,2 ± 44,3 ^d
	28	2424,6 ± 17,4 ^c	3512,01 ± 35,6 ^g	3280,9 ± 18,8 ^f	3225,6 ± 34,4 ^f	3016,9 ± 36,8 ^{e,f}

Continuare tabelul 4.10

Elasticitate, %	1	1,001 ± 0,0001 ^b	1,000 ± 0,0001 ^a	1,000 ± 0,0001 ^a	1,002 ± 0,0001 ^c	1,000 ± 0,0001 ^a
	7	1,000 ± 0,0001 ^a	1,001 ± 0,0001 ^b	1,000 ± 0,0001 ^a	1,001 ± 0,0001 ^b	1,002 ± 0,0001 ^c
	14	1,001 ± 0,0001 ^b	1,001 ± 0,0001 ^b	1,001 ± 0,0001 ^b	1,002 ± 0,0001 ^c	1,000 ± 0,0001 ^a
	21	1,001 ± 0,0001 ^b	1,001 ± 0,0001 ^b	1,001 ± 0,0001 ^b	1,001 ± 0,0001 ^b	1,000 ± 0,0001 ^a
	28	1,001 ± 0,0001 ^b	1,001 ± 0,0001 ^b	1,001 ± 0,0001 ^b	1,001 ± 0,0001 ^b	1,001 ± 0,0001 ^b
Coezivitate, %	1	0,462 ± 0,008 ^h	0,476 ± 0,004 ⁱ	0,489 ± 0,009 ⁱ	0,534 ± 0,004 ^j	0,568 ± 0,002 ^k
	7	0,214 ± 0,005 ^{b,c}	0,295 ± 0,004 ^d	0,315 ± 0,007 ^e	0,390 ± 0,004 ^g	0,386 ± 0,006 ^{f,g}
	14	0,148 ± 0,006 ^a	0,241 ± 0,007 ^c	0,313 ± 0,009 ^e	0,360 ± 0,009 ^f	0,367 ± 0,008 ^f
	21	0,199 ± 0,007 ^b	0,204 ± 0,009 ^b	0,245 ± 0,006 ^c	0,282 ± 0,006 ^d	0,307 ± 0,005 ^e
	28	0,327 ± 0,007 ^e	0,202 ± 0,005 ^b	0,210 ± 0,005 ^{b,c}	0,247 ± 0,005 ^c	0,279 ± 0,007 ^d
Adezivitate, g·s	1	2252,0 ± 26,7 ^{c,d}	2217,0 ± 31,2 ^c	2216,2 ± 29,7 ^c	2134,5 ± 26,3 ^c	1648,3 ± 35,4 ^a
	7	3589,8 ± 30,2 ^h	3048,8 ± 25,7 ^f	2914,6 ± 32,3 ^f	2772,6 ± 34,7 ^e	2276,0 ± 18,0 ^d
	14	4833,9 ± 5,2 ^k	3175,4 ± 34,8 ^g	3104,8 ± 24,8 ^{f,g}	2821,7 ± 29,8 ^{e,f}	2336,0 ± 22,4 ^d
	21	4903,0 ± 18,6 ^k	3895,1 ± 28,6 ⁱ	3606,3 ± 27,5 ^h	3125,6 ± 25,5 ^{f,g}	2841,6 ± 32,6 ^{e,f}
	28	1929,6 ± 35,6 ^b	4079,9 ± 31,9 ^j	3916,5 ± 31,7 ⁱ	3841,4 ± 31,3 ⁱ	3318,4 ± 25,1 ^g
Gumozitate, %	1	884,3 ± 6,7 ⁱ	888,8 ± 10,2 ⁱ	897,8 ± 9,7 ⁱ	935,7 ± 10,9 ^j	1009,9 ± 7,6 ^l
	7	631,7 ± 8,5 ^{a,b}	756,9 ± 11,3 ^e	757,8 ± 9,6 ^e	927,2 ± 9,6 ^j	980,0 ± 11,5 ^{k,l}
	14	618,5 ±8,6 ^{a,b}	673,7 ± 9,1 ^c	752,6 ± 9,4 ^e	902,5 ± 11,7 ^{i,j}	923,7 ± 10,5 ^j
	21	611,9 ± 9,2 ^a	663,9 ± 10,6 ^{b,c}	725,8 ± 11,5 ^{d,e}	834,9 ± 9,2 ^{g,h}	899,1 ± 11,3 ⁱ
	28	792,8 ± 10,1 ^f	634,9 ± 11,9 ^{a,b}	717,1 ± 10,1 ^d	819,3 ± 10,3 ^g	843,4 ± 12,4 ^{g,h}

Notă: CB – cremă de brânză, CBEEM - cremă de brânză cu extract de busuioc microincapsulat. Valorile din tabel reprezintă mediile a trei încercări replicare ± abaterea standard. Litere diferite (a–h) desemnează rezultate diferite din punct de vedere statistic ($p \leq 0,05$).

Compoziția chimică a brânzeturilor este unul dintre factorii importanți care afectează proprietățile texturale a acestora (Farrag, 2020). Un alt factor care a afectat proprietățile texturale ale brânzeturilor a fost pH-ul. În acest sens, Soodam et al. (2015) a determinat că duritatea cașului obținut prin coagulare sub acțiunea chimozinei la pH 6,5 a fost mai mare decât a celui obținut la pH 6,1. În acest studiu, creșterea concentrației de adaos de EBM în cremă de brânză a condus la o ușoară reducere a conținutului de proteine, grăsime și a pH-ului și, ca urmare, scăderea fermității

și a adezivității creimei de brânză fortificate, variind de la 1914,1 g (CB) până la 1439,8 g (1,2 % CBEBM) și, respectiv, de la 2252,0 g·s (CB) până la 1648,4 g·s (1,2 % CBEBM).

Odată cu creșterea concentrației de EBM în crema de brânză, s-a constatat și o creștere a coezivității și gumozității, de la 0,462 % (CB) până la 0,568 % (1,2 % CBEBM) și de la 884,3 % (CB) până la 1009,9 % (1,2 % CBEBM). Adăugarea de EBM la crema de brânză nu a influențat elasticitatea creimei de brânză analizate. Rezultate similare au fost obținute și la fortificarea brânzei ricotta cu extract nano-încapsulat de germen de broccoli (Azarashkan, 2022), brânzei feliate cu conținut scăzut de grăsimi cu acoperiri comestibile pe bază de nanoemulsii care conțin ulei esențial de oregano și fibre alimentare de mandarin (Artiga-Artigas, 2017) și brânzeturi proaspete cu microcapsule sau nanoemulsii cu *Opuntia oligacantha* (Pérez-Soto, 2021).

Pe parcursul perioadei de păstrare de 28 de zile, fermitatea și adezivitatea creimei de brânză analizate au înregistrat o creștere esențială, iar coezivitatea și gumozitatea probelor au scăzut treptat, cu excepția probei CB, care în a 28-a zi de depozitare, a înregistrat un depreciere a parametrilor de textură. Îmbunătățirea parametrilor de textură a probelor de cremă de brânză fortificată se datorează probabil capacității mai bune de reținere a apei în probele de cremă de brânză fortificată prin adăugarea de EBM în comparație cu crema de brânză fără adaosuri. Parametrii de textură, cu excepția elasticității, au fost influențați de creșterea concentrației de EBM din probe. În perioada de depozitare de 28 zile, în cazul probei 0,9 % CBEBM, fermitatea și adezivitatea au crescut de la 1891,2 g până la 3225,6 g și, respectiv, de la 2134,5 g·s până la 3841,4 g·s. Cu toate acestea, coezivitatea și gumozitatea au scăzut de la 0,534 % până la 0,247 % și, respectiv, de la 935,7 % până la 819,3 %. Parametrii de textură a probelor de cremă de brânză cu adaos de EBM au fost în corelație cu proprietățile senzoriale (tabelul 4.9) și cu valorile pH-ului (tabelul 4.8). Adăugarea a 0,6 - 0,9 % EBM în crema de brânză a determinat inhibarea procesului de post-fermentare, îmbunătățirea gradului de retenție a apei și a parametrilor texturali ai creimei de brânză, contribuind astfel la prelungirea termenului de valabilitate al creimei de brânză cu 7 zile față de proba martor.

Proba de 1,2 % CBEBM a demonstrat parametrii de textură înalți, dar din punct de vedere senzorial, a fost evaluată cu un punctaj mai scăzut datorită gustului prea pronunțat de busuioc. Un adaos de 0,3 % EBM la crema de brânză nu asigură o stabilitate suficientă a produsului în cele 28 zile de depozitare. Prin urmare, microcapsulele pe bază de alginat de sodiu au asigurat stabilitatea compușilor polifenolici și bioactivi ai extractului de busuioc și, în acest fel, au condus la eliberarea controlată a compușilor funcționali din cremă de brânză în timpul depozitării.

Modelarea matematică. Măsurarea influenței duratei de păstrare și a concentrațiilor de EBM în crema de brânză asupra parametrilor de textură, valorilor pH-ului și a analizei senzoriale

(acceptabilitatea totală) a fost evaluată prin analiza informațiilor mutuale. Această metodă de modelare matematică a fost aplicată și în studiul influenței duratei de păstrare și a concentrației tescovinei de mere asupra parametrilor texturali și a acceptabilității totale a iaurtului timp de 20 de zile (Popescu, 2022). Studiul influenței indicatorilor fizico-chimici de calitate asupra caracteristicilor de textură ale cărnii de bovină maturate prin uscare timp de 35 de zile și a concentrațiilor de cătină și măceș asupra calității produselor făinoase a fost, de asemenea, evaluat prin aplicarea analizei informațiilor mutuale (Ghendov-Moșanu, 2020; Bulgaru, 2022).

Tabelul 4.11 demonstrează analiza mutuală a influenței duratei de păstrare asupra parametrilor de textură (adezivitate, coezivitate, fermitate, gumozitate, elasticitate), pH-ului și acceptabilității totale a probelor de cremă de brânză.

Se constată că durata de păstrare a probelor de cremă de brânză cu diferite concentrații de adaos de EBM nu a influențat în mod semnificativ acceptabilitatea totală (0,078 biți), parametrii de textură (elasticitatea - 0,023 biți) și pH-ul (0,001 biți). Cele mai mari valori de analiză a informațiilor pentru caracteristicile de textură au fost obținute pentru fermitate (0,422 biți), urmată de coezivitate (0,348 biți), adezivitate (0,311 biți) și gumozitate (0,125 biți).

Concentrația de EBM adăugată la probe a influențat pH-ul (0,659 biți), parametrul de textură - gumozitatea (0,416 biți) și acceptabilitatea totală a cremei de brânză (0,331 biți). În cazul celorlalte caracteristici de textură (adezivitate, coezivitate, fermitate și elasticitate) influența concentrației de EBM nu a fost semnificativă.

Tabelul 4.11. Analiza informațională a influenței duratei de păstrare și a concentrației de extract de busuioc microîncapsulat asupra parametrilor de textură, pH-ului și acceptabilității totale a probelor de cremă de brânză

Parametrii	Durata de păstrare, zile	Concentrația extractului de busuioc microîncapsulat
Fermitatea, g	0,422	0,001
Elasticitatea, %	0,023	0,001
Coezivitatea, %	0,348	0,001
Adezivitatea, g·s	0,311	0,022
Gumozitatea, %	0,125	0,416
pH-ul	0,001	0,659
Acceptabilitatea totală	0,078	0,331

Astfel, adăugarea de 0,6 - 0,9 % EBM în cremă de brânză a inhibat procesul de post-fermentare, a îmbunătățit gradul de retenție al apei și a îmbunătățit parametrii texturali ai cremei de brânză, contribuind astfel la prelungirea termenului de valabilitate a produsului cu 7 zile comparativ cu proba martor. Microcapsulele pe bază de alginat de sodiu au asigurat stabilitatea compușilor polifenolici ai extractului de busuioc și au dus la eliberarea controlată a acestora în crema de brânză în timpul depozitării.

4.5. Evaluarea *in situ* a acțiunii antimicrobiene a unor extracte și pulberi vegetale în înghețată

Activitatea antimicrobiană a extractelor de plante stă la baza potențialei lor aplicații în agenți de conservare a alimentelor, produse farmaceutice, cosmetice, medicamente alternative și terapii naturale (Kunová et al., 2019). Înghețata este un aliment popular în rândul populației generale, în special în rândul copiilor, iar consumul de înghețată a crescut în ultimele două decenii. Înghețata este preparată din apă potabilă, zahăr, produse lactate, produse din ouă, produse din fructe, fasole, grăsimi comestibile și uleiuri ca materii prime principale. Sezoanele de vârf de producție și consum pentru înghețată sunt vara și toamna, când vremea este caldă. Pasteurizarea elimină majoritatea agenților patogeni din premixul de înghețată în stadiul incipient al producției. Agenții patogeni pot apărea în continuare în produsele finale prin adăugarea de ingrediente sau din cauza manipulării necorespunzătoare în timpul etapelor ulterioare de procesare după pasteurizare.

În cadrul cercetării a fost obținută înghețată cu valoare biologică sporită, fără coloranți și arome sintetice, cu utilizarea materiei prime vegetale autohtone – pulberilor din fructe de pădure cu grad de dispersie înalt (dimensiunile particulelor 10-70 μm), ceea ce împiedică aglomerarea în timpul depozitării, extracte hidroalcoolice de aronia sau păducel și extracte liposolubile de măceșe sau cătină albă (Popescu et al., 2020).

Caracteristicile senzoriale și fizico-chimice ale înghețatei cu adaos de pudră și extracte de fructe de pădure sunt prezentate în tabelul 4.12.

