Aurelia Coroian Cristian Ovidiu Coroian

BIVOLIŢA

SURSĂ IMPORTANTĂ DE LAPTE

Editura Bioflux, Cluj-Napoca
2009

ISBN 978-606-92029-8-2

Autorii: Aurelia Coroian
Cristian Ovidiu Coroian

Referenţi ştiinţifici: Prof. dr. ing. Gheorghe Mureşan
Prof. dr. ing. Vioara Mireşan

Director editură:
Cercet. dr. IOAN VALENTIN PETRESCU-MAG

Consilier editorial:
Lector dr. RUXANDRA MĂLINA PETRESCU-MAG

ISBN 978-606-92029-8-2

Editura Bioflux,Cluj-Napoca
2009

CUPRINS

INTRODUCERE	5
CAPITOLUL 1 **EXPLOATAREA BIVOLIŢELOR PENTRU PRODUCŢIA DE LAPTE**	6
1.1EXPLOATAREA BIVOLIŢELOR PENTRU PRODUCŢIA DE LAPTE LA FERMA TNP MESENDORF	6
1.1.1 HRĂNIREA BIVOLIŢELOR	6
1.1.2 TEHNOLOGIA DE MULS A BIVOLIŢELOR	9
1.1.3 TEHNOLOGIA DE ÎNTREŢINERE	11
1.2 CREŞTEREA BUBALINELOR PENTRU PRODUCŢIA DE LAPTE ÎN JUDEŢUL SĂLAJ	17
1.2.1 SCURT ISTORIC ŞI AŞEZARE	17
1.2.2 ÎNTREŢINEREA BIVOLIŢELOR	19
CAPITOLUL 2 **CALITATEA LAPTELUI ŞI SIGURANŢA ALIMENTARĂ**	22
2.1 ASPECTE GENERALE	22
2.1.1 IDENTIFICAREA RISCURILOR	27
2.2 LEGISLAŢIA EUROPEANĂ ŞI INTERNAŢIONALĂ CU PRIVIRE LA SIGURANŢA ALIMENTARĂ	28
CAPITOLUL 3 **CERCETĂRI PRIVIND VALOAREA PARAMETRILOR FIZICO-CHIMICI AI LAPTELUI DE BIVOLIŢĂ**	32

3.1 ASPECTE GENERALE	32
3.1.1 ÎNSUŞIRILE FIZICO-CHIMICE ALE LAPTELUI DE BIVOLIŢĂ LA FERMA TNP MESENDORF	33
3.1.1.1 REZULTATE ŞI DISCUŢII	33
CAPITOLUL 4 CERCETĂRI PRIVIND PARAMETRII MICROBIOLOGICI AI LAPTELUI DE BIVOLIŢĂ	62
4.1 ASPECTE GENERALE	62
4.2.1 DETERMINAREA NUMĂRULUI DE CELULE SOMATICE DIN LAPTELE DE BIVOLIŢĂ	63
4.2.2 DETERMINAREA NUMĂRULUI TOTAL DE GERMENI	66
4.2.3 DETERMINAREA NUMĂRULUI TOTAL DE DROJDII ŞI MUCEGAIURI	72
4.2.4 DETERMINAREA PREZENŢEI ŞI A NUMĂRULUI DE STAFILOCOCI COAGULAZO POZITIVI	73
4.2.5 IZOLAREA ŞI IDENTIFICAREA SALMONELLELOR	74
4.2.6 EVIDENŢIEREA BACTERIILOR COLIFORME ŞI ESCHERICHIEI COLI	77
4.2.6.1 MATERIAL ŞI METODĂ	77
4.2.6.2 MEDII DE CULTURĂ, REACTIVI ŞI SOLUŢII DE DILUARE	82
BIBLIOGRAFIE	93
ANEXE	101

INTRODUCERE

În economia agricolă naţională, o importanţă deosebită o reprezintă creşterea şi exploatarea bubalinelor, domeniu care este şi va fi mereu în atenţia specialiştilor. Potenţialul de producţie al populaţiilor existente variază foarte mult de la o zonă de creştere la alta, este direct influenţat de valoarea biologică a animalelor, de programul de ameliorare, de direcţiile de exploatare şi tehnologia de creştere adaptate corespunzător condiţiilor social-economice specifice zonei.

O retrospectivă asupra numeroaselor specii de animale domestice, relevă că fiecare dintre acestea a constituit pentru omenire o sursă materială vitală, cu importanţă zonală specifică diferită, determinată de condiţiile istorico-naturale şi de particularităţile caracteristice evoluţiei societăţii în timp. În consecinţă, rasele şi populaţiile existente în prezent în cadrul fiecărei specii de bovine, poartă adânc întipărită amprenta factorilor de mediu şi de asemenea, a activităţii continue şi dirijate a omului **(Velea C., 2006)**.

Extinderea bubalinelor în afara ariei de formare a fost determinată de nivelul de dezvoltare social-economic al teritoriilor de referinţă şi de faptul că până nu demult, bubalinele au fost în general considerate ca o specie care nu este foarte pretenţioasă faţă de condiţiile de exploatare. Bubalinele, datorită capacităţii de valorificare a diferitelor categorii de furaje pe care alte specii nu le valorifică corespunzător.

CAPITOLUL 1

EXPLOATAREA BIVOLIŢELOR PENTRU PRODUCŢIA DE LAPTE

1.1 EXPLOATAREA BIVOLIŢELOR PENTRU PRODUCŢIA DE LAPTE LA FERMA TNP MESENDORF

Tehnologia de exploatare a bivoliţelor la ferma TNP Mesendorf, care este considerată şi atestată ca având caracter ecologic, este orientată în direcţia producţiei de lapte şi se au în vedere îmbunătăţirea condiţiilor de hrănire, bunăstarea animalelor şi îmbunătăţirea condiţiilor de producere a laptelui prin introducerea mulsului mecanizat.

1.1.1. Hrănirea bivoliţelor

Hrănirea bivoliţelor este un factor care are implicaţii profunde asupra producţiei de lapte. Tehnica de hrănire la ferma TNP Mesendorf este diferenţiată în funcţie de sezon. Baza furajeră este asigurată din surse proprii. Ferma TNP Mesendorf are o suprafaţă agricolă totală de 682 ha şi un efectiv de bivoliţe aflate în lactaţie de 145 de capete. Terenurile ocupate de pajişti prezintă caracteristicile zonei submontane şi se află la etajul fagului. Suprafaţa de teren ocupată cu pajişti asigură necesarul de nutreţ verde pentru perioada de vară şi iarna pentru nutreţuri voluminoase.

În perioada de stabulaţie se folosesc nutreţuri conservate din stoc: fân de calitate bună şi ovăz în cantităţi mai reduse. În perioada de păşunat, nutreţul de bază îl constituie masa verde de pe păşune,

suplimentată cu o cantitate de 3-4 kg ovăz/cap/zi în timpul mulsului. La animalele în lactaţie se administrează minerale, magiseau care este un premix organic acceptat într-o fermă ecologică. Programul de hrănire este respectat cu stricteţe datorită faptului că bivoliţele sunt animale dificile şi orice schimbare poate să conducă la scăderi ale producţiei de lapte. **Velea C., 2006** spune că la întocmirea raţiilor este necesar să avem în vedere şi asigurarea unui raport favorabil între acizii graşi volatili formaţi în rumen, scop în care raţia trebuie să conţină între 18-22% celuloză, aceasta având un efect favorabil asupra conţinutului laptelui în grăsime.

Figura 1.1.1 (a, b) Hrănirea bivoliţelor în sezonul de iarnă la ferma TNP Mesendorf

Figura 1.1.2 Aspecte privind păşunatul bivoliţelor şi utilizarea gardului electric

1.1.2 Tehnologia de muls a bivoliţelor

Sistemul de muls aplicat este cel mecanizat, în sala de muls cu opt capete. La practicarea mulsului se respectă normele de igienă deoarece şi personalul este stimulat din punct de vedere financiar în funcţie de calitatea laptelui (numărul de celule somatice şi numărul total de germeni).

Introducerea mulsului mecanizat a avut manifestări individuale şi foarte variabile: bivoliţele primipare au fost obişnuite uşor cu mulsul mecanizat comparativ cu cele multipare la care a fost mai dificil.

În cadrul fermei se urmăreşte creşterea producţiei de lapte atât din punct de vedere calitativ, cât şi cantitativ prin calificarea şi conştiinciozitatea personalului de deservire, şi prin perfecţionarea funcţională a aparatelor de muls deoarece actuala sală de muls o să fie înlocuită cu alta mult mai performantă şi pentru un număr mai mare de capete, deoarece în prezent datorită numărului mic de capete care pot fi mulse odată, mulsul pentru întreg efectivul aflat în lactaţie durează câteva ore.

În timpul verii la ferma TNP Mesendorf s-a încercat utilizarea gardului electric. Acest procedeu a fost dificil la început, dar cu timpul aceste probleme au dispărut (figura 1.1.2).

Figura 1.1.3 Aspecte privind mulsul mecanic la bivoliţe

Figura 1.1.4 Sala de muls

Mulsul mecanic are la bază următoarele principii:

- ✓ pregătirea mulgătorului;

- ✓ pregătirea bivoliţei pentru muls prin spălarea ugerului cu apă caldă şi ştergerea acesteia cu un prosop curat;
- ✓ ataşarea paharelor de muls;
- ✓ spălarea şi dezinfecţia instalaţiilor;

1.1.3 Tehnologia de întreţinere

Întreţinerea subînţelege ansamblul de măsuri tehnico-organizatorice de adăpostire şi deservire a materialului biologic de exploatare, în vederea asigurării condiţiilor optime de exteriorizare a potenţialului său de producţie. Corespunzător condiţiilor zonale specifice sistemului de întreţinere a bivoliţelor de lapte diferă în funcţie de sezon, respectiv de amenajările interioare pe care le comportă diferitele tipuri de adăposturi adoptate **(Velea C., 2006)**.

Figura 1.1.5. a - Padocul de mişcare

b,c - Aspecte privind întreţinerea bivoliţelor în adăposturi închise

Întreţinerea bivoliţelor în sezonul de iarnă la ferma TNP Mesendorf este relizată în adăposturi închise cu întreţinere liberă, cu cuşete individuale; pentru construcţia lor s-a folosit lemnul de mesteacăn, care este un material foarte rezistent, flexibil şi sigur. Padocurile de mişcare sunt amplasate lângă adăpost şi permit accesul direct al animalelor şi sunt dispuse pe o singură parte a adăpostului.

Întreţinerea bivoliţelor în sezonul de vară este realizată în sistem mixt. Acest sistem este foarte avantajos pentru această fermă datorită faptului că pajiştea este situată la o distanţă foarte mică de adăposturi. După efectuarea mulsului de dimineaţă bivoliţele sunt scoase la păşune, unde există apă pentru adăpare şi îmbăiere şi revin doar seara pentru muls şi adăpostire.

Îngrijirea bivoliţelor întruneşte un complex de măsuri tehnico-organizatorice deosebite, care au implicaţii directe asupra sănătăţii şi nivelului de producţie şi care vizează îndeosebi regimul de odihnă, de mişcare şi de îngrijire corporală **(Velea C., 2006)**.

Pentru bivoliţele producătoare de lapte respectarea regimului de odihnă este foarte importantă pentru a fi posibilă derularea normală a proceselor metabolice. Alături de regimul de odihnă este necesară şi mişcarea, care influenţează derularea normală a proceselor biologice, stimulează activitatea sistemului respirator, circulator, funcţia de reproducţie, precum şi dezvoltarea armonioasă a musculaturii. Pentru bivoliţele întreţinute pe păşune în timpul iernii se consideră că mişcarea efectuată este suficientă, iar în timpul iernii sunt scoase pe padocul amplasat lângă adăpost pentru efectuarea mişcării zilnice. În sezonul de vară datorită temperaturilor ridicate, pe păşune sunt locuri unde există

posibilitatea îmbăierii, deoarece temperaturile ridicate pot produce scăderea producţiei de lapte, reducerea apetitului şi modificări ale indicilor fiziologici.

Ca urmare a particularităţilor morfofuncţionale ale pielii şi a coeficientului mai scăzut de toleranţă faţă de căldură a bubalinelor, în sezonul de vară şi îndeosebi în perioadele mai calde ale acestuia, o măsură importantă o reprezintă asigurarea posibilităţilor de îmbăiere sau de duşare a bivoliţelor **(Rhoad, Asker, Ragab, Chany citaţi de Velea C., 2006)**.

Anexele adăposturilor sunt: padocuri, magazie, sala de muls, platforma de gunoi, lăptărie şi silozuri. Grajdurile sunt construite din cărămidă. Condiţiile de microclimat sunt asigurate la parametrii normali. Igiena adăpostului este asigurată prin evacuarea dejecţiilor zilnic, o dată sau de două ori pe zi. Întreţinerea tineretului se realizează în sistem mixt, în timpul zilei pe păşune de foarte bună calitate şi noaptea în adăpost. Acest sistem are unele avantaje: posibilitatea de mişcare a animalelor, posibilitatea de a sta la soare şi în aer curat.