Tabelul 4.12. Caracteristici senzoriale și fizico-chimice ale înghețatei cu adaos de pulberi și extracte de fructe de pădure

Indicator de calitate	Probele			
	ÎPEHA	ÎPEHP	ÎPELM	ÎPELCA
Aspect, culoare	Suprafață uniformă, cu pori fini, omogenă, fără cristale vizibile, culoarea violetă caracteristică fructelor de aronia	Suprafață cu pori fini, uniformă, omogenă, fără cristale vizibile, culoarea de la bej deschis până la bej închis caracteristică de păducel	Suprafață uniformă, cu pori fini, omogenă, fără cristale vizibile, culoarea roz -pal caracteristică fructelor de măceșe	Suprafață uniformă, cu pori fini, omogenă, fără cristale vizibile, culoarea galbenă-portocalie caracteristică cătinei albă
Consistență	Pentru toate probele analizate consistența a fost fină, omogenă în întreaga masă, fără cristale de gheață, fără aglomerări de grăsime, stabilizator			
Miros și gust	Plăcut, bine exprimat, caracteristic adaosului introdus.	Plăcut, bine exprimat, caracteristic adaosului introdus.	Plăcut, ușor acrișor, bine exprimat, caracteristic adaosului introdus.	Plăcut, bine exprimat, caracteristic adaosului introdus.
	Fără miros și gust străin			

Continuare tabelul 4.12

Conținut de grăsime, %	10,0	10,0	10,0	10,0
Conținut de zahăr, %	13,0	13,0	13,0	13,0
pH	6,25	6,68	6,11	5,70
Vâscozitate, la temperatura 4 °C, mPa·s	1877	1579	1920	1621
Capacitate de aerare, %	54	54	57	57
Timp final de topire, min	30	31	22	24
Activitate antioxidantă, %	59,10	54,04	77,89	57,09

Notă: ÎPEHA - înghețată cu adaos de pudră și extract hidroalcoolic de aronia, ÎPEHP - înghețată cu adaos de pudră și extract hidroalcoolic de păducel, ÎPELM - înghețată cu adaos de pudră și extract liposolubil de măceșe și ÎPELCA - înghețată cu adaos de pudră și extract liposolubil de cătină albă.

Înghețata cu adaos de pudră și extracte de fructe de pădure s-a caracterizat prin gust plăcut, culoare caracteristică fructului introdus, proprietăți reologice înalte, exprimate prin valori mai ridicate ale vâscozității de 0,2-0,15 ori comparativ cu înghețata fără adaosuri și prin timp mai lung de topire, în special al înghețatei cu pudră de aronia și extract hidroalcoolic de aronia și al înghețatei cu pudră de păducel și extract hidroalcoolic de păducel. Capacitatea antioxidantă ale înghețatei cu fructe de pădure a crescut de 6,3-9,5 ori comparativ cu înghețata fără adaosuri.

Microorganismele din înghețată, teoretic, nu cresc în condiții de congelare, dar se pot multiplica în timpul transportării, depozitării și distribuției din cauza implementării inadecvate a „lanțului de congelare a înghețatei”. În consecință, ingestia unei înghețate contaminate prezintă un risc pentru populație. Printre ingredientele crude, laptele și smântâna sunt sursa probabilă de *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Dublin, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* și *Yersinia enterocolitica*. Îndulcitorii, contribuie la contaminarea cu *E. coli* și *Salmonella*. Ouăle și produsele din ouă sunt surse pentru *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp. (Lin et. al., 2022).

Probele de înghețată la au fost infectate cu culturi standarde *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Abony ATCC 6017 și *Escherichia coli* ATCC 25922 după ce au fost incubate în termostat la temperatura de 37 °C pentru 24-48 de ore. Peste 24 și respectiv 48 de ore de incubare am efectuat diluții în soluție fiziologică sterilă, după care am repicat câte 2 picături pe mediu în plăci. Plăcile s-au incubat timp de 24 de ore la temperatura de 37 °C.

Rezultatele experimentale, care reflectă efectul antibacterian și capacitatea inhibitorie a unor extracte din fructe de pădure încorporate în înghețată sunt prezentate în tabelul 4.11. Probele de înghețată la au fost infectate cu culturi standarde *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Abony ATCC 6017 și *Escherichia coli* ATCC 25922 după ce au fost incubate în

termostat la temperatura de 37 °C pentru 24-48 de ore. Peste 24 și respectiv 48 de ore de incubare s-au efectuat diluții în soluție fiziologică sterilă, după care s-au repicat câte 2 picături pe mediu în plăci. Plăcile s-au incubat timp de 24 ore la 37 °C. Rezultatele monitorizării creșterii microbiene în probele de înghețată cu adaos de pulberi de fructe de pădure sunt prezentate în tabelul 4.13.

Rezultatele au fost interpretate prin numărarea coloniilor crescute pe placa de mediu. Cea mai pronunțată activitate antimicrobiene poate fi considerată pentru microorganismele Gram pozitive (*Staphylococcus aureus*). Efectul preparatelor naturale cu conținut de extracte din fructe de pădure (extracte hidroalcoolice de aronia sau păducel și extracte liposolubile de măceșe sau cătină albă) incorporate în înghețată asupra microorganismele Gram negative a fost mai diminuat în comparație cu efectul acestora asupra bacteriilor Gram pozitive.

Tabelul 4.13. Monitorizarea creșterii microbiene în probele de înghețată cu adaos de pulberi de fructe de pădure

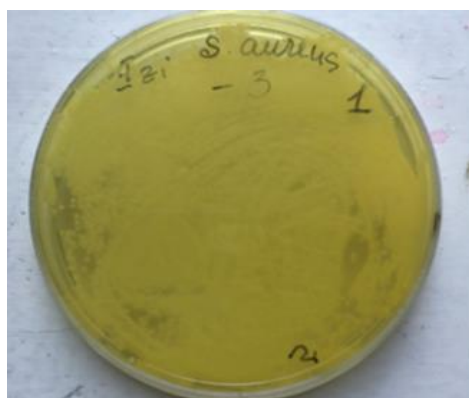
Proba	Diluția	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, UFC		<i>Salmonella</i> Abony ATCC 6017, UFC		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, UFC	
		24 ore	48 ore	24 ore	48 ore	24 ore	48 ore
1	10 ⁻³	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10 ⁻⁶	424	560	952	818	520	942
2	10 ⁻³	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10 ⁻⁶	320	138	432	312	>1000	360
3	10 ⁻³	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10 ⁻⁶	104	344	728	1000	312	688
4	10 ⁻³	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10 ⁻⁶	37	410	744	336	584	900
5	10 ⁻³	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10 ⁻⁶	84	82	735	408	408	736
6	10 ⁻³	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10 ⁻⁶	104	536	256	508	378	544
7	10 ⁻³	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10 ⁻⁶	812	>1000	284	>1000	352	>1000
8	10 ⁻³	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10 ⁻⁶	232	>1000	318	992	842	432
9	10 ⁻³	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10 ⁻⁶	348	450	486	>1000	916	>1000

Continuare tabelul 4.13

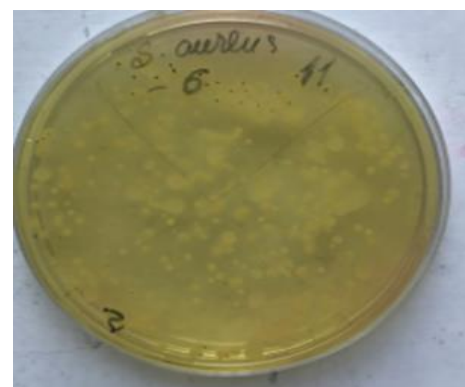
10	10^{-3}	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10^{-6}	384	812	300	830	945	>1000
11	10^{-3}	>1000	difuz	>1000	difuz	850	difuz
	10^{-6}	110	184	368	600	316	448
12	10^{-3}	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	Difuz
	10^{-6}	696	202	736	difuz	408	820
13	10^{-3}	>1000	difuz	>1000	difuz	>1000	difuz
	10^{-6}	280	368	296	difuz	244	865

Notă: Difuz - creștere difuză pe placă, UFC - unități formatoare de colonii, > -numărul coloniilor depășește 100. Probe de înghețată: 1-proba martor; 2-pulbere de măceșe, 0,75%; 3- pulbere de cătină, 0,75%; 4- pulbere de aronia, 0,75%; 5- pulbere de păducel, 0,75%; 6- ELPS de măceșe, 2 %; 7- ELPS de cătină, 2 %; 8- ELPS de aronia, 2 %; 9- ELPS de păducel, 2%; 10-EHA de măceșe, 0,75%; 11-EHA de cătină, 0,75%; 12- EHA de aronia, 0,75%; 13--EHA de păducel, 0,75%.

O activitate mai ridicată, peste 24 de ore de incubare, a fost înregistrată pentru probele 3; 4; 5; 6 și 11. Mai puțin active au fost probele 12 și 7. După 48 de ore de incubare, în probele 2 și 12 numărul de microorganisme s-a micșorat, iar în proba 5 – numărul de microorganisme a rămas același. În restul probelor numărul de microorganisme s-a mărit în comparație cu I zi (fig. 4.11).



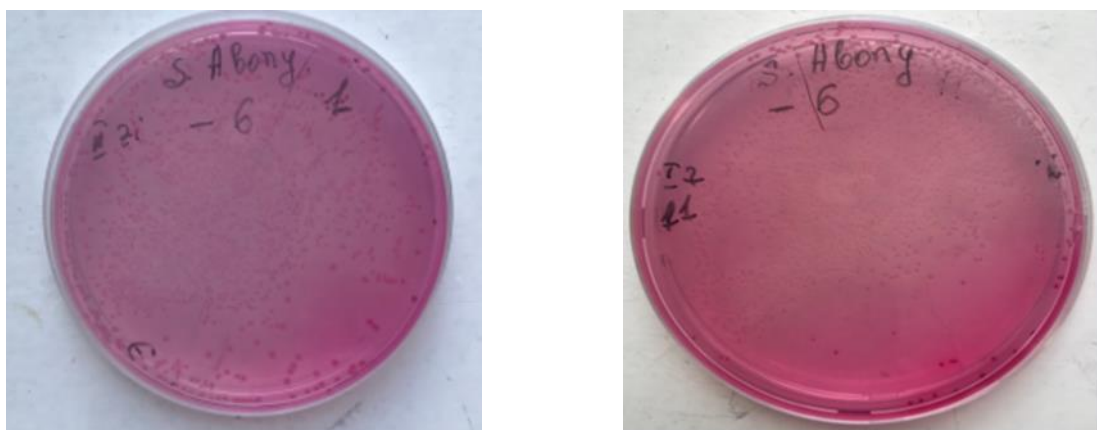
a)



b)

Fig. 4.11 Efectul pulberilor încorporate în înghețată asupra *S. aureus*: a) proba martor; b) proba 11.

Asupra tulpinilor Gram negative acțiunea s-a dovedit a fi mai redusă. Pentru tulpinile de *Salmonella* Abony, un număr mai mic de colonii a fost înregistrat în probele 6; 13; 7; 11 și 8. Bacteriile s-au dezvoltat mai activ în probele 12; 4 și 3. După incubare timp de 48 de ore, numărul de microorganisme s-a micșorat, comparativ cu I zi, în probele 2; 3; 4 și 5. În restul probelor numărul de microorganisme s-a mărit (fig. 4.12).



a)

b)

Fig. 4.12 Efectul pulberilor încorporate în înghețată asupra *S. Abony*: a) proba martor; b) proba 11.

Tulpinile de *E. coli* s-au dezvoltat mai puțin în probele 13; 11; 7; 3 și 6. O dezvoltare mai intensă s-a înregistrat în probele 2; 12; 10 și 9. După 48 ore de incubare o scădere a numărului de colonii s-a înregistrat în probele 2 și 8, în restul probelor numărul de microorganisme a crescut.

Pulberile de plante investigate au arătat un potențial antimicrobian promițător împotriva microorganismelor patogene și pot fi utilizate în industria alimentară pentru a reduce contaminarea microbiană a materiilor prime și a alimentelor.

4.6 Concluzii la capitolul 4

1. Conform rezultatelor obținute s-a demonstrat, că probele ce conțin adaos de măceș și păducel au capacitate mai mare de-a inhiba dezvoltarea tulpinilor testate în comparație cu proba martor. Probele ce conțin păducel au demonstrat un efect mai pronunțat de inhibiție a creșterii asupra tulpinilor de *S. aureus* ATCC 25923. Probele cu adaos de fructe de pădure au efect mai diminuat asupra tulpinilor de bacterii Gram negative ce au fost luate în studiu, preponderent asupra tulpinelor de *S. Abony* ATCC 6017.

2. Analizând fazele de creștere a unor microorganisme patogene și efectul pulberilor vegetale asupra lor, am observat că adaosul de măceș și păducel în rețeta de fabricare a crenvurștilor poate ține sub control rata de creștere a acestor microorganismelor. Acest fapt a fost constatat prin evaluarea multiplicării unor tulpini de microorganisme ca *S. aureus* ATCC 25923, *S. Abony* ATCC 6017, *K. pneumoniae* ATCC 13883 și *E. coli* ATCC 25922. Prin studierea fazei Lag și fazei Logaritmice de creștere a tulpinelor microbiene patogene s-a constatat că păducelul are un efect bacteriostatic mai mare asupra tulpinelor de *S. aureus* ATCC 25923 și *E. coli* ATCC 25922, iar măceșul are un efect bacteriostatic mai înalt asupra tulpinelor de *S. Abony* ATCC 6017 și *K. pneumoniae* ATCC 13883.

3. Crenvurști cu adaos de busuioc, cimbruși tarhon au fost testați microbiologic pentru investigarea numărului total de microorganisme aerobe mezofile și bacterii alterante. Conform rezultatelor obținute după 24, 96, 168 ore de la fabricație, toate probele corespund indicatorilor microbiologici standard; nu au fost detectate bacterii coliforme, *S. aureus* sau *Salmonella* spp. NMMAFA în probele cu aditivi vegetali în diferite concentrații este mult mai mică în comparație cu proba martor.

4. Crenvurștii cu extracte au îmbunătățit calitatea microbiană a produselor în timpul incubării pe o perioadă de 24 și 48 ore. Analiza microbiană a crenvurștilor cu adaosuri de extracte denotă o capacitate de inhibare a tulpinilor microbiene mai pronunțată în comparație cu proba martor. Crenvurștii cu conținut de busuioc au demonstrat o capacitate vădită de inhibare a *E. coli*, toate concentrațiile. Asupra *S. Abony* au avut un efect mai moderat. În concluzie se atestă o activitate antimicrobiană practic echitabilă a crenvurștilor cu adaos de extracte, cu un efect moderat pronunțat acrevurștilor cu conținut de cimbru. O activitate mai pronunțată asupra tuturor bacteriilor testate a fost remarcată în crenvurștii cu concentrația de 0,3 %.

5. Crema de brânză a fost supusa analizelor pentru determinarea NGMAFA și altor microorganisme patogene. Toate probele corespund standardelor în vigoare. În proba de control s-a determinat un număr mai mare de colonii pe plăci pentru tulpinile testate. Efect relevant asupra tulpinilor de referință, în mod special asupra *E. coli* au avut probele cu măceșe și cătină. Probele cu păducel și aronia au demonstrat activitate nesemnificativ mai redusă în comparație cu măceșe și cătină.

6. Microîncapsularea EB în alginat de sodiu a permis obținerea EBM cu următoarele caracteristici: umiditate - 6,21 %, indice de umflare - 87,4 % și solubilitate - 22,1 %. Spectroscopia FT-IR a demonstrat existența unor interacțiuni fizice slabe între componente. Eficiența de încapsulare a EBM a fost de 78,59 %, ceea ce arată că microcapsulele formate pot servi ca purtători de polifenoli pentru alimente. Proprietățile senzoriale ale cremei de brânză fortificate cu EBM, inclusiv aspectul, textura, mirosul, gustul și acceptabilitatea generală au fost evaluate pe o perioadă de depozitare de 28 zile la temperatura de 4 °C. Concentrația optimă de EBM în crema de brânză este în intervalul 0,6-0,9 %.

7. Adăugarea de EBM a condus inițial la o scădere a pH-ului, dar la sfârșitul depozitării, pH-ul probelor cu EBM a fost mai mare decât al probelor martor, ceea ce confirmă potențialul de conservare al EBM datorită inhibării microorganismelor. După 28 de zile de depozitare, fermitatea și adezivitatea cremei de brânză au prezentat o creștere esențială, iar coeziunea și gumozitatea probelor au scăzut treptat. Îmbunătățirea parametrilor de textură se datorează probabil capacității mai bune de reținere a apei a cremă de brânză fortificată cu EBM.

8. Măsură influenței duratei de depozitare și concentrațiilor de EBM care a fost adăugat la probele de cremă de brânză asupra parametrilor de textură, valorilor pH-ului și analizei senzoriale (acceptabilitatea generală) a fost evaluată prin analiză reciprocă a informațiilor. În special, concentrația de EBM a influențat pH-ul, parametrul textural - gumozitatea - și acceptabilitatea generală a produsului.

9. Adăugarea de 0,6-0,9 % EBM în cremă de brânză a inhibat procesul de post-fermentare, a îmbunătățit gradul de retenție al apei și a îmbunătățit parametrii texturali ai cremei de brânză, contribuind astfel la prelungirea termenului de valabilitate a produsului cu 7 zile comparativ cu proba martor. Microcapsulele pe bază de alginat de sodiu au asigurat stabilitatea compușilor polifenolici ai extractului de busuioc și au dus la eliberarea controlată a acestora în crema de brânză în timpul depozitării.

10. Acțiunea antimicrobiană a unor extracte și pulberi din fructe de pădure în înghețata inoculată cu culturi de *S. aureus*, *S. Abony* și *E. coli* a fost mai pronunțată față de microorganismele Gram pozitive (*S. aureus*); față de tulpinile de *S. Abony* și *E. coli* s-a atestat un impact moderat.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

1. Extractele și pudrele de cătină, măceșe și tescovină de struguri roșii au manifestat activitate inhibitorie înaltă față de bacteriile *L. monocytogenes* ATCC 19118. Pulberile de măceșe posedă activitate antimicrobiană foarte înaltă față de *S. aureus* ATCC 25923 și *B. subtilis* ATCC 6633. Tulpinile de bacterii Gram negative sunt mai puțin sensibile la efectul pulberilor vegetale în comparație cu bacteriile Gram pozitive (Ghendov-Moșanu et al., 2018; Cojocari et al., 2019; Cojocari et al., 2021; Sturza et al., 2021).

2. A fost testată activitatea antimicrobiană a pulberilor și extractelor din soiurile noi de cătină albă din Republica Moldova (R1, R2, R4, R5, C6, AGG, AGA, Pomona, Mr. Sandu, Seirola) asupra bacteriilor Gram negative, Gram pozitive și levurilor. Efect antibacterian au demonstrat toate soiurile de cătină. Efectul antibacterian a fost analizat și după o perioadă de păstrare (prin congelare) timp de doi ani. Soiurile de cătină și-au păstrat activitatea, cu o ușoară diminuare a activității microbiostatice asupra tulpinilor testate. (Sandulachi et al., 2021; Sandulachi et al., 2022).

3. Extractele de rozmarin, busuioc și cimbru au manifestat activitate antimicrobiană largă, împiedicând proliferarea atât a speciilor bacteriene Gram pozitive, cât și a celor Gram negative, precum și a levurilor. Extractele de rozmarin și busuioc au demonstrat cea mai înaltă activitate asupra tuturor tulpinilor luate în studiu, ceea ce evidențiază potențialul acestor extracte ca agenți antimicrobieni naturali cu aplicații diverse în conservarea alimentelor (Cojocari et al., 2021; Popescu et al., 2021; Macari et al., 2021).

4. A fost analizată compoziția polifenolilor individuali din fructe de pădure, tescovină de struguri și plante aromatice (busuioc), Extractele de tescovină de struguri conțin cantități semnificative de procianidină B2, acid galic, catehină, procianidina B1, acidul ferulic și esterul său metilic. Fructele de cătină conțin cantități semnificative de acid salicilic, hiperozidă, acizi ferulic și clorogenic, esterii lor, polidatină, cis- și trans- resveratrol. Extractele din măceșe au cantități importante de derivați ai acizilor hidroxibenzoici (salicilic, galic, protocatehic), hidroxicinamic (ferulic), flavone (catehină, epicatehină), flavonoide (procianidină B2 și procianidină B1). Extractele de aronia conțin catechină, epicatechină, acizi hidroxibenzoici, hidroxicinamici și derivații lor, în special acizii galic, para- și metabenzoic, procianidină B1 și B2. Extractele de busuioc conțin cantități importante de acizi fenolici (metil-rosmarinat, acid rosmarinic, rosmadial, carnosol, acid dehidrodiferulic și acid cicoric) și flavonoide (luteo-linglucozidă, querectin-rutinozidă și epigallocatechină).

5. A fost testată activitatea antioxidantă a extractelor de fructe de pădure (cătină, măceșe, aronia) și tescovină de struguri pentru diferite grade de diluție (1:1–1:8). S-a constatat, că deși la

scăderea concentrației compușilor biologic activi se atestă reducerea AA (testul DPPH), capacitatea lor de inhibare a radicalilor liberi se păstrează. Majoritatea polifenolilor par să elimine radicalii liberi prin mecanismul de transfer al atomului de hidrogen. Flavonolii prezintă efect antiradicalic mai puternici decât flavonele corespunzătoare datorită prezenței grupării 3-hidroxil. Compușii polifenolici acizi sunt caracterizați printr-un grad ridicat de delocalizare a electronilor p, pentru care deprotonarea cedează speciilor anionice stabilizate prin fenomene de rezonanță, stabilitatea lor fiind sporită de prezența legăturilor de hidrogen (Cojocari et al., 2019; Cojocari, 2023).

6. Efectul microbiostatic al unor fracții vegetale bogate în compuși fenolici a fost analizat in situ, pe produse din carne cu adaosuri vegetale. Analiza produselor contaminate cu tulpinile de referință a scos în evidență o activitate antimicrobiană mai pronunțată a pudrelor de măceșe și păducel asupra bacteriilor Gram-pozitive și un efect mai slab asupra bacteriilor Gram-negative. Compararea fazelor Lag și Logaritmică de creștere a tulpinilor microbiene a demonstrat un efect bacteriostatic mai pronunțat al păducelului asupra tulpinilor de *S. aureus* și *E. coli*, iar pudra de măceșe - un efect bacteriostatic mai pronunțat asupra tulpinilor de *S. Abony* și *K. pneumoniae*. Crenvurștii cu adaos de busuioc, în diverse concentrații, au manifestat o capacitate vădită de inhibare a tulpinilor de *E.coli* și un efect moderat asupra *S. Abony*. O activitate vădită asupra tuturor bacteriilor testate a fost remarcată în crenvurștii cu adaos de extracte în concentrații de 0,3 % (Sandulachi et al., 2021; Macari et al., 2021).

7. Efectul microbiostatic al pulberilor de fructe de pădure a fost analizat in situ, pe produse lactate cu adaosuri vegetale. Cel mai relevant efect antimicrobian a fost observat în crema de brânză asupra tulpinilor de *E. coli*. Pulberile de măceșe și aronia au manifestat un efect antimicrobian major asupra tulpinilor de *Salmonella*, iar păducelul a manifestat efect antimicrobian major asupra *S. aureus*. Majoritatea microorganismelor patogene inoculate (*S. Abony*, *S. aureus* și *E. coli*) în probele de cremă de brânză cu adaos de pulberi de fructe de pădure au fost distruse după 48 ore de termostatare la 37 °C, ceea ce a demonstrat, că pulberile de măceșe, aronia, cătină și păducel pot menține sub control proliferarea agenților patogeni accidentali (Sturza et al., 2021; Cojocari et al., 2021).

8. A fost testat efectul extractului de busuioc încapsulat în alginat de sodiu asupra stabilității microbiologice, efectelor senzoriale, fizico-chimice și proprietăților texturale ale cremei de brânză. Eficiența de încapsulare a fost de $78,59 \pm 0,01$ %, iar spectrele FTIR a extractelor încapsulate au indicat prezența unor interacțiuni fizice slabe între componente, microcapsulele formate fiind vehicule eficiente de polifenoli pentru alimente. Concentrația optimă de extract încapsulat (0,6 – 0,9 %) asigură inhibarea procesului de post-fermentare, îmbunătățirea gradului

de retenție al apei și parametrilor texturali ai cremei de brânză, contribuind astfel la prelungirea termenului de valabilitate al produsului cu 7 zile fata de proba martor. Analiza informațiilor reciproce a fost utilizată pentru stabilirea influenței extractului de busuioc încapsulat asupra texturii, pH și acceptabilității generale a cremei de brânză (Popescu et al., 2023).

9. Încorporarea extractelor și pulberilor din păducel, măceșe, aronie și cătină în înghețată a asigurat un efect antimicrobian pronunțat în raport cu tulpina *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și un efect moderat în raport cu *Salmonella* Abony NCTC 6017 și *Escherichia coli* ATCC 25922, ceea ce permite recomandarea lor pentru utilizare în industria alimentară în scopul reducerii riscului de contaminare microbiană a materiilor prime și a produselor finite (Popescu et al., 2020).

RECOMANDĂRI PENTRU CERCETĂRI ULTERIOARE

Pe baza rezultatelor acestui studiu se sugerează următoarele recomandări:

1. Extractele acestor plante ar trebui analizate în continuare pentru a identifica principiile antibacteriene specifice lor. Ar fi necesar de efectuat cercetări ulterioare asupra extractelor și pulberilor vegetale luate în studiu pentru a izola și a identifica compușii activi responsabili de proprietățile lor antimicrobiene, antioxidante și citotoxice scăzute.
2. Se recomandă de a determina activitatea acestor extracte de plante asupra altor specii de microorganisme patogene implicate în alte boli infecțioase, pe lângă activitatea sinergică a acestor plante medicinale în asociere cu antibiotice.
3. Studiile de toxicitate ale plantelor eficiente ar trebui, de asemenea, efectuate pentru a determina indicii de siguranță ai extractelor. Ar trebui efectuate studii clinice pentru a explora potențialul acestor extracte de plante în tratamentul acestor boli infecțioase.
4. Utilizarea antimicrobienulelor pe bază de plante poate fi alternative pentru substanțele chimice utilizate în conservarea alimentelor.
5. Trebuie reținut că adăugarea de antimicrobiene naturale la produsele alimentare fără a afecta negativ caracteristicile senzoriale este încă o provocare pentru cercetători, deoarece concentrațiile care sunt necesare pentru a asigura siguranța alimentelor și a produselor alimentare sunt de câteva ori mai mari decât cele acceptate de consumatorii din punct de vedere senzorial.
6. Prin urmare, noi studii care combină utilizarea antimicrobienulelor cu alte metodologii de conservare a alimentelor sunt necesare pentru a reduce impactul acestor compuși asupra proprietăților senzoriale.
7. De asemenea, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a înțelege mai bine impactul compușilor fenolici naturali asupra agenților patogeni, proprietățile lor organoleptice asupra alimentelor și utilizarea lor relevantă în aplicațiile alimentare.
8. Ar fi util de a efectua cercetări privind eficacitatea și a altor părți ale acestor plante, cum ar fi rădăcinile sau florile, tulpina etc.