Alimentaţia cu apă este asigurată la discreţie cu ajutorul adăpătorilor automate. Principala sursă de hrană pentru tineretul bubalin o reprezintă nutreţurile voluminoase, iar concentratele sunt asigurate în cantităţi mai reduse în funcţie de vârsta animalelor.

În sezonul de vară, regimul de hrănire se realizează prin întreţinerea tineretului pe păşune, cu posibilitatea de a consuma masa verde la discreţie şi administrarea de concentrate se face seara, în adăpost. Păşunea este de calitate superioară, supraînsămânţată, cu acces direct la sursa de apă. Trecerea de la sistemul de stabulaţie la cel de

păşunat (sau invers) se relizează treptat, pentru a nu influenţa negativ organismul şi producţiile animalelor.

Având în vedere particularităţile specifice simbionţilor ruminali (a micro şi macrofaunei ruminale), în toate cazurile trecerea de la un regim de hrănire la altul sau la schimbarea structurii nutreţurilor din raţie prin introducerea unor furaje noi, se face cu o perioadă obligatorie de acomodare, a cărei durată depinde de natura furajului respectiv **(Velea C., 2006)**.

Aprecierea producţiei de lapte la bubaline: o importanţă majoră în realizarea unui progres în ceea ce priveşte performanţa în producţie şi exploatare o constituie realizarea controlului oficial al producţiei. Datorită faptului că numărul total de bivoliţe cuprinse în controlul oficial al producţiei (COP) este foarte redus la ferma luată în studiu, controlul se realizează lunar de către personalul desemnat acestei acţiuni.

Figura 1.1.6 a - Padocul de mişcare şi însorire pentru tineretul bubalin
b, c - Întreţinerea tineretului în adăposturi închise în sezonul de iarnă

1.2 CREŞTEREA BUBALINELOR PENTRU PRODUCŢIA DE LAPTE ÎN JUDEŢUL SĂLAJ

1.2.1 Scurt istoric şi aşezare

Situându-se în nord-vestul României, la trecerea dintre Carpaţii Estici şi Munţii Apuseni, judeţul Sălaj este cunoscut din vremuri străvechi ca Ţara Silvaniei, adică Ţara Pădurilor, având o suprafaţă de 3850 km² şi având ca vecini la nord judeţele Satu-Mare şi Maramureş, la vest şi sud-vest judeţul Bihor şi la sud-est judetul Cluj.

Municipiul Zalău, care se găseşte în centrul judeţului este reşedinţa administrativă a judeţului. Aceasta este una dintre primele asezări din Transilvania menţionat în documente. În judeţ se găsesc 55 comune şi 281 sate. Judeţul are o populaţie de 262.873 locuitori, dintre care 70932 locuitori în Zalău.

Figura 1.1.7 Judeţul Sălaj. Comunele de unde au fost prelevate probele de lapte de bivoliţă

Din punct de vedere geografic, judeţul Sălaj este o zonă cu dealuri şi văi de-a lungul râurilor Almaş, Agrij, Someş, Sălaj, Crasna şi Barcău. Munţii sunt reprezentaţi la sud-vest de două ramificaţii ale Munţilor Apuseni: Vârfurile Meseş şi Plopiş. Depresiunile ocupă o parte însemnată din teritoriul judeţului, zone agricole importante cu numeroase aşezări. Clima judeţului Sălaj este sub influenţa maselor de aer de la est, fiind o climă continentală. Temperatura medie anuală

variază între 6°C şi 9°C depinzând de zonă, cea mai ridicată valoare medie a temperaturii înregistrându-se în judeţ în luna iulie, variind între 15°C şi 20°C. Cantitatea de precipitaţii scade spre vest, unde se înregistrează 700-800 ml/mp.

1.2.2 Întreţinerea bivoliţelor

Adăposturile pentru bubaline sunt de capacitate mică, în medie pentru 3-4 capete de vârste diferite. Caracteristicile constructive sunt diferite în funcţie de posibilităţile de furajare şi adăpare. Evacuarea dejecţiilor se realizează manual. În asemenea condiţii posibilităţile de menţinere a cerinţelor igienice sunt reduse, iar încărcătura aerului cu microorganisme este mare datorită faptului că se execută operaţiuni de furajare, aşternut, curăţenie într-un spaţiu foarte redus. Microclimatul în adăposturi este influenţat de factori fizici, chimici şi biologici.

Factorii fizici au cea mai mare pondere şi impun reacţii de adaptare din partea animalelor, cu consecinţe asupra nivelului producţiilor şi stării de sănătate a bubalinelor. Atât producţia cantitativă cât şi calitatea igienică a laptelui de bivoliţă este influenţată de diferiţi factori printre care o mare importanţă o au condiţiile de adăpostire şi condiţiile în care se realizează mulsul.

Parametrii de microclimat din adăposturile bivoliţelor construite în gospodăriile populaţiei nu asigură întotdeauna valorile prevăzute pentru realizarea confortului termic şi condiţiilor de igienă. În situaţiile

când izolarea termică a adăposturilor este deficitară în perioadele reci ale anului, se creează un disconfort termic.

Umiditatea aerului şi viteza de circulaţie intensifică transferul de căldură în ambianţe reci. În adăposturile tradiţionale se produc pierderi de căldură datorită unor structuri constructive neetanşe prin transmisie termică, ventilaţie şi evaporare tehnologică. În unele situaţii se pot atinge valori ce depăşesc confortul termic în cazul disproporţiei dintre volumul de căldură emisă şi pierderile din adăposturi.

Prin adaptarea la aceste efecte bubalinele şi-au creat reacţii metabolice exotermice. Curenţii de aer se formează ca urmare a diferenţelor de temperatură şi presiune între diferite zone ale adăpostului ce au tendinţa de egalizare prin formarea unor mişcări de aer verticale, orizontale sau turbulente.

În ambianţe reci, datorită influenţării barierei izolatoare determină deplasarea temperaturii critice inferioare spre un nivel înalt şi declanşează mecanismele de termoreglare.

Sistemul de muls aplicat este cel manual şi se respectă mai mult sau mai puţin tehnica corectă. Igiena corporală este prevăzută să se realizeze zilnic, dar nu se respectă întotdeauna ca şi programul de mişcare care este insuficient pe timpul iernii.

În perioada iernii, când bivoliţele sunt întreţinute în stabulaţie, sunt prezente şi unele deficienţe în igiena animalelor şi a microclimatului adăposturilor.

Întreţinerea bivoliţelor se realizează în funcţie de sezon: în perioada de stabulaţie se realizează întreţinerea legată, iar în sezonul de

păşunat se realizează întreţinerea liberă. Hrănirea bivoliţelor se realizează diferenţiat în funcţie de sezon.