BIBLIOGRAFIE

- ABDULLAH, B. H., HATEM, S. F., JUMAA, W. A Comparative Study of the Antibacterial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils on Multidrug Resistant Bacteria. In: *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences (UKJPB)*. 3(1), 2015: pp.18-22. DOI: 10.20510/ukjpb/3/i1/89220.
- ABREU, A.C., BORGES, A., SIMÕES, L.C. et al. Antibacterial activity of phenyl isothiocyanate on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In: *Med Chem*. 9(5), 2013: pp.756-61. doi: [10.2174/1573406411309050016](https://doi.org/10.2174/1573406411309050016)
- ABURIGAL, Y.A.A., MIRGHANI, M.E.S., ELMOGTABA, E.Y. et al. Total phenolic content and antioxidant capacity of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves from different locations. In: *Int. Food Res. J.*, 24, 2017: S378–S381.
- ADEYEYE, S.A.O., Fungal mycotoxins in foods: A review, In: *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 2016: p. 1213127, <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1213127>
- AIDARA-KANE, A., ANGULO, F.J., CONLY, J.M. et al. World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. In: *Antimicrob Resist Infect Control*. 7(7), 2018: <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0294-9>.
- AKINDUTI, P.A., MOTAYO, B., IDOWU, O.M. et al. Suitability of spectrophotometric assay for determination of honey microbial inhibition. In: *J. Phys.: Conf. Ser.* 1299, 2019: 012131. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1299/1/012131/pdf>
- ALTEMIMI, A., LAKHSSASSI, N., BAHARLOUEI, A., et al. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. In: *Plants Basel*. 6(4), 2017: p.42. doi: [10.3390/plants6040042](https://doi.org/10.3390/plants6040042)
- ANAND, U., JACOBO-HERRERA, N., ALTEMIMI, A., et al. Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. In: *Metabolites*. 9(11), 2019: p. 258. DOI: [10.3390/metabo9110258](https://doi.org/10.3390/metabo9110258).
- ANAND, U., JACOBO-HERRERA, N., ALTEMIMI, A., et al. Comprehensive Review on Medicinal Plants as Antimicrobial Therapeutics: Potential Avenues of Biocompatible Drug Discovery. In: *Metabolites*. 9(11), 2019: p. 258. DOI: [10.3390/metabo9110258](https://doi.org/10.3390/metabo9110258).
- ANDERSON, K.L., AZIZOGLU, R.O. Detection and Causes of Bovine Mastitis with Emphasis on *Staphylococcus aureus*, In: *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, Second Edition: Academic Press (Elsevier), 2014: pp. 435-440. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00197-2>
- ANNUNZIATO, G. Strategies to Overcome Antimicrobial Resistance (AMR) Making Use of Non-Essential Target Inhibitors: A Review. In: *Int J Mol Sci.*, 20(23), 2019: p.5844. doi: [10.3390/ijms20235844](https://doi.org/10.3390/ijms20235844)
- ANTOLAK, H., CZYZOWSKA, A., SAKAČ, M. et al. Phenolic Compounds Contained in Little-known Wild Fruits as Antiadhesive Agents Against the Beverage-Spoiling Bacteria *Asaia* spp. In: *Molecules*. 22, 2017: p. 1256. <https://doi.org/10.3390/molecules22081256>
- ARAYA-CLOUTIER, Carla. Antibacterial prenylated isoflavonoids and stilbenoids: quantitative structure-activity relationships and mode of action. PhD Thesis. Wageningen University and Research, 2017. 213 p.

- ARTIGA-ARTIGAS, M., ACEVEDO-FANI, A., MARTÍN-BELLOSO, O. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion- based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. In: *Food Control*. 76, 2017: pp. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.001>.
- ARYAL, S. McFarland Standards- Principle, Preparation, Uses, In: *Microbe Notes*. 2021: blog/website.
- ASHURST, J.V., DAWSON, A. *Klebsiella pneumonia*. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; PMID, 2024: p. 30085546.
- AU, A., LEE, H., YE, T., et al. Bacteriophages: Combating Antimicrobial Resistance in Food-Borne Bacteria Prevalent in Agriculture. In: *Microorganisms*.10(1), 2022: p.46. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010046>
- ATTARIANSHANDIZ, M. Antimicrobial and preservative effect of berries in food models. *J Food Microbiol.*, 6(6), 2022: p. 126. DOI:10.35841/aafmy-6.6.126.
- AZARASHKAN, Z., MOTAMEDZADEGAN, A., SARAEI, et al. Investigation of the physicochemical, antioxidant, rheological, and sensory properties of ricotta cheese enriched with free and nano-encapsulated broccoli sprout extract. In: *Food Sci Nutr.*, 10, 2022: pp. 4059-4072. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3001>.
- BALABANOVA, T., PETKOVA, N., IVANOVA, M., et al. Design of Labneh cheese fortified with alginate-encapsulated pepper (*Capsicum annum*) extracts. In: *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 32, 2020: pp. 559– 566. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i8.2132>.
- BALAN, Greta. Compuși noi cu acțiune asupra microorganismelor *izolate din ulcere trofice* : tz. de doct. în medicină. Chișinău, 2022 1283 p.
- BALOUIRI, M., SADIKI, M., IBNSOUDA, S.K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. In: *J Pharm Anal.*, 6(2), 2016:7 pp.1-79. doi: [10.1016/j.jpha.2015.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005).
- BATT, C.A. LISTERIA | *Listeria monocytogenes*, In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, Second Edition: Academic Press (Elsevier), 2014: pp. 490-493, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00191-9>.
- BHATTACHARYA, D., GHOSH, D., BHATTACHARYA, S., et al. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha against *Vibrio cholerae*: Targeting cell membrane. In: *Lett. Appl. Microbiol.*, 66, 2018 pp. 145–152. doi: [10.1111/lam.12829](https://doi.org/10.1111/lam.12829).
- BINTSIS, T. Foodborne pathogens. In: *AIMS Microbiol.*, 3(3), 2017: pp. 529-563. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6604998/>.
- BORGES, A., SAAVEDRA, M.J., SIMÕES, M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. In: *Biofouling*. 28(7), 2012: pp. 755-67. doi: [10.1080/08927014.2012.706751](https://doi.org/10.1080/08927014.2012.706751) .
- BOUARAB-CHIBANE, L., FORQUET, V., LANTÉRI P., et al. Antibacterial Properties of Polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models. In: *Front. Microbiol.*,10, 2019: p.829. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00829>.

- BUCKLEY, K. GROTTICELLI, J. Bacillus cereus, In: Encyclopedia of Toxicology, Fourth Edition: Academic Press (Elsevier), 2024, pp. 889-892, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00374-2>.
- BUCOV, V., BURDUNIUC, O., BALAN, G, et al. Rezistența la antimicrobiene. Caracteristica rezistenței la preparate antimicrobiene a bacteriilor Gram-negative. În: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*, 1(88), 2021: pp. 50-56. ISSN 1729-8687 /ISSNe 2587-3873.
- BULGARU, V., POPESCU, L., NETREBA, N. et al. Assessment of quality indices and their influence on the texture profile in the dry-aging process of beef. In: *Foods*. 11, 2022: p. 1526. <https://doi.org/10.3390/foods11101526>.
- CALEJA, C., RIBEIRO, A., BARROS, L. et al. Cottage cheeses functionalized with fennel and chamomile extracts: Comparative performance between free and microencapsulated forms. In: *Food Chemistry*. 199, 2016: pp. 720–726. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.085>.
- CAO, Y.-D., QIAN, H.-L., FENG, C.-M. et al. Study on the Mechanism of Epigallocatechin Gallate (EGCG) to the Cell Membrane of Escherichia coli. In: *Sci. Adv. Mater.* 11, 2019: pp. 262–268. doi: <https://doi.org/10.1166/sam.2019.3458>.
- Catedra de Igienă generală, Patologii și intoxicații alimentare, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova. <https://igienagenerala.usmf.md/wp-content/blogs.dir/151/files/sites/151/2016/09/Patologii-si-intoxicatii-alimentare.pdf>.
- CENDROWSKI, A., KRAŚNIEWSKA, K., PRZYBYŁ, J.L. et al. Antibacterial and Antioxidant Activity of Extracts from Rose Fruits (*Rosa rugosa*). In: *Molecules*. 25(6), 2020: p. 365. doi: [10.3390/molecules25061365](https://doi.org/10.3390/molecules25061365).
- Centers for Diseases Control and Prevention, Foodborne Germs and Illnesses. 2022, [online] [accesat 04.02.2024] Disponibil: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>.
- CETIN-KARACA, Hayriye. *Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens. Master's Theses*. University of Kentucky, 2011. 652. https://uknowledge.uky.edu/gradschool_theses/652.
- CHINNAM, N., DADI, P.K., SABRI, S.A. et al. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. In: *Int. J. Biol. Macromol.*,46, 2010: pp. 478–486. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2010.03.009](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.009).
- CHOKSHI, A., SIFRI Z, CENNIMO, D. et al. Global Contributors to Antibiotic Resistance. In: *J Glob Infect Dis.*, 11(1), 2019: pp.36-42. doi: [10.4103/jgid.jgid_110_18](https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_110_18).
- CHULOVA, M.N., VRANCHEVA, R.Z., STOYANOVA, M.A. et al. Antioxidant activity and phenolic profile of extracts of basil. In: *Sci. Work. Univ. Food Technol.* 63, 2016: pp. 178–186.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, 11th edition: M07-A9. 2018. ISBN 1-56238-836-3(Print), ISBN 1-56238-837-1(Electronic).

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th edition: CLSI supplement, M100. 2019. ISBN 978-1-68440-032-4(Print), ISBN 978-1-68440-031-4(Electronic).
- COJOCARI, D.** Antibacterial potential of berries powder extracts. In:Aspecte moderne ale conservării sănătății umane Proceedings of the 15th International Interdisciplinary Scientific and Practice Conference, (8-9 aprilie 2022), La cea de-a 30-a aniversare a înființării Institutului de Cercetare în Fitoterapie al Universității Naționale Ujgorod, Ujhorod 2022, p. 14–16, ISBN: 978-617-7825-73-8.
- COJOCARI, D., STURZA, R., SANDULACHI, E.** et al. Inhibiting of accidental pathogenic microbiota in meat products with berry powders, In: *Journal of Engineering Science*. Vol. 26(1), 2019: pp. 114 - 122. ISSN 2587-3474. DOI: 10.5281/zenodo.2640056.
- Condalab, Learn how have food infections evolved lately based on EFSA reports, Microbiology categories, 2021, [online] [accesat 04.02.2024] Disponibil:<https://www.condalab.com/int/en/blog/learn-how-have-food-infections-evolved-lately-based-on-efsa-reports-n272>.
- COSTA, M., SEZGIN-BAYINDIR, Z., LOSADA-BARREIRO, S.,** et al. Polyphenols as Antioxidants for Extending Food Shelf-Life and in the Prevention of Health Diseases: Encapsulation and Interfacial Phenomena. In: *Biomedicines*. 9(12), 2021: p.1909. doi: [10.3390/biomedicines9121909](https://doi.org/10.3390/biomedicines9121909).
- COWAN, M.M.** Plant products as antimicrobial agents. In: *Clin Microbiol Rev.*, 12(4), 1999: pp.564-82. doi: [10.1128/cmr.12.4.564](https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564).
- CRISTE, A., URCAN, A.C., BUNEA, A.** et al. Phytochemical Composition and Biological Activity of Berries and Leaves from Four Romanian Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) Varieties. In: *Molecules*, 25, 2020: p. 1170. <https://doi.org/10.3390/molecules25051170>. 140.
- DADI, P.K., AHMAD, M., AHMAD, Z.** Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. In: *Int. J. Biol. Macromo.*, 45, 2009: pp. 72–79. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2009.04.004](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.04.004).
- DAGLIA, M.** Polyphenols as antimicrobial agents. In: *Curr Opin Biotechnol*. 23(2), 2012: pp. 174-81. doi: [10.1016/j.copbio.2011.08.007](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007).
- DARBY, E.M., TRAMPARI, E., SIASAT, P. A.** et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. In: *Nature Reviews Microbiology*. 21(5), 2022: pp.1-16. DOI: [10.1038/s41579-022-00820-y](https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y).
- DARRA, N., TANNOUS, J., MOUNCEF, P.** et al. A Comparative Study on Antiradical and Antimicrobial Properties of Red Grapes Extracts Obtained from Different *Vitis vinifera* Varieties. In: *Food and Nutr. Sci.*, 3(10), 2012: pp. 1420-1432. doi: [10.4236/fns.2012.310186](https://doi.org/10.4236/fns.2012.310186).
- DERKACH, S.R., VORON'KO, N.G., SOKOLAN,** et al. Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies. In: *J. Dispers. Sci. Technol.*, 41, 2019: pp.1-9. <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1611437>.

- DILARANUR, Tanagardi. *Antimicrobial, Antioxidant, Antiproliferative and cytotoxic activities of aronia fruits extract. Thesis of master of science in Biotechnology.* İzmir Institute of Technology, 2023. 100 p.
- EAGLE, J. Antimicrobial resistance remains one of the biggest threats to public health. 2018, [online] [accesat 17.02.2024] Disponibil: <https://www.foodnavigator.com/Article/2018/02/28/Antimicrobial-resistance-remains-one-of-the-biggest-threats>.
- Echipa Synevo, Toxiinfecție alimentară: o afecțiune prezentă în sezonul cald, În: Sînitatea sub microscop, Synevo, 2022. [online] [accesat 07.02.2024] Disponibil: <https://www.synevo.ro/toxiinfecție-alimentara-afecțiune-sezonul-cald/>.
- EFENBERGER-SZMECHTYK, M., NOWAK, A., CZYŻOWSKA, A. et al. Antibacterial mechanisms of *Aronia melanocarpa* (Michx.), *Chaenomeles superba* Lindl. and *Cornus mas* L. leaf extracts. In: Food Chemistry, 350, 2021: p. 129218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129218>.
- EFENBERGER-SZMECHTYK, M., NOWAK, A., CZYŻOWSKA, A. et al. Composition and Antibacterial Activity of *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot, *Cornus mas* L. and *Chaenomeles superba* Lindl. Leaf Extracts. In: *Molecules*, 2020: 25, p. 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules25092011>.
- EGHBAL, N., LIAO, W., DUMAS, E. et al. Microencapsulation of natural food antimicrobials: methods and applications. In: *Appl. Sci.*, 12, 2022:3p. 837. <https://doi.org/10.3390/app12083837>.
- EL-MESSERY, T.M., EL-SAID, M.M., SHAHEIN, N.M., et al. Functional yoghurt supplemented with extract orange peel encapsulated using coacervation technique. In: *Pak J Biol Sci PJBs*. 22, 2019: pp. 231–238. doi: [10.3923/pjbs.2019.231.238](https://doi.org/10.3923/pjbs.2019.231.238).
- Environmental Health OC Care Agency, Top 5 Foodborne Illness Risk Factors, [online] [accesat 04.02.2024] Disponibil: <https://www.ocfoodinfo.com/illness/risk>.
- ERRINGTON, J., AART, L.TV. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. In: *Microbiology (Reading)*. 166(5), 2020: pp. 425-427. doi: [10.1099/mic.0.000922](https://doi.org/10.1099/mic.0.000922).
- European Commission (EC), Health Union: Identifying top 3 priority health threats. 2022, [online] [accesat 16.02.2024] Disponibil: https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-07/hera_factsheet_health-threat_mcm.pdf.
- European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control)(EFSA and ECDC). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report, In: *EFSA Journal*, 20(12), 2022: p.7666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- European Food Safety Authority (EFSA and ECDC) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2021. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019. In: *EFSA Journal*, 9(4) 2021: p.6490, 179 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6490>.

- FAOUR-KLINGBEIL, D., TODD, E. Prevention and Control of Foodborne Diseases in Middle-East North African Countries: Review of National Control Systems. In: *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 17(1), 2020: p.70. <https://doi.org/10.3390/ijerph17010070>.
- FARRAG, A.F., ZAHRAN, H., AL-OKABY, M.F., et al. Physicochemical properties of white soft cheese supplemented with encapsulated olive phenolic compounds. In: *Egyptian Journal of Chemistry*. 63, 2020: pp. 2921-2931. [10.21608/EJCHEM.2020.23381.2388](https://doi.org/10.21608/EJCHEM.2020.23381.2388).
- FINLEY, J.W., KONG, A.N., HINTZE, K.J. et al. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. In: *J Agric Food Chem.*, 59(13), 2011: pp. 6837-46. doi: [10.1021/jf2013875](https://doi.org/10.1021/jf2013875).
- FLORA, S.J. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. In: *Oxid Med Cell Longev*. 2(4), 2009: pp. 191-206. doi: [10.4161/oxim.2.4.9112](https://doi.org/10.4161/oxim.2.4.9112).
- Food safety and the Sustainable Development Goals (FSSDG), [online] [accesat 04.02.2024] Disponibil: <https://www.ilri.org/news/food-safety-and-sustainable-development-goals>
- Food and Drug Administration's (FDA), Most Common Foodborne Illnesses. [online] [accesat 20.02.2024] Disponibil la: [https://www.fda.gov/files/food/published/Most-Common-Foodborne-Illnesses-\(PDF\).pdf](https://www.fda.gov/files/food/published/Most-Common-Foodborne-Illnesses-(PDF).pdf).
- Food Safety Home Page, Centers for Disease Control and Prevention, People with a Higher Risk of Food Poisoning, People with a Higher Risk of Food Poisoning. [online] [accesat 04.02.2024] Disponibil: <https://www.cdc.gov/foodsafety/people-at-risk-food-poisoning.html>.
- FOUNOU, L.L., FOUNOU, R.C., ESSACK, S.Y. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. In: *Front Microbiol.*, 7, 2016: p.1881. [10.3389/fmicb.2016.01881](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881).
- FRATIANNI, F., NAZZARO, F., MARANDINO, A. et al. Biochemical composition, antimicrobial activities, and anti-quorum-sensing activities of ethanol and ethyl acetate extracts from *Hypericum connatum* Lam. (Guttiferae). In: *J. Med. Food.*, 16, 2013: pp. 454-459. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0197>.
- FUKUSHIMA, M., KAKINUMA, K., KAWAGUCHI, R. Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. In: *J Clin Microbiol.*, 40(8), 2002: pp. 2779-85. doi: [10.1128/JCM.40.8.2779-2785.2002](https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2779-2785.2002).
- FUNG, F., WANG, H.S., MENON, S. Food safety in the 21st century. In: *Biomed J.*, 41(2), 2018: pp. 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.003>.
- GAFIN, N., NASTAS, A., BÎRCĂ, I., et al., Aspecte epidemiologice ale izbucnirilor cu boli diareice acute în Republica Moldova. În: *Общественное здоровье, экономика и менеджмент в медицине*. 4 (82), 2019: pp.309-312. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/aspecte-epidemiologice-ale-izbucnirilor-cu-boli-diareice-acute-n-republica-moldova>.
- GHASEMZADEH, A., ASHKANI, S., BAGHDADI, A. et al. Improvement in Flavonoids and Phenolic Acids Production and Pharmaceutical Quality of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) by Ultraviolet-B Irradiation. In: *Molecules*, 21, 2016: pp. 1203. <https://doi.org/10.3390/molecules21091203>.

- GHENDOV-MOŞANU, A., **COJOCARI, D.**, BALAN G. et al. Antimicrobial activity of rose hip and hawthorn powders on pathogenic bacteria. In: *Journal of Engineering Science*, 25(4), 2018: pp. 100-107. DOI:10.5281/zenodo. 2576764.
- GHENDOV-MOSANU, A., **COJOCARI, D.**, BALAN, G. et al. Chemometric Optimization of Biologically Active Compounds Extraction from Grape Marc: Composition and Antimicrobial Activity, In: *Molecules*, 27(5), 2022: p.1610; <https://doi.org/10.3390/molecules27051610>.
- GHENDOV-MOSANU, A., CRISTEA, E., PATRAS, A. et al. Potential application of hippophae rhamnoides in wheat bread production. In: *Molecules*. 25, 2020: p. 1272. <https://doi.org/10.3390/molecules25061272>.
- GHENDOV-MOSANU, A., CRISTEA, E., PATRAS, A. et al. Rose Hips, a valuable source of antioxidants to improve gingerbread characteristics. In: *Molecules*. 25, 2020: p. 5659. <https://doi.org/10.3390/molecules25235659>.
- GONELIMALI, F.D., LIN, J., MIAO, W. et al. Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. In: *Front Microbiol*. 24(9), 2018: p. 1639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>.
- GOUVEA, F.D.S., ROSENTHAL, A., FERREIRA E.H.D.R. Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses: a review. In: *Ciência Rural*. 47(8), 2017: e20160908. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160908>.
- GÜVEN, K., YÜCEL, E., CETINTAŞ, F. Antimicrobial Activities of Fruits of *Crataegus* and *Pyrus*. Species. In: *Pharm. Biol.*, 2 (44), 2006: pp. 79–83. <https://doi.org/10.1080/13880200600591253>.
- HALA, M., EBTISAM, E., SANAA, I. et al. Manufacture of low fat UF-soft cheese supplemented with rose-mary extract (as natural antioxidant). In: *Journal of American Science*, 6, 2010: pp. 570–579.
- HARATIFAR, S., CORREDIG, M. Interactions between tea catechins and casein micelles and the impact on renneting functionality. In: *Food Chem*. 143, 2014: pp. 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.092>.
- HASSAN, Y.I., KOSIR, V., YIN, X., et al. Grape Pomace as a Promising Antimicrobial Alternative in Feed: A Critical Review. In: *J Agric Food Chem.*, 67(35), 2019: pp. 9705-9718. DOI: [10.1021/acs.jafc.9b02861](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02861).
- HINTZ, T., MATTHEWS, K.K., DI, R. The Use of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation. In: *Biomed Res Int.*, 2015, 2015: p. 246264. DOI: [10.1155/2015/246264](https://doi.org/10.1155/2015/246264).
- HOFFMAN, S., SCALLAN, E. Epidemiology, Cost, and Risk Analysis of Foodborne Disease. In: *Foodborne Diseases (Third Edition)*, Chapter 2: Elsevier Inc. All, 2017: pp.31-63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00002-4>.
- HÖLZEL, C. S., J. L. TETENS, C.S., SCHWAIGER, K. Unraveling the Role of Vegetables in Spreading Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment. In: *Foodborne Pathogens and Disease*. 15(11), 2018: pp.671-688. <http://doi.org/10.1089/fpd.2018.2501>.

- HUDSON, J.A. Microbiological Safety of Meat | *Staphylococcus aureus*. In: Encyclopedia of Meat Sciences, Second Edition: Elsevier, 2014: pp. 376-381. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00041-6>.
- HUDZ, N., IVANOVA, R., BRINDZA, J. et al. Approaches to the determination of antioxidant activity of extracts from bee bread and safflower leaves and flowers. In: Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences vol., 11(1), 2017: pp. 480-48. doi: <https://dx.doi.org/10.5219/786>.
- IMPEY, R.E., HAWKINS, D.A., SUTTON, J.M. et al. Overcoming Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms Associated with the Cell Wall of Gram-Negative Bacteria. In: *Antibiotics*. 9(9), 2020: p.623. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090623>.
- IVANOVA, V., STEFOVA, M., CHINNICI, F. Determination of the polyphenol contents in Macedonian grapes and wines by standardized spectrophotometric methods. In: *J. Serb. Chem. Soc.*, 75, 2010: pp. 45–59. <https://doi.org/10.2298/JSC1001045I>.
- JOHANNESSEN, G.S., TORP, M. Improving the safety of organic vegetables. In: *Improving the Safety of Fresh Fruit and Vegetables*, Woodhead Publishing, 2005. ISBN 978-1-85573-956-7. <https://www.sciencedirect.com/book/9781855739567/improving-the-safety-of-fresh-fruit-and-vegetables#book-description>.
- JOUDA, Mohamed. The antibacterial effect of some medicinal plant extracts and their synergistic effect with antibiotic and non-antibiotic drugs. *Thesis for the Degree of Master in Biological Science / Microbiology*. Islamic University-Gaza 2013, 134p.
- KARANTH, S., FENG, S., PATRA, D. et al. Linking microbial contamination to food spoilage and food waste: the role of smart packaging, spoilage risk assessments, and date labeling. In: *Front Microbiol.*, 14, 2023: pp. 1198124. doi: [10.3389/fmicb.2023.1198124](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1198124).
- KAYA, I., YIGIT, N., BENLI, M. Antimicrobial activity of various extracts of *Ocimum basilicum* L. and observation of the inhibition effect on bacterial cells by use of scanning electron microscopy. In: *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 5(4), 2008: pp. 363-9. doi: [10.4314/ajtcam.v5i4.31291](https://doi.org/10.4314/ajtcam.v5i4.31291).
- KHATIB, S., HARNAFI, M., TOUISS, I. et al. HPLC–DAD profiling of a phenolic extract from Moroccan sweet Basil and its application as oxidative stabilizer of sunflower oil. In: *Chem. Pap.*, 75, 2021: pp.1907–1917. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01472-z>.
- KIM, D.-H., KIM H., KIM J. et. al. Antibacterial Activity of Crude Aronia melanocarpa (Black Chokeberry) Extracts against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii*, and *Salmonella Enteritidis* in Various Dairy Foods: Preliminary Study. In: *J. Milk Sci. Biotechnol.*, 36(3), 2018: pp. 155-163. <https://doi.org/10.22424/jmsb.2018.36.3.155>.
- KIM, J.S., LEE, M.S, KIM JH. Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Its Potential Reservoirs. In: *Front Cell Infect Microbiol.*, 4(10), 2020: p.273. [10.3389/fcimb.2020.00273](https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00273).
- KOMOLAFE, Naomi. *Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts against bacteria causing diarrhoea. Master of science thesis*. University of south Africa, 2014. 95p.