În perioada de stabulaţie se utilizează nutreţuri diferite: fân, paie, siloz de porumb, dar şi o cantitate redusă de nutreţ concentrat. În timpul păşunatului, nutreţul de bază este masa verde de pe păşune, suplimentată cu puţine concentrate.

Figura 1.1.8 Scăldatul bivoliţelor - Bodia, judeţul Sălaj

CAPITOLUL 2

CALITATEA LAPTELUI ŞI SIGURANŢA ALIMENTARĂ

2.1 ASPECTE GENERALE

În cadrul economiei naţionale industria alimentară îndeplineşte funcţia de a valorifica produsele alimentare, fabricând produse, care să respecte unul dintre obiectivele strategice fundamentale ale dezvoltării economice şi sociale - securitatea alimentară a populaţiei.

Noua abordare, denumită siguranţa alimentelor, se referă la măsurile de protecţie a alimentelor faţă de contaminări microbiene, chimice şi fizice care ar putea să apară de-a lungul întregului lanţ alimentar şi care ar pune în pericol sănătatea consumatorilor. Cu alte cuvinte, măsurile de siguranţă alimentară protejează calitatea produselor alimentare.

Acest obiectiv major al industriei alimentare poate fi obţinut numai prin asigurarea şi îmbunătăţirea continuă a calităţii producţiei. Urmărirea şi realizarea unui astfel de obiectiv în cadrul unor unităţi de dimensiuni mari, cu o tehnologie adaptată unui sistem de organizare a început să ridice probleme încă din anul 1990. Unităţile în cauză nu îşi pot menţine avantajul concurenţial pe piaţă, decât numai printr-un management competent, care să antreneze resursele umane într-un proces de flexibilizare şi diversificare a producţiei, realizate la parametri calitativi care să satisfacă exigenţele consumatorilor.

Orice intreprindere, pentru a putea face faţă cerinţelor pieţei, trebuie să ofere o garanţie a calităţii şi indiferent de dimensiune sau domeniu, îşi poate asigura un viitor sigur, numai prin introducerea unui sistem de management al calităţii, îndreptat spre satisfacerea propriilor nevoi.

Calitatea produsului alimentar este totdeauna percepută prin intermediul obiectivelor concrete pe care acesta trebuie să le atingă, aşa cum au fost menţionate de **(Multon şi col., 1985)**.

Sistemul de management a siguranţei recunoscut pe plan internaţional, care şi-a dovedit eficienţa în toate sectoarele industriei alimentare şi pe tot circuitul alimentar este sistemul H.A.C.C.P.- Hazard Analysis Critical Control Points. Producerea, ambalarea, transportul, depozitarea şi comercializarea produselor alimentare reprezintă operaţii cu un grad de risc pentru sanătatea fiecărui consumator.

Toate organizaţiile care activează în aceste sectoare ce intră în contact direct cu sănătatea consumatorilor trebuie să respecte anumite cerinţe, multe dintre aceastea fiind impuse de legislaţia în vigoare. Integrarea ţării noastre în Uniunea Europeană a impus şi mai multe cerinţe asupra organizaţiilor din sectorul alimentar. În prezent, toate acestea sunt obligate să îşi implementeze un sistem de siguranţă a alimentului - H.A.C.C.P.

H.A.C.C.P. (Hazard Analysis Critical Control Point) este o abordare sistematică, recunoscută la nivel internaţional, ce dovedeşte că riscurile legate de siguranţa produselor alimentare sunt identificate, evaluate şi ţinute sub control. Dovada implementării acestui sistem într-

o organizaţie este certificarea acestuia. Există o serie de standarde în funcţie de care se face această certificare.

H.A.C.C.P. poate fi utilizat în toate segmentele industriei alimentare şi poate fi adoptat pentru orice produs individual sau linie de procesare. Acest sistem prezintă avantajul controlului preventiv a siguranţei alimentului în fabrică începând de la materie primă până la produs finit. Este o metodă ştiinţifică, sistematică, interactivă de identificare, evaluare şi control a riscurilor asociate produselor alimentare**.** Strategia H.A.C.C.P. este axată pe instruirea unui sistem de prevenire, eliminare sau reducere la niveluri apreciabile a riscurilor potenţiale care afectează siguranţa alimentelor. Conceptele care stau la baza sistemului H.A.C.C.P. îşi au originea în cercetările de la începutul anului 1960, efectuate de N.A.S.A., compania Pillsbury în colaborare cu laboratoarele Natick ale Armatei S.U.A, pentru obţinerea de alimente caracterizate prin "zero defecte" destinate consumului în cadrul misiunilor spaţiale.

Astfel, a fost elaborată şi ulterior perfecţionată o metodă foarte valoroasă, care a schimbat modul de abordare a strategiei calităţii şi siguranţei în domeniul producţiei alimentare, realizând trecerea de la controlul post-proces la aplicarea metodelor preventive. Recunoscută la ora actuală, drept cea mai eficientă modalitate de asigurare a salubrităţii produselor alimentare, metoda H.A.C.C.P este promovată de majoritatea organismelor internaţionale (FAO, OMS, Codex Alimentarius), regionale (Consiliul U.E.) şi naţionale.

Membrii Comunităţii Europene au adoptat sistemul calităţii, alături de ţările din America de Nord şi o parte din ţările din Asia.

Numeroase guverne şi companii alocă în prezent resurse considerabile necesare dezvoltării infrastructurilor pentru a fi în conformitate cu aceste standarde. În cazul ţării noastre, obţinerea certificării sistemului calităţii de către intreprinderile procesatoare reprezintă un paşaport care facilitează intrarea cu produse pe piaţa Uniunii Europene. Pentru realizarea acestui deziderat trebuie să se ţină cont de: nivelul tehnologic existent şi al culturii industriale şi de specificul pieţei. În concluzie, asigurarea calităţii produselor sau serviciilor reprezintă factorul principal pentru obţinerea unor succese în competiţie.

Punctele critice de control pot fi localizate în orice etapă a procesului de fabricaţie în care se impune şi este posibilă ţinerea sub control a microorganismelor periculoase sau a riscurilor de altă natură. Ca exemple tipice de puncte critice de control se pot menţiona: stabilirea reţetei de fabricaţie bazată pe considerente igienico-sanitare, tratamente termice, refrigerarea, congelarea, igienizarea utilajelor şi spaţiilor de producţie. O limită critică este definită ca toleranţa admisă pentru un anumit parametru al punctului critic de control. Pentru un punct critic de control pot exista una sau mai multe limite critice.

Dacă oricare dintre aceste limite a fost depăşită, înseamă că punctul critic respectiv a ieşit de sub control şi inocuitatea produsului finit este în pericol. Criteriile cele mai frecvent utilizate ca limite critice sunt valorile temperaturii, timpului, umidităţii, ph-ului, acidităţii.

În cazul unei analize a riscurilor potenţiale, se iau în consideraţie cele 3 tipuri de riscuri (biologice, fizice, chimice) **(Mihaiu M. şi col. 1998)**. În S.U.A. se consideră că recepţia laptelui reprezintă un punct de control economic, pentru conformitate cu specificaţiile, deoarece

există o serie de norme legislative care reglementează compoziţia laptelui.

În perioada pe care o parcurgem, consumatorii devin din ce în ce mai conştienţi de aspectele igienice ale vieţii şi alimentaţiei lor şi de aceea a devenit absolut obligatoriu ca toţi producătorii de alimente să respecte atât exigenţele tehnologice, cât şi pe cele de ordin igienico-sanitar. H.A.C.C.P. implică următoarele: descrierea produsului, identificarea utilizării sale aşteptate, descrierea procedeului, operaţiilor de producţie, de fabricaţie, de distribuţie) şi patru componente. Aceste componente sunt următoarele: evaluarea riscurilor; definirea punctelor critice (etape, operaţii, factori) şi determinările pentru prevenirea, eliminarea sau reducerea fiecărui risc (punctele critice - CCP); asigurarea măsurilor necesare fiecărui CCP (criteriile de execuţie sau limitele critice, interacţiuni în lucru, supravegherea, înregistrarea şi acţiunile colective); verificarea (determinarea eficacităţii sistemului aplicat) **(Arţan C.N., 2007).**

Ţinând cont de cadrul general recomandat de organismele internaţionale prin Regulamentul U.E. nr. 178/2002 şi Reglementarea 852/2004 a Parlamentului European şi a Consiliului U.E. privind igiena produselor alimentare care urmăresc să asigure un sistem unitar de urmărire a calităţii produselor alimentare redând încrederea consumatorului în siguranţa produselor alimentare, la nivelul ţării noastre au fost stabilite o serie de reglementări în măsură să diminueze acţiunea unor factori de risc asupra sănătăţii populaţiei.

În ţara noastră ca reglementări în acest sens menţionăm: H.G. nr. 1198/2002 privind Normele de igienă ale produselor alimentare, Legea

nr. 150/2004, privind siguranţa alimentelor şi H.G. 924/2005 privind aprobarea Regulilor generale pentru igiena produselor alimentare cu rolul de a crea cadrul legislativ referitor la inocuitatea produselor în circuitul alimentelor.

2.1.1 Identificarea riscurilor

Factorii ce trebuiesc luaţi în considerare la analiza riscurilor sunt:

- proprietăţile intrinseci ale produsului în timpul fabricaţiei şi după fabricaţie;
- procesele tehnologice;
- conţinutul microbian în timpul şi după fabricare;
- proiectarea şi amplasarea utilajelor;
- procedee de ambalare;
- tehnici de curăţenie şi dezinfecţie;
- sănătatea, igiena şi instruirea lucrătorilor;
- livrarea şi păstrarea produsului;
- modul de preparare şi consum;
- practicile consumatorilor;

Sistemul de management al calităţii are în vedere:

- controlul calităţii: tehnicile operaţionale folosite în procesul de producţie pentru atingerea calităţii produselor;
- asigurarea calităţii: planificarea, managementul şi adaptarea metodelor şi procedurilor de furnizare a încrederii că produsele şi serviciile respectă cerinţele, standardele de calitate;

2.2 LEGISLAŢIA EUROPEANĂ ŞI INTERNAŢIONALĂ CU PRIVIRE LA SIGURANŢA ALIMENTARĂ

Legislaţia sanitară europeană şi internaţională privind producţia de alimente prevede aplicarea în toate unităţile implicate în producţia, transportul, depozitarea şi servirea alimentelor, a principiilor unui sistem de asigurare a calităţii igienice, bazat pe evaluarea şi prevenirea riscurilor, deci a unui sistem de tip H.A.C.C.P. În Marea Britanie, încă din septembrie 1995, aplicarea sistemului în unităţile care prelucrează sau comercializează alimente a devenit obligatorie, nerespectarea acestei condiţii conducând la închiderea unităţii respective.

Specialiştii au elaborat de asemenea, pe plan naţional şi international, o serie de ghiduri de bune practici de siguranţă alimentară bazate pe aplicarea metodelor H.A.C.C.P. În principal, de origine americană şi canadiană, aceste ghiduri permit utilizatorilor aplicarea într-un domeniu specific a proceducerii H.A.C.C.P. (**Rotaru, G., Moraru, C., 1997**).

Aceste documente descriu pe de o parte, sistemul şi metodologia de aplicare a unei proceduri H.A.C.C.P., apoi detaliază aplicarea acestei proceduri într-un domeniu industrial specific, insistând pe etapele de analiză a riscurilor, de stăpânire a punctelor critice şi de supraveghere. În vederea realizării posibilităţii de aliniere şi integrare a Europei Răsăritene la sistemul internaţional H.A.C.C.P. Organizaţia Mondială a Sănătăţii a organizat o serie de întâlniri (Larnaca Cipru 1990, Budapesta 1990, 1991, Lisabona 1991) la care au participat şi

delegaţi oficiali ai României. Ţara noastră este semnatară a Declaraţiei Finale a Conferinţei Internaţionale de Nutriţie F.A.O./O.M.S. (Roma, 1992) privind "securitatea alimentară" şi "securitatea alimentelor".

În baza recomandărilor internaţionale, a experienţei şi literaturii de specialitate din ţările cu practică în domeniu, precum şi în baza specificului perioadei de tranziţie din România, Institutul de Igienă şi Sănătate Publică Bucureşti (nominalizat de către O.M.S. ca "punct focal H.A.C.C.P." pentru România) în colaborare cu Centrul de Inventică Bucureşti a elaborat un pachet de proiecte - program privind posibilităţile şi perspectivele de implementare progresivă a sistemului internaţional H.A.C.C.P. în ţara noastră. În acest sens, Ministerul Sănătăţii a emis Ordinul nr.1956/18 oct. 1995, publicat în Monitorul Oficial al României nr.59/22 martie 1996 privind introducerea şi aplicarea sistemului HACCP în activitatea de supraveghere a condiţiilor de igienă din sectorul alimentar.