- KONATÉ, K., HILOU, A., MAVOUNGOU, J.F. et al. Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains. In: *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012: pp. 11:5. doi: [10.1186/1476-0711-11-5](https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-5).
- KUMAR, G., MOHAMMED, F., SUMER, S. Role of Medicinal Plant in Human Health Disease, In: *Asian J. Plant Sci. Res.*, 11 (1), 2021: pp.19-21, [40170.pdf](#) DOI: <https://doi.org/10.24941/ijcr.40170.11.2020>.
- KUNOVÁ, S., FELSÖCIOVÁ, S., TVRDÁ, E. et al. Antimicrobial activity of resveratrol and grape pomace extract. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences.* 13(1), 2019: pp.363–368. doi: <https://doi.org/10.5219/1054>.
- LACOMBE, A., WU, V. The potential of berries to serve as selective inhibitors of pathogens and promoters of beneficial microorganisms. In: *Food Quality and Safety*, 1(1), 2017: pp. 3–12, <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx001>.
- LAVELLI, V., FREGAPANE, G., SALVADOR, M.D. Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. In: *J Agric Food Chem.*, 54(8), 2006: pp. 3002-7. [10.1021/jf052918l](https://doi.org/10.1021/jf052918l).
- LeBEL, M. Ciprofloxacin: chemistry, mechanism of action, resistance, antimicrobial spectrum, pharmacokinetics, clinical trials, and adverse reactions. In: *Pharmacotherapy.* 8(1), 1988:3-33. doi: [10.1002/j.1875-9114.1988.tb04058.x](https://doi.org/10.1002/j.1875-9114.1988.tb04058.x)
- LEE, H., YOON, Y. Etiological Agents Implicated in Foodborne Illness World Wide. In: *Food Sci Anim Resour.*, 41(1), 2021: pp. 1-7. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2020.e75>.
- LEE, R.M., LESSLER, J., LEE, R.A. et al. Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Infect Dis.*, 13, 2013:446. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/446>.
- LEONTE, A. Evaluarea prejudiciului economic în intoxicațiile alimentare acute. In: *Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină*, 5(26), 2008: pp. 31-34. ISSN 1729-8687.
- LERI, M., SCUTO, M., ONTARIO, M.L. et al. Healthy Effects of Plant Polyphenols: Molecular Mechanisms. In: *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 2020: p. 1250. <https://doi.org/10.3390/ijms21041250>.
- LI, A.N., LI, S., ZHANG, Y.J. et al. Resources and biological activities of natural polyphenols. In: *Nutrients.* 6(12), 2014: pp. 6020-47. doi: [10.3390/nu6126020](https://doi.org/10.3390/nu6126020).
- LIEPIŅA, I., NIKOLAJEVA, V., JĀKOBSONE I. Antimicrobial Activity of Extracts from Fruits of *Aronia Melanocarpa* and *Sorbus Aucuparia*, In: *Envir and Experim Biol*, 11, 2013: pp. 195–199. https://eeb.lu.lv/EEB/201312/EEB_11_Liepina.pdf.
- LIN, Y., XIAOYAN, P., JUNJIE, M. et al. Surveillance and examination of microbial contamination in ice cream in China. In: *Food Quality and Safety.* 6, 2022: fyac047. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyac047>.
- LOZAN-TÎRȘU, Carolina. *Efecte antimicrobiene ale unor substanțe chimice din produse autohtone: teză de doctor în medicină.* Chișinău, 2016. 167 p.
- LU, H.J., BREIDT F.J., PÉREZ-DÍAZ, I.M. et al. Antimicrobial effects of weak acids on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 under anaerobic conditions. In: *J Food Prot.*, 74(6), 2011: pp. 893-8. DOI: [10.4315/0362-028X.JFP-10-404](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-404).

- MACARI, A., NETREBA, N., BOEȘTEAN, O. et al., Proprietățile fizice și organoleptice ale fructelor de cătină albă *Hippophae Rhamnoides L.* Cultivată în Republica Moldova, In: Știința agricolă. 1, 202: p. 51-55. <<https://sa.uasm.md/index.php?journal=sa&page=article&op=view&path%5B%5D=735>.
- MACARI, A., NETREBA, N., BOEȘTEAN O. et al. Analiza indicilor fizico-chimici a unor soiuri de cătină albă, In: RTUM – Institutional Repository of the Technical University of Moldova, p.101-104, C.Z.U.: 634.743(478).
- MACARI, A., STURZA, R., LUNG, I., SORAN, M.L., OPRIS, O., BALAN, G., GHENDOV-MOSANU, A., VODNAR, D.C., **COJOCARI, D.** Antimicrobial Effects of Basil, Summer Savory and Tarragon Lyophilized Extracts in Cold Storage Sausages, In: *Molecules*, 26(21), 2021: p. 6678. <https://doi.org/10.3390/molecules26216678>.
- MANN, A., NEHRA, K., RANA, J.S. et al. Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance. In: *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 2021:p.100030. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100030>.
- MASSOUNGA BORA, A.F., MA, S., LI, X. et al. Application of microencapsulation for the safe delivery of green tea polyphenols in food systems: review and recent advances. In: *Food Res Int.*, 105, 2018: pp. 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.047>.
- McEWEN, S.A., COLLIGNON, P.J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. In: *Microbiol Spectr.*, 6(10), 2018: p.1128. doi: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>.
- MEAD P.S., SLUTSKER L, DIETZ, V. et.al. Food-related illness and death in the United States. In: *Emerg Infect Dis.* 5(5), 1999; pp. 607-25. doi: [10.3201/eid0505.990502](https://doi.org/10.3201/eid0505.990502).
- MOHR, K. I., History of Antibiotics Research, In: *How to Overcome the Antibiotic Crisis*. Chapter 499: Springer Cham, 2016: pp. 237-272. [10.1007/82_2016_499](https://doi.org/10.1007/82_2016_499).
- MORYA, S., AMOAH, A.E., SNAEBJORNSSON, S.O. Food Poisoning Hazards and Their Consequences Over Food Safety. In: *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*, Chapter 19: Elsevier, 2020: pp. 383-400. <https://sdgresources.relx.com/research-book-chapters/microorganisms-sustainable-environment-and-health-chapter-19-food-poisoning>.
- MOSTAFA, A.A., AI-ASKAR, A.A., ALMAARY, K.S. et al. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. In: *Saudi J Biol Sci.*, 25(2), 2018: pp. 361-366. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.004>.
- MOȘANU, A., VODNAR, D.C., **COJOCARI, D.** Antimicrobial Effects of Basil, Summer Savory and Tarragon Lyophilized Extracts in Cold Storage Sausages, In: *Molecules*, 26(21), 2021: p. 6678. <https://doi.org/10.3390/molecules26216678>.
- MUCHA, P., SKOCZYŃSKA, A., MAŁECKA, M. et al. Overview of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Selected Plant Compounds and Their Metal Ions Complexes. In: *Molecules*. 26, 2021: p. 4886. <https://doi.org/10.3390/molecules26164886>.
- MUTTEEB, G., REHMAN, M.T., SHAHWAN, M. et al., Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development. A Narrative Review. In: *Pharmaceuticals*, 16, 2023: p.1615. <https://doi.org/10.3390/ph16111615>.

- NEGI, P.S., CHAUHAN, A.S., SADIA, G.A. et al. Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts, In: *Food Chemistry*, 92(1), 2005: pp.119-124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.009>.
- NIETO, G., ROS, G., CASTILLO, J. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. In: *Medicines (Basel)*, 5(3), 2018: p. 98. doi: [10.3390/medicines5030098](https://doi.org/10.3390/medicines5030098).
- NGUYEN, V.T., NGUYEN, N.Q., THI, N.Q.N. et al. Studies on chemical, polyphenol content, flavonoid content, and antioxidant activity of sweet basil leaves (*Ocimum basilicum* L.). In: *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, 1092,2021: p.012083. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/1092/1/012083>
- NOBLE, S.M., GIANETTI, B.A., WITCHLEY, J.N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. In: *Nat Rev Microbiol.*, 15(2), 2017: pp. 96-108. doi: [10.1038/nrmicro.2016.157](https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157).
- NWABOR, O. F., SINGH, S., MARLINA, D., et al. Chemical characterization, release, and bioactivity of Eucalyptus camaldulensis polyphenols from freeze-dried sodium alginate and sodium carboxymethyl cellulose matrix. In: *Food Quality and Safety*. 4, 2020: pp. 203–212. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa016>.
- NOHYNEK, L.J., ALAKOMI, H.L., KÄHKÖNEN, M. et al. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. In: *Nutr Cancer*. 54(1), 2006: pp. 18-32. DOI: [10.1207/s15327914nc5401_4](https://doi.org/10.1207/s15327914nc5401_4).
- OLVERA-AGUIRRE, G., PIÑEIRO-VÁZQUEZ, Á.T., SANGINÉS-GARCÍA, J.R. et al. Using plant-based compounds as preservatives for meat products: A review. In: *Heliyon*. 9(6), 2023: p. e17071. doi: [10.1016/j.heliyon.2023.e17071](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17071).
- OLUFUNMILAYO, E.O., GERKE-DUNCAN, M.B., HOLSINGER, R.MD. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurodegenerative Disorders. In: *Antioxidants (Basel)*. 12(2), 2023: p. 517. doi: [10.3390/antiox12020517](https://doi.org/10.3390/antiox12020517).
- OSEK, J., LACHTARA, B., WIECZOREK, K. *Listeria monocytogenes* – How This Pathogen Survives in Food-Production Environments? In: *Front. Microbiol.*, 13, 2022: pp1-21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.866462>.
- PALOMBO, E.A. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases. In: *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2011, 2011: p. 680354. doi: [10.1093/ecam/nep067](https://doi.org/10.1093/ecam/nep067).
- Pan American Health Organization (PAHO)/World Health Organization (WHO), Food safety is everyone's business, 2019, [online] [accesat 04.02.2024] Disponibil: <https://www.paho.org/en/news/6-6-2019-food-safety-everyones-business>.
- PANDEN, K.B., RIZVI, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. In: *Oxid Med Cell Longev.*, 2(5), 2009: pp. 270-8. doi: [10.4161/oxim.2.5.9498](https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498).
- PANINSKI, L. Estimation of entropy and mutual information. In: *Neural computation*. 15(6), 2003: pp. 1191-1253.
- PATRA, A.K. An Overview of Antimicrobial Properties of Different Classes of Phytochemicals. In: *Dietary Phytochemicals and Microbes*. 18, 2012: pp. 1–32. doi: [10.1007/978-94-007-3926-0_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-3926-0_1).

- PEABODY, M.A., LAIRD, M.R., VLASSCHAERT, C., et al. PSORTdb: Expanding the bacteria and archaea protein subcellular localization database to better reflect diversity in cell envelope structures, In: *Nucleic Acids Research*, 44, 2016: pp. 663–668. DOI: [10.1093/nar/gkv1271](https://doi.org/10.1093/nar/gkv1271).
- PELLEGRINI, M.C., PONCE, A.G. Beet (*Beta vulgaris*) and Leek (*Allium porrum*) Leaves as a Source of Bioactive Compounds with Anti-quorum Sensing and Anti-biofilm Activity. In: *Waste Biomass Valoriz.* 11, 2019: pp. 4305–4313. DOI: [10.1007/s12649-019-00775-x](https://doi.org/10.1007/s12649-019-00775-x).
- PERERA, M.M.N., DIGHE, S.N., KATAVIC, P.L. et al. Antibacterial Potential of Extracts and Phytoconstituents Isolated from *Syncarpia hillii* Leaves In Vitro. In: *Plants*, 11, 2022: p.283. <https://doi.org/10.3390/plants11030283>.
- PÉREZ-SOTO, E., CENOBIO-GALINDO, A.D.J., ESPINO-MANZANO, S.O. et al., The addition of microencapsulated or Nanoemulsified bioactive compounds influences the antioxidant and antimicrobial activities of a fresh cheese. In: *Molecules*. 26, 2021: pp. 2170. <https://doi.org/10.3390/molecules26082170>.
- PETCHSOMRIT, A., SERMKAEW, N., WIWATTANAPATAPEE, R. Effect of alginate and surfactant on physical properties of oil entrapped alginate bead formulation of curcumin. In: *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 7, 2013: pp. 864-868. url={<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:30231826>}.
- POLJSAK, B.; KOVAČ, V.; MILISAV, I. Antioxidants, Food Processing and Health. In: *Antioxidants*. 10, 2021: p.433. <https://doi.org/10.3390/antiox10030433>. 110.
- POPESCU, L., **COJOCARI, D.**, LUNG, I. et al. Effect of Microencapsulated Basil Extract on Cream Cheese Quality and Stability. In: *Molecules*. 28(8), 2023: pp. 3305. <https://doi.org/10.3390/molecules28083305>.
- POPESCU, L., CEȘCO, T., GUREV, A. et al. Impact of apple pomace powder on the bioactivity, and the sensory and textural characteristics of yogurt. In: *Foods*. 11, 2022: pp. 3565. <https://doi.org/10.3390/foods11223565>.
- POPESCU, L., GHENDOV-MOȘANU, A., STURZA, R., **COJOCARI, D.** et al. Procedeu de fabricare a înghețatei. Brevet de invenție de scurtă durată MD 1451 (13) Y, 2020, Publicat BOPI nr. 8/2020.
- POROOSHAT, D. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs, *Infection and Drug Resistance*, 2019: pp.3903-3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>.
- PRINSI, B., MORGUTTI, S., NEGRINI, N. et al. Insight into composition of bioactive phenolic compounds in leaves and flowers of green and purple basil. In: *Plants*, 9, 2019: p. 22. <https://doi.org/10.3390/plants9010022>.
- Public Health Environmental Health Services, Top 5 CDC risk factors contributing to foodborne illness, [online] [accesat 04.02.2024] Disponibil: (<http://www.sbcounty.gov/uploads/dph/dehs/Depts/EnvironmentalHealth/FormsPublications/Top5CDCRiskFactors.pdf>).
- Health Policy Watch Home. Antimicrobial Resistance Death Toll Could Catch Up to Cancer by 2050, and Pollution is Fuelling its Spread. 2023. [online] [accesat 20.02.2024] Disponibil: <https://healthpolicy-watch.news/antimicrobial-resistance-deaths-cancer/>.