În România, organizaţiile îşi pot certifica sistemul de management H.A.C.C.P. după următoarele 3 referenţiale:

► Codex Alimentarius (Reguli generale şi specifice privind bunele practici de igienă - GHP şi producţie - GMP pentru societăţile ce procesează, transportă depozitează sau comercializează produse alimentare);

► DS 3027E:2002 (document care introduce toate regulile din Codex Alimentarius într-un sistem ce poate fi documentat şi ale cărui performanţe pot fi evaluate);

► ISO 22000 (primul standard internaţional de certificare a sistemului H.A.C.C.P.). Hotărâre H.G. 1198/2002 a fost abrogată de H.G 924/11

august 2005 publicată în M.O. 804 din 05 septembrie 2005 şi aprobă Regulile Generale pentru igiena produselor alimentare.

► Hotărârea de Guvern H.G. 924/2005 ce reglementează condiţiile pe care trebuie să le îndeplinească societăţile, acestea regăsindu-se în Regulile Generale pentru igiena produselor alimentare aprobate de H.G. 924/2005.

► ISO 22000:2005, Sisteme de management ale siguranţei alimentelor. Cerinţe pentru orice organizaţie din lanţul alimentar este proiectat să asigure lanţuri de furnizare a alimentelor sigure la nivel mondial, prin elaborarea unui cadru de cerinţe armonizate la acest nivel, pentru abordarea globală necesară. Standardul a fost elaborat în cadrul ISO de experţii din industria alimentară, împreună cu reprezentanţi ai organizaţiilor internaţionale de specialitate şi în strânsă cooperare cu Comisia Codex Alimentarius, organismul înfiinţat în comun de Organizaţia Naţiunilor Unite pentru Alimentaţie şi Agricultură (FAO) şi de Organizaţia Mondială a Muncii, pentru a elabora standarde în domeniul alimentaţiei.

► Un avantaj major pentru organizaţiile care utilizează ISO 22000 îl constituie faptul că standardul facilitează implementarea sistemului HACCP (Analiza riscurilor în punctele critice de control) al Codex, pentru igiena alimentelor, într-un mod armonizat, şi acoperă cerinţele standardelor celor mai importante, elaborate de diverse sindicate internaţionale ale vânzătorilor cu amănuntul în cadrul unui singur document care nu variază în funcţie de stat sau de produsul alimentar respectiv. În scopul continuării acestui obiectiv, specificaţia tehnică a ISO-ISO/TS 22004, Sisteme de management al siguranţei alimentelor.

Recomandări de aplicare pentru ISO 22000:2005, include o organigramă referitoare la planificarea alimentelor sigure, care combină paşii menţionaţi în Ghidul H.A.C.C.P. al Codex cu cei specifici standardului ISO 9000.

ISO 9000 reprezintă un sistem de management al calităţii, care are scopul de a preveni şi detecta orice neconformitate cu specificaţiile. Specificaţiile produsului trebuie să respecte criteriul inocuităţii. Implementarea impusa de seria de standarde ISO 9000, oferă posibilitatea unităţilor producătoare să realizeze produse şi servicii corespunzatoare normativelor specificate în standarde, precum şi pretenţiile consumatorilor, în cazul alimentelor fiind vorba în principal de: problema securităţii, protecţia mediului înconjurător şi conservarea energiei şi materialelor utilizate.

GMP (Good Manufacturing Practices) - acest sistem se referă la regulile bunelor practici de producţie date de U.S. Food and Drug Administration sub autoritatea Federal Food, Drug, and Cosmetic Act. Aceste reguli şi legi obligă producătorii, procesatorii, ambalatorii să îşi i-a măsuri preventive care să asigure că produsele lor sunt sigure.

În S.U.A., GMP descriu condiţiile şi măsurile pe care organizaţiile trebuie să le urmeze în scopul evitării obţinerii unor produse alimentare periculoase. Utilizarea unor practici bune de lucru (GMP), cuplată cu efectuarea unor analize de laborator ale produsului finit, nu dă întotdeauna rezultatele dorite.

CAPITOLUL 3

CERCETĂRI PRIVIND VALOAREA PARAMETRILOR FIZICO-CHIMICI AI LAPTELUI DE BIVOLIŢĂ

3.1 ASPECTE GENERALE

În contextul problemelor actuale care vizează condiţiile specifice în care se produce şi se valorifică laptele de bubalină de către procesatori, obiectivele cercetărilor care se efectuează sunt orientate în direcţia stabilirii principalelor însuşiri a laptelui de bubalină, materie primă pentru obţinerea diferitelor produse şi efectul diferiţilor factori asupra calităţii laptelui.

Materialul biologic este reprezentat de efectivul de bivoliţe de la ferma TNP Mesendorf, în număr de 138 de capete aflate în lactaţii diferite, precum şi bivoliţe din judeţul Sălaj crescute în condiţii diferite de furajare în funcţie de posibilităţile crescătorilor.

Aferent obiectivelor urmărite în cadrul acestui capitol, a materialului biologic cuprins în cercetare şi a metodologiei de lucru, acestea sunt structurate astfel: un prim aspect se referă la stabilirea însuşirilor fizico-chimice a laptelui de bivoliţă şi produselor lactate, precum şi stabilirea însuşirilor microbiologice ale acestora.

3.1.1 Însuşirile fizico-chimice ale laptelui de bivoliţă la ferma TNP Mesendorf

Calitatea laptelui de bivoliţă se apreciază în funcţie de caracteristicile fizice (densitate, punct de îngheţ, presiune osmotică sau pH), precum şi de caracteristicile chimice (oxidarea şi lipoliza) şi cele bacteriologice. Practic, laptele de bivoliţă odată muls, poate avea calităţi diferite, astfel, calitatea laptelui de bivoliţă se stabileşte şi în funcţie de conţinutul acestuia în componentele sale (proteine, grăsimi, apă), celule provenite din ugerul bivoliţelor sau microbi proveniţi din grajd sau uger.

3.1.1.1 Rezultate şi discuţii

Studiul compoziţiei chimice a laptelui de bivoliţă se impune din considerente ştiinţifice, dar şi tehnologice, având în vedere ponderea crescută în totalul laptelui materie primă. Pentru efectuarea examenului fizico-chimic s-a folosit aparatul Lactoscan aflat în dotarea Laboratorului pentru Tehnologia Prelucrării Produselor Agricole din cadrul USAMV Cluj-Napoca, precum şi Ekomilk din cadrul fermei luate în studiu. Alegerea acestor metode instrumentale şi folosirea lor a fost preferată metodelor clasice datorită acurateţii lor şi obţinerii rezultatului în câteva secunde.