- PRERNA, SHARMA, P. CHAUDHARY, S. et al. A review on antimicrobial and antioxidant activity of *Rosa damascene* against different species of microbes, In: *International Journal of Advance Research and Innovative Ideas in Education*, 7(3,) 2021: pp. 3555-3568. e-ISSN: 2395-4396.
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R., NOHYNEK, L., ALAKOMI, H.L. et al. Bioactive berry compounds - novel tools against human pathogens. In: *Appl Microbiol Biotechnol*, 67, 2005: pp. 8-18. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1817-x>.
- QADIR, M.I., ABBAS, K., YOUNUS, A., et al. Report - Antibacterial activity of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) against methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA). In: *Pak J Pharm Sci.*, 29(5), 2016: pp. 1711-1713. PMID: 27731833.
- QI, X., ALIFU, X., CHEN, J. et al. Descriptive study of foodborne disease using disease monitoring data in Zhejiang Province, China, 2016–2020. In: *BMC Public Health.*, 22, 2022: p. 1831. doi: <https://doi.org/10.1186/s12889-022-14226-1>.
- RADULESCU, C., BURULEANU, L.C., NICOLESCU, C.M. Phytochemical Profiles, Antioxidant and Antibacterial Activities of Grape (*Vitis vinifera L.*) Seeds and Skin from Organic and Conventional Vineyards. In: *Plants.* 9, 2020: p. 470. <https://doi.org/10.3390/plants9111470>.
- Report of the Scientific Committee of the Food Safety Authority of Ireland „Potential for Transmission of Antimicrobial Resistance in the Food Chain”, 2015, ISBN 978-1-910348-01-7.
- RIJO, P., MATIAS, D., FERNANDES, A.S. et al. Antimicrobial plant extracts encapsulated into polymeric beads for potential application on the skin. In: *Polymers.* 6, 2014: pp. 479–490. <https://doi.org/10.3390/polym6020479>.
- ROLFE, M.D., RICE, C.J., LUCCHINI, S.C. et al. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. In: *J Bacteriol.*, 194 (3), 2012: pp.686-701. doi: [10.1128/JB.06112-11](https://doi.org/10.1128/JB.06112-11).
- ROMANO, R., DE LUCA, L., AIELLO, A. et al. Basil (*Ocimum basilicum L.*) Leaves as a Source of Bioactive Compounds. In: *Foods.* 11, 2022: p. 3212. <https://doi.org/10.3390/foods11203212>.
- ROVNÁ, K., PETROVÁ, J., TERENTJEVA, M. et al. Antimicrobial Activity of Rosa Canina Flowers Against Selected Microorganisms. In: *J Microbiol Biotech Food Sci.*, 4(1), 2015: pp.62-64. doi:10.15414/jmbfs.2015.4.special1.62-64.
- SAIKIA, S., MAHNOT, N.K., MAHANTA, C.L. Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. In: *Food Chemistry.* 171, 2015: pp. 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.064>.
- SALAM, M.A., AL-AMIN, M.Y., SALAM. M.T. et al. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. In: *Healthcare (Basel).* 11(13), 2023: p. 1946. doi: [10.3390/healthcare11131946](https://doi.org/10.3390/healthcare11131946).
- SALMOND, C.V., KROLL, R.G., BOOTH, I.R. The effect of food preservatives on pH homeostasis in Escherichia coli. In: *J Gen Microbiol.* 130(11), 1984: pp. 2845-50. doi: [10.1099/00221287-130-11-2845](https://doi.org/10.1099/00221287-130-11-2845).

- SANDULACHI, E., BULGARU, V., GHENDOV-MOSANU, A. et al. Controlling the Risk of *Bacillus* in Food Using Berries. In: *Food and Nutrition Sciences*. 12, 2021: pp. 557-577. doi: [10.4236/fns.2021.126042](https://doi.org/10.4236/fns.2021.126042).
- SANDULACHI, E., **COJOCARI, D.**, BALAN, G., et al. Antimicrobial Effects of Berries on *Listeria monocytogenes*. In: *Food and Nutrition Sciences*, 11(9), 2020: pp. 873-886. doi: [10.4236/fns.2020.119061](https://doi.org/10.4236/fns.2020.119061).
- SANDULACHI, E., MACARI A., GHEND-OV-MOSANU, A., **COJOCARI, D.** et al. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Basil, Thyme and Tarragon Used in Meat Products In: *Advances in Microbiology*, 11(11), 2021: pp. 591-606. doi: [10.4236/aim.2021.1111043](https://doi.org/10.4236/aim.2021.1111043).
- SANDULACHI, E., MACARI, A., **COJOCARI, D.**, et al. Antimicrobial properties of sea buckthorn grown in the Republic of Moldova. In: *Journal of Engineering Science (JES)*, 29 (1), 2022: pp. 164-175. [https://doi.org/10.52326/jes.utm.2022.29\(1\).15](https://doi.org/10.52326/jes.utm.2022.29(1).15).
- SANTOS-SÁNCHEZ, N.F., SALAS-CORONADO, R., VILLANUEVA-CAÑONGO, C. et al. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In: *Antioxidants*, Chapter 4: Intechopen, 2019: p. 418. ISBN 978-1-78923-920-1.
- SARKER, B., PAPAGEORGIOU, D.G., SILVA, R. et al. Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties, In: *J. Mater. Chem.*, 2, 2014: pp. 1470-1482. <https://doi.org/10.1039/C3TB21509A>
- SARNO, E., PEZZUTTO, D., ROSSI, M. et al. A Review of Significant European Foodborne Outbreaks in the Last Decade. In: *Journal of Food Protection*, 84(12), 2021: pp. 2059-2070. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-096>.
- Scientific Committee on Enteric Infections and Foodborne Diseases, Review on the Global and Local Epidemiology of Food Poisoning, [online] [accesat 06.02.2024] Disponibil: https://www.chp.gov.hk/files/pdf/review_on_the_global_and_local_epidemiology_of_food_poisoning_r.pdf.
- SCHILLHORN van VEEN, T. W. International trade and food safety in developing countries, In: *Food Control*. 16(6), 2005: pp. 491-496. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.10.014>.
- SCHIRONE, M., VISCIANO, P. Trends of Major Foodborne Outbreaks in the European Union during the Years 2015–2019. In: *Hygiene*. 1(3), 2021; pp.106-119. <https://doi.org/10.3390/hygiene1030010>.
- SEIDEL, V., PEYFOON, E., WATSON, D.G. et al. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. In: *Phytother Res.*, 22(9), 2008: pp. 1256-63. doi: [10.1002/ptr.2480](https://doi.org/10.1002/ptr.2480).
- SHAUKAT, A., SUNDAS, N., SOBIA S. et al. Medicinal plants as therapeutic agents for cancer treatment, In: *Punjab Univ. J. Zool.*, 31 (2),2016: pp. 295-305. Issn 2313-8556.
- SHIKHA, S., ARTI, M., KARTIKEYA, S. et al. Food Contamination: it's stages and Associated Illness. In: *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences (IJPCBS)*. 10(4), 2020: pp.116-128. ISSN: 2249-9504.

- SILVÁN, J. M., MINGO, E., HIDALGO, M. et al. Antibacterial activity of a grape seed extract and its fractions against *Campylobacter* spp., In: *Food Control*, 29 (1), 2013: pp. 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.063>.
- SOFOWORA, A., OGUNBODEDE, E., ONAYADE, A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. In: *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 10(5), 2013: pp.210-29. doi: [10.4314/ajtcam.v10i5.2](https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.2).
- SOLIMAN, T.N., MOHAMMED, D.M., EL-MESSERY, T.M. et al. Microencapsulation of plant phenolic extracts using complex coacervation incorporated in ultrafiltered cheese against AlCl₃-induced neuroinflammation in rats. In: *Front. Nutr.*, 9, . 2022: p. 929977. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.929977>.
- SOLTANZADEH, M., PEIGHAMBARDUST, S.H., GHANBARZADEH, B. Chitosan nanoparticles as a promising nanomaterial for encapsulation of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract as a natural source of antioxidants. In: *Nano-materials*, 11, 2021: p.1439. <https://doi.org/10.3390/nano11061439>.
- SOODAM, K., ONG, L., POWELL, I.B. et al. Effect of rennet on the composition, proteolysis and microstructure of reduced-fat Cheddar cheese during ripening. In: *Dairy Science & Technology*. 95, 2015: pp. 665–686. DOI 10.1007/s13594-015-0250-5.
- STURZA, R., SANDULACHI, E., COJOCARI, D. et al. Antimicrobial properties of berry powders in cream cheese, In: *Journal of Engineering Science*. 26(3), 2019: pp. 125 – 136. DOI: 10.5281/zenodo.3464222.
- SUKARDI, PULUNGAN, M.H., PURWANINGSIH, I. et al. Extraction of phenolic compounds from basil (*Ocimum americanum* L.) leaves with pretreatment using pulsed electric field (PEF). In: *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 475, 2020: p. 012056. DOI 10.1088/1755-1315/475/1/012056.
- SURIYAPROM, S., MOSONIP., LEROY, S., et al. Antioxidants of Fruit Extracts as Antimicrobial Agents against Pathogenic Bacteria. In: *Antioxidants*. 11(3), 2022: p. 602. <https://doi.org/10.3390/antiox11030602>.
- TADIĆ, V.M., DOBRIĆ, S., MARKOVIĆ, G.M. et al. Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. In: *J Agric Food Chem.*, 56(17), 2008: pp. 7700-9. doi: [10.1021/jf801668c](https://doi.org/10.1021/jf801668c).
- TANG, Q.L., KANG, A.R., LU, C.X. Phytochemical Analysis, Antibacterial Activity and Mode of Action of the Methanolic Extract of *Scutellaria barbata* Against Various Clinically Important Bacterial Pathogens. In: *Int. J. Pharmacol.*, 12, 2016: pp.116–125. doi: [10.3923/ijp.2016.116.125](https://doi.org/10.3923/ijp.2016.116.125).
- TANWAR, S.R., PHADKE, P. R., MAYDEO, H.M. et al. Antibacterial Activity of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against Pathogenic Microbes. In: *International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology (IJARSCT)*, 2(3), 2022: pp. 211-215. doi: 10.48175/IJARSCT-3089.
- TEH, C.H., NAZNI, W.A., NURULHUSNA, A.H. et al. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. In: *BMC Microbiol*, 17, 2017: p. 36. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0936-3>.

- THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. In: *J. Food Compos. Anal.*, 19, 2006: pp. 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>.
- THANNER, S., DRISSNER, D., WALSH, F. Antimicrobial resistance in agriculture. In: *mBio*. 7(2), 2016: pp.02227-15. <https://doi:10.1128/mBio.02227-15>.
- The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy (CDDEP), The State of the World's Antibiotics 2021, A Global Analysis of Antimicrobial Resistance and Its Driver. (CDDEP), Inc. 2021, www.cddep.org and <https://resistancemap.cddep.org/>.
- THOMAS, M.K., MURRAY, R., FLOCKHART, L. et al. Estimates of the burden of foodborne illness in Canada for 30 specified pathogens and unspecified agents, circa 2006. In: *Foodborne Pathog Dis.*, 10(7), 2013: pp. 639-48. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1389>.
- TISEO, K., HUBER, L., GILBERT, M., et al. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030. In: *Antibiotics*. 9(12), 2020: p. 918. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120918>.
- TOMÉ, A.C., da SILVA, F.A. Alginate based encapsulation as a tool for the protection of bioactive compounds from aromatic herbs. In: *Food Hydrocolloids for Health*. 2, 2022: p.100051. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100051>.
- UDDIN, T.M., CHAKRABORTY, A.J., KHUSRO, A. *Journal of Infection and Public Health* 14(12), 2021: pp.1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>.
- ULREY, R.K., BARKSDALE, S.M., ZHOU, W. et al. Cranberry proanthocyanidins have anti-biofilm properties against *Pseudomonas aeruginosa*. In: *BMC Complement. Altern. Med.*, 14, 2014: p. 499. doi: [10.1186/1472-6882-14-499](https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-499).
- VÅGSHOLM, I., ARZOOMAND, N.S., BOQVIST, S. Food Security, Safety, and Sustainability - Getting the Trade-Offs Right. In: *Frontiers in Sustainable Food System*, 4, 2020. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00016>.
- VENTOLA, C.L., The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. In: *Pharmacy and Therapeutics*. 40(4), 2015: pp.277-83. PMID: 25859123; PMCID: PMC4378521.
- VIDOVIC, N., VIDOVIC, S. Antimicrobial Resistance and Food Animals: Influence of Livestock Environment on the Emergence and Dissemination of Antimicrobial Resistance. In: *Antibiotics (Basel)*. 9(2), 2020: p.52. DOI: [10.3390/antibiotics9020052](https://doi.org/10.3390/antibiotics9020052).
- VLAICU, P.A., UNTEA, A.E., TURCU, R.P. et al. Nutritional composition and bioactive compounds of basil, thyme and sage plant additives and their functionality on broiler thigh meat quality. In: *Foods*. 11, 2022: p. 1105. <https://doi.org/10.3390/foods11081105>.
- WERAGAMA, D., WEERASINGHA, V., JAYASUMANA, L. et al. The physicochemical, micro- biological, and organoleptic properties and antioxidant activities of cream cheeses fortified with dried curry leaves (*Murraya koenigii* L.) powder. In: *Food Sci Nutr.*, 9, 2021: pp. 5774–5784. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2551>.
- WISDOM, O.I.-J., OMONIGBEHIN, E.A., EMEKA E. J. I. et al. In: *Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 331, 2019: 012029. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/331/1/012029/pdf>.
- World Health Organisation (WHO) estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015. In: *Foodborne*

- disease burden epidemiology reference group 2007-2015*, World Health Organization, 2015. 265 p. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/?sequence=1>.
- World Health Organisation (WHO), *Food Safety*, [online] [accesat 04.02.2024] Disponibil: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>.
- World Health Organisation (WHO), Antimicrobial resistance, 2021, [online] [accesat 08.02.2024] Disponibil: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- World Health Organisation (WHO), WHO steps up action to improve food safety and protect people from disease, [online] [accesat 20.03.2024] Disponibil: <https://www.who.int/news/item/07-06-2021-who-steps-up-action-to-improve-food-safety-and-protect-people-from-disease>
- WU, T., ZANG, X., HE, M., et al. Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-Escherichia coli activity and inhibition of DNA gyrase. In: *J Agric Food Chem.*, 61(34), 2013: pp. 8185-90. [10.1021/jf402222v](https://doi.org/10.1021/jf402222v).
- WU, G., YUAN, Q., WANG, L., et al. Epidemiology of foodborne disease outbreaks from 2011 to 2016 in Shandong Province, China. In: *Medicine (Baltimore)*, 97(45), 2018: e13142. doi: 10.1097/MD.00000000000013142. PMID: 30407341; PMCID: PMC6250508.
- WU, T., HE, M., ZANG, et al. A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. In: *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.*, 1828, 2013: pp. 2751–2756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.029> 113.
- XIONG, L.G., CHEN, Y.J., TONG, J.W. et al. Tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits Escherichia coli by increasing endogenous oxidative stress. In: *Food Chem.*, 217, 2017: pp. 196–204. doi: [10.1016/j.foodchem.2016.08.098](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.098).
- XU, Y., BURTON, S., KIM, C. et al. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. In: *Food Sci Nutr.*, 4(1), 2016: pp. 125–133. doi: [10.1002/fsn3.264](https://doi.org/10.1002/fsn3.264).
- YANG, N., WANG, R., RAO, P. et al. The fabrication of calcium alginate beads as a green sorbent for selective recovery of Cu(II) from metal mixtures. In: *Crystals*. 9, 2019: p. 255. <https://doi.org/10.3390/cryst9050255>.
- YI, O., JOVEL, E.M., TOWERS, G.H. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of native *Rosa* sp. from British Columbia, Canada. In: *Int J Food Sci Nutr.*, 58(3), 2007: pp. 178-89. doi: [10.1080/09637480601121318](https://doi.org/10.1080/09637480601121318).
- YI, S., ZHU, J., FU, L. et al. Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane. In: *Int. J. Food Microbiol.*, 144, 2010: pp. 111–117. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.005](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.005).
- YEDDES, W., MAJDI, H., SABER, K. et al. Antibacterial activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and ethanol extract. In: *International Journal of Multidisciplinary Studies*. 3(1), 2022: pp.1-008. doi: [10.53022/oarjms.2022.3.1.0073](https://doi.org/10.53022/oarjms.2022.3.1.0073).
- ZHANG, L., XU, S., LIANG, W. et al. Antibacterial Activity and Mode of Action of *Mentha arvensis* Ethanol Extract against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. In: *Trop. J. Pharm. Res.* 14, 2015: p.2099. [10.4314/tjpr.v14i11.21](https://doi.org/10.4314/tjpr.v14i11.21).