Tabelul 3.1.1

Valorile medii şi variabilitatea principalilor indici fizico-chimici ai laptelui de bivoliţă în funcţie de sezon la ferma TNP Mesendorf

Sezonul			Caracteristica				
			Grăsime	Proteină	Lactoză	SUT	Densitate
Iarna	n=57	$x \pm s_X$	7.88±0.04	4.40±0.03	4.65±0.02	18.43±0.03	1.04±0.01
		V%	3.78	5.16	3.83	1.24	0.25
Primăvara	n=46	$x \pm s_X$	7.70±0.03	4.39±0.04	4.69±0.02	18.43±0.03	1.03±0.01
		V%	2.58	5.51	3.17	1.21	0.25
Vara	n=32	$x \pm s_X$	6.96±0.07	4.43±0.02	4.76±0.03	17.64±0.05	1.03±0.01
		V%	5.68	2.35	3.20	1.65	0.16
Toamna	n=31	$x \pm s_X$	7.64±0.06	4.56±0.83	4.82±0.02	18.58±0.03	1.03±0.01
		V%	4.53	4.53	1.88	1.04	0.81

Valorile medii în cazul principalilor parametrii fizico-chimici pentru laptele de bivoliţă în cazul fermei TNP Mesendorf diferă în funcţie de anotimp după cum se poate observa din tabelul 3.1.1. Media pentru grăsime în anotimpul iarnă a fost de 7.88±0.04, primăvara de 7.70±0.03, vara 6.96±0.07, toamna 7.64±0.06.

Conţinutul de proteină (%) a fost de 4.40±0.03 iarna, 4.39±0.04 primăvara, 4.43±0.02 vara şi 4.56±0.83 toamna. Valoarea medie pentru lactoză (%) a fost de 4.65±0.02 iarna, 4.69±0.02 primăvara, 4.76±0.03 vara, 4.82±0.02 toamna. Cu privire la conţinutul mediu de SUT (%), acesta a variat între 17.64±0.05 şi 18.58±0.03. Densitatea medie s-a menţinut în jurul valorii de 1.03±0.01 şi 1.04±0.01.

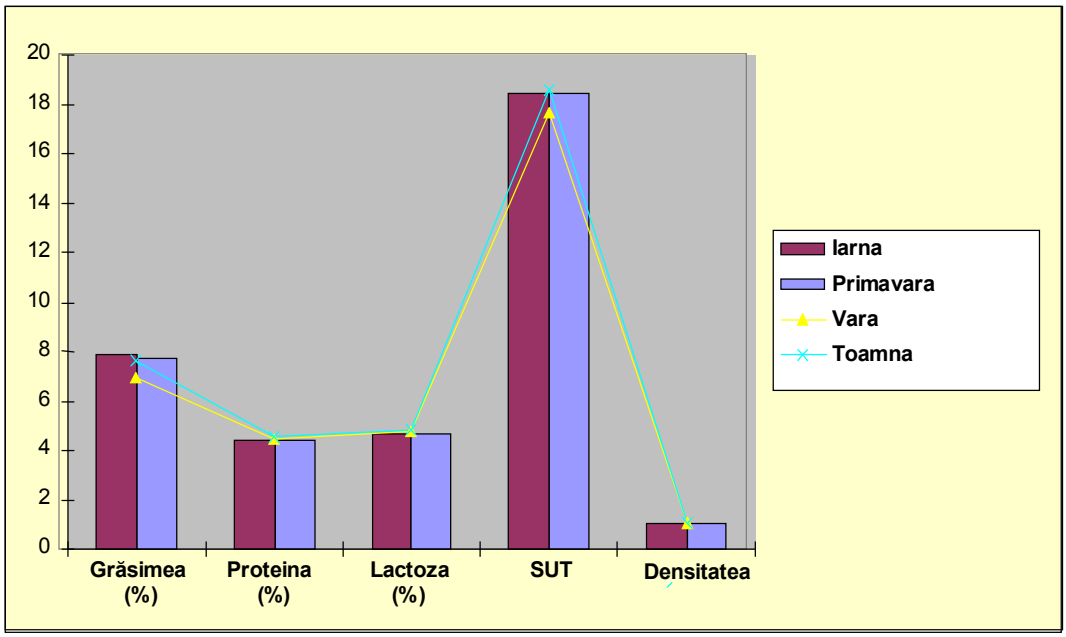


Figura 3.1.1Variabilitatea însuşirilor fizico-chimice în funcţie de anotimp

Conform sintezei realizate de **(Boudier şi col., 1981)** completat de **(Jouzier şi col., 1986)**, principalele componente ale laptelui de bivoliţă prezintă următoarele valori: grăsimea 6.8-7.9%; proteina: 4.0-4.1%; lactoza: 4.8-5.0%; săruri minerale: 0.7-0.8%; S.U.: 16.6-17.5%; energie: 755-1425%.

Dimitrov în urma cercetărilor realizate obţine următoarele valori pentru compoziţia chimică a laptelui de bivoliţă: grăsimea 8.94%, proteina 5.04%, lactoza 4.70%, cenuşa 0.85%, aciditatea 8.60%, valoarea energetică 1200 cal/kg, S.U.T. 18.30%, şi densitatea medie de 1.033.

Velea C. şi col., între anii 1978-1992, în numeroasele cercetări efectuate asupra bubalinelor, a evidenţiat variaţia componentelor laptelui de bivoliţă în funcţie de sezon şi de regimul alimentar astfel:

regim de hrănire pe bază de nutreţuri uscate şi masă verde; s-au constatat următoarele valori pentru principalii parameri: în sezonul de iarnă: S.U.T. a fost de 18.6%, grăsimea 8.0%, proteina 4.6%, lactoza 4.8%, cenuşa 1.2%, densitatea 1.034; în sezonul de primăvară: S.U.T. 17.9%, grăsimea 7.5%, proteina 4.7%, lactoza 4.8%, cenuşa 0.9%, densitatea 1.032; în sezonul de vară: S.U.T. 17.8%, grăsimea 7.4%, proteina 4.6%, lactoza 4.8%, cenuşa 1.0%, densitatea 1.032; în sezonul de toamnă: S.U.T. 18.3%, grăsimea 7.8%, proteina 4.6%, lactoza 4.8%, cenuşa 1.1%, densitatea 1.033.