- ZHANG, L.L., ZHANG, L.F., XU, J.G. Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.). In: *Scientific Report*. 10, 2020: p.8876 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65802-7>.
- ZHAO, X., DRLICA, K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. In: *Current Opinion in Microbiology (COMICR)*. 21, 2014: pp.1-6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.008>.
- ZHENG, M., ZHANG, R., TIAN, X., et. al. Assessing the Risk of Probiotic Dietary Supplements in the Context of Antibiotic Resistance, In: *Front. Microbiol.*, 8, 2017: p.908. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00908>.
- Programul național pentru supravegherea și combaterea rezistenței antimicrobiene pentru anii 2019-2028 (502/MSMPS/2019) [online] [accesat 20.02.2024] Disponibil: https://cancelaria.gov.md/sites/default/files/document/attachments/proiectul_502.pdf.
- SM EN ISO 4833-1: 2014. *Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Metoda orizontală pentru enumerarea microorganismelor*. Aprobat 2014-09-06. Chișinău: MAIA, 2014. 21p.
- SM ISO 4831:2010. *Microbiologia alimentelor și furajelor. Metodă orizontală pentru detectarea și enumerarea bacteriilor coliforme*. Aprobat 2014-09-06. Chișinău: MAIA, 2014. 11p.
- ISO 6579-1:2017. *Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Metoda orizontală pentru detectarea bacteriilor de genul Salmonella spp.*. Aprobat 2014-09-06. Chișinău: MAIA, 2014. 50p.
- SO 6888-3:2011. *Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Metoda orizontală pentru numărarea stafilococilor coagulază-pozitivi (Staphylococcus aureus și alte specii)*. Aprobat 2014-09-06. Chișinău: MAIA, 2014. 11p.
- SM SR EN ISO 11290-2:2013. *Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Metodă orizontală pentru detectarea și numărarea Listeria monocytogenes*. Partea 2: Metoda de numărare. Aprobat 2014-09-06. Chișinău: MAIA, 2014. 36p.
- SM ISO 21527-1:2011 *Microbiologia produselor alimentare și furajelor. Metodă orizontală pentru enumerarea drojdiilor și mucegaiurilor*. Aprobat 2014-09-06. Chișinău: MAIA, 2014.8p.
- ISO 1211:2010/IDF 1:2010; *Milk—Determination of Fat Content—Gravimetric Method (Reference Method)*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland: 2010.
- ISO 5534:2004/IDF 4:2004; *Cheese and Processed Cheese—Determination of the Total Solids Content (Reference Method)*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland: 2004.
- ISO 22935-3:2009/IDF 99-3:2009; *Milk and Milk Products—Sensory Analysis—Part 3: Guidance on a Method for Evaluation of Compliance with Product Specifications for Sensory Properties by Scoring*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland: 2009.
- ISO 8586:2012; *Sensory Analysis—General Guidelines for the Selection, Training and Monitoring of Selected Assessors and Expert Sensory Assessors*. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland: 2012.

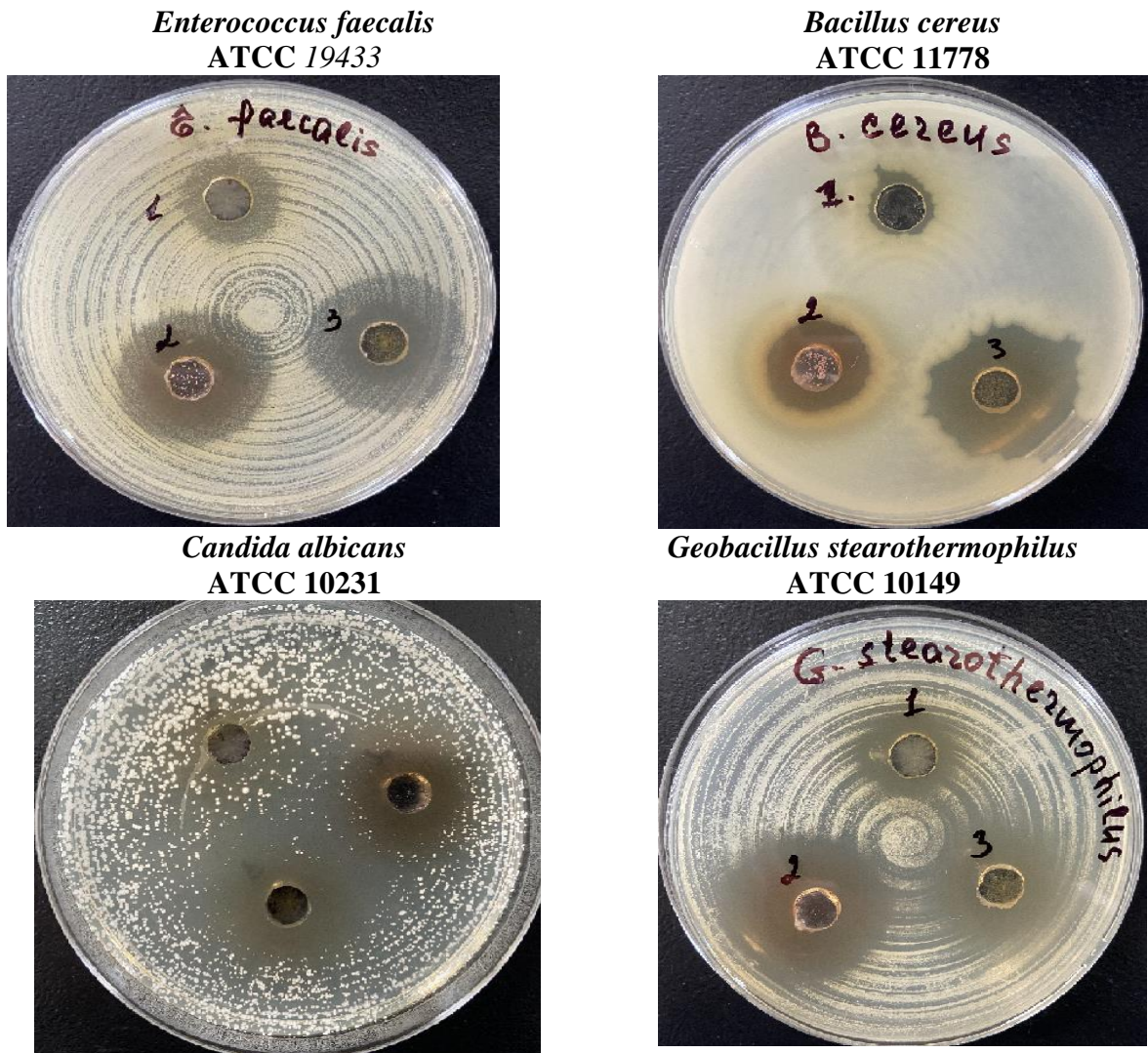


Fig. A1. Activitatea antimicrobiană a plantelor asupra bacteriilor patogene:
1. busuioc; 2. rozmarin; 3. cimbru

Tabelul A1. Evoluția dezvoltării microorganismelor în timpul păstrării crenvurștilor cercetate cu diferite adaosuri vegetale

Numărul de microorganisme*	Probe de crenvuște cu diferite adaosuri de materia vegetală						
	Proba martor	Cătină 0,25%	Păducel 0,25%	Păducel 0,5%	Păducel 1,0%	Măceș 0,25%	Măceș 0,5%
După prima zi de fabricare							
NTGMAFA	9	6	3	6	3	7	6
Bacterii coliforme	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-
După trei zile de la fabricare							
NTGMAFA	123	6	24	10	8	8	7
Bacterii coliforme	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-
După șapte zile de la fabricare							
NTGMAFA	178	39	85	46	10	31	13
Bacterii coliforme	-	-	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-

Notă: „-”, – lipsa izolării; NTGMAFA – numărul total de germeni mezofili aerobi și facultativ anaerobi; * numărul de colonii dezvoltate din diluția 10⁻² în 1g produs; Bacterii coliforme – în 1g produs; S. aureus – în 1g produs; Salmonella spp. – în 25 g produs

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, COJOCARI Daniela, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Numele, prenumele COJOCARI Daniela

Semnătura



Data

10.06.2024

CURRICULUM VITAE



Informații personale

Nume, prenume	COJOCARI DANIELA
Adresă	Str. Constantin Vârnab nr. 19/4, ap. 19, Chișinău, R. Moldova, cod MD 2025
Telefoanoane	Servicu: (+37322)205579; Mobil: (+37369)170829
E-mailuri	daniela.cojocari@usmf.md ; cojocari_daniela@yahoo.com
Naționalitate	Republica Moldova
Data nașterii	11 februarie 1973
Sex	Feminin
Experiența profesională	
Perioada	2001 – prezent (prima)
Funcția sau postul ocupat	asistent universitar, Departament: Medicina Preventivă, Disciplina Microbiologie microbiologie și imunologie
Numele și adresa angajatorului	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova
Tipul activității sau sectorul de activitate	
Perioada	2012- prezent (a doua)
Funcția sau postul ocupat	Asistent universitar, compartimentii (secția) engleză
Numele și adresa angajatorului	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu, Republica Moldova
Tipul activității sau sectorul de activitate	
Educație și formare	
Perioada	2018
Calificarea/diploma obținută	Stagiu de perfecționare profesională și didactică
Numele și tipul instituției de învățământ/Furnizorul de formare	UMFT(Timișoara), Universitatea de Medicină și Farmacie “Victor Babes”
Perioada	2012

Calificare/diploma obținută	Stagiu de perfecționare profesională și didactică
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	UMP „Iuliu Hatieganu”, Cluj-Napoca, Romania, training internship (certificate no. 679)
Perioada	2012
Calificare/diploma obținută	“Psihopedagogia învățământului superior”
Numele și tipul instituției de învățământ/Furnizorul de formare	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova
Perioada	2006-2008
Calificarea / diploma obținută	Diplomă de Licență AL Nr. 002924 01.10.2008 /Bacteriolog
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Microbiologie/Medic microbiolog
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova
Perioada	1997 – 1999
Calificarea / diploma obținută	Diplomă de magistru AM Nr. 0015 01.10.1999/
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Microbiologie Teza de diplomă „Metode moderne de diagnostic al infecțiilor cauzate de chlamydia”
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova
Perioada	1991 - 1997
Calificarea / diploma obținută	Diplomă AS Nr. 000292. 25.06.97
Disciplinele principale studiate / competențe profesionale dobândite	Medicină Generala/medic de profil general
Numele și tipul instituției de învățământ / furnizorului de formare	Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova
Aptitudini și competențe personale	Spirit organizațional și leadership dobândit prin formare în cercetare și management educațional. Abilitatea de a interacționa cu cei din jur, flexibilitate, empatie față de persoane, comunicabilă.
Limba maternă	Română
Limbi străine cunoscute	Rusa, engleza, franceza

Autoevaluare	Înțelegere		Vorbire		Scriere
	Ascultare	Citire	Participare la conversație	Discurs oral	
Limba rusă	C2	C2	C2	C2	C2
Limba engleză	B2	B2	B2	B2	B2
Limba franceză	B1	B1	B1	B1	B1
Competențe și aptitudini organizatorice	<ul style="list-style-type: none"> • Lucru în echipă • Punctualitate • Colaborare națională și internațională • Coordonare 				
Competențe și aptitudini PC	Windows, MS Office applications: Word, Power Point.				
Informații suplimentare	<ol style="list-style-type: none"> 1. Membru al Societății de Microbiologie din Moldova. 2. Membru al Asociației de Biosiguranță și Biosecuritate din Republica Moldova,,” 3. Proiectul de Stat 18.51.07.01 A_PS "Diminuarea contaminării materiei prime și produselor alimentare cu microorganisme patogene"; perioada de desfășurare: 01.01.2018 – 31.12.2020; funcția – cercetător științific 4. Proiectul de Stat 20.80009.510709 ”Ameliorarea calității și siguranței alimentelor prin biotehnologie și inginerie alimentară”. 				