Tabelul 3.1.2

Compoziţia chimică a laptelui de bivoliţă (sinteză bibliografică)

Autorul	Grăsime (%)	Proteină (%)	Lactoza (%)	SUT (%)	pH
Aleksiev A., (1978)	7.53	5.08	4.57	18.43	-
Boudier (1981)	7.9	4.1	5.0	17.5	-
Han G. (1994)	7.87	4.32	5.39	16.82	6.57
Guzan V., (1996)	7.74	4.35	4.57	17.45	-
Desmasures N. (1997)	8.86	5.25	4.91	19.78	6.83
Zhou W. (1998)	7.93	5.13	4.68	19.23	6.65
Suman C.L. (1998)	7.82	5.31	4.62	18.74	6.94
Banu C., (1998)	7.80	5.12	4.71	18.94	-
Pucheanu C., (2000)	6.94	4.23	5.13	18.75	-
Georgescu G., (2000)	7.80	4.0	5.12	-	-
Fondura O. (2001)	8.21	4.81	5.32	18.52	6.59
Boycheva S. (2002)	7.48	4.67	5.18	18.61	-
Paolo B. (2003)	7.90	5.23	4.80	19.75	6.70
Dimitrov (2003)	8.94	5.04	4.70	18.30	-
Giovanni M. (2003)	7.56	4.75	4.61	18.22	6.38
Grecu G., 2003	7.13	3.83	4.52	18.27	-
Lindmark-M. H. (2003)	7.59	4.74	5.28	18.57	6.68
Amarjit N. (2003)	8.46	5.21	4.78	19.73	6.65
Te Giffel M.C. (2003)	8.53	5.11	4.57	18.62	-
Najdenova N. (2003)	8.47	4.82	4.79	19.21	6.56
Zhang, B.X. (2004)	7.96	4.38	5.23	17.96	-

Continuare tabel 3.1.2

Supino M.T. (2004)	8.27	4.86	5.19	18.49	6.65
Robert Nout (2006)	6.53	4.16	4.56	17.14	6.39
Bei-Zhong (2006)	6.57	4.27	5.07	16.69	6.53
Bud I. şi Velea C. (2006)	7.64	4.69	4.85	18.16	-
Pece A. (2008)	7.88	4.40	4.65	18.45	6.50

Bud I. şi col., în anul 1983 evidenţiează compoziţia chimică a laptelui de bivoliţă ca fiind următoarea: grăsimea 7.64%, proteina 4.69%, lactoza 4.85%, cenuşa 0.98%, aciditatea 8.32%, valoarea energetică 1155 cal/kg, S.U.T. 18.16%, şi densitatea medie de 1.033.

În figura 3.1.1 sunt reprezentaţi principalii parametri pentru laptele de bivoliţă în funcţie de anotimp în cadrul fermei TNP Mesendorf.

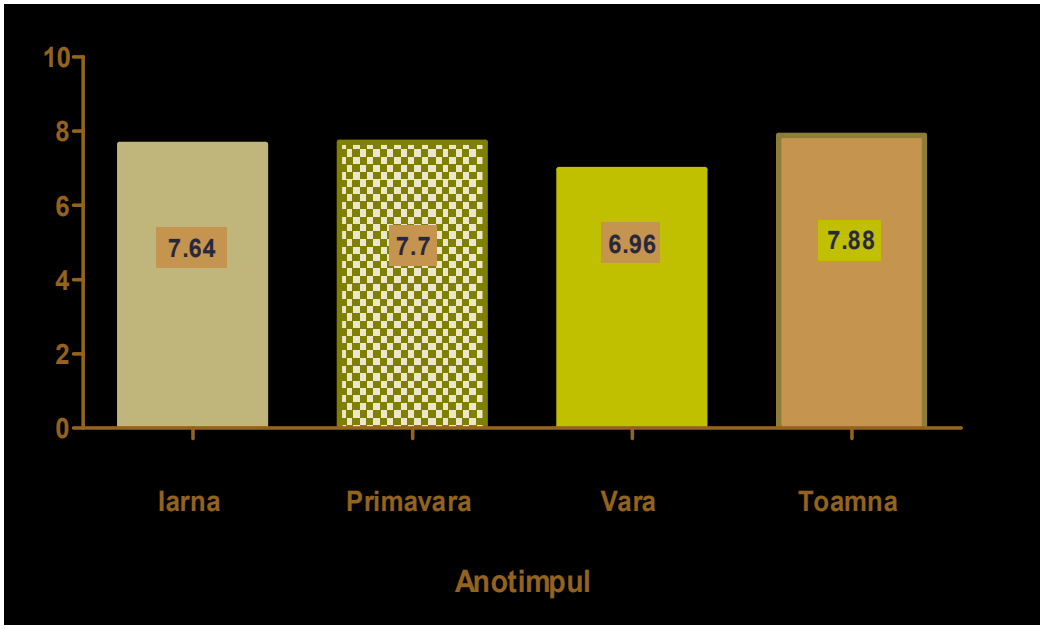


Figura 3.1.2 Valorile medii pentru grăsime în laptele de bivoliţă în funcţie de anotimp

Datele obţinute în urma cercetărilor realizate de noi sunt destul de apropiate datelor obţinute de alţi cercetători: **(Creţa V. şi col., 1979)** în urma cercetărilor realizate pe bivoliţele din Făgăraş aceştia au obţinut un procent de 7.03% pentru grăsime.

Dacă comparăm datele rezultate în urma cercetărilor din ţara noastră cu rezultatele obţinute de cercetătorii străini pe bivoliţele din diferite zone de creştere, se constată că procentul de grăsime este superior celui obţinut la bivoliţele din ţara noastră.

Pucheanu C. în anul 2000, conform cercetărilor realizate a stabilit o medie a procentului de grăsime de 6.94%, iar bivoliţele exploatate la SCPCB Şercaia au realizat un procent de grăsime <7%.

Roşca A. şi Rusu S. în 1958, în urma cercetărilor realizate pe bivoliţele din zona Cluj au obţinut valori de 7.89% pentru grăsime.

În cercetările realizate de către diverşi cercetători asupra raselor indo-pakistaneze s-au obţinut valori de 8% grăsime în laptele de bivoliţă, procent ridicat comparativ chiar şi cu rasa Murrah cu 8.30% grăsime. În anul **1948, Ogzizek** în cercetările realizate asupra bubalinelor din Iugoslavia a constatat că procentul de grăsime se situează la o valoare medie de 8.45%.

Cantitatea de proteină obţinută toamna este mai mare faţă de alte sezoane (figura 3.1.3). Cele mai scăzute nivele ale producţiei corelate cu procente mai mici de proteină şi grăsime s-au obţinut în sezonul de vară. Sezonul fătării influenţează nivelul producţiilor obţinute prin faptul că durata lactaţiei este diferită, în cazul fătărilor din sezonul de iarnă este cu aproximativ 50 de zile mai lungă decât în cazul fătărilor în

celelalte sezoane. Deşi există unele diferenţe între populaţii diferite de bivoliţe, totuşi efectul sezonal menţionat este caracteristic speciei.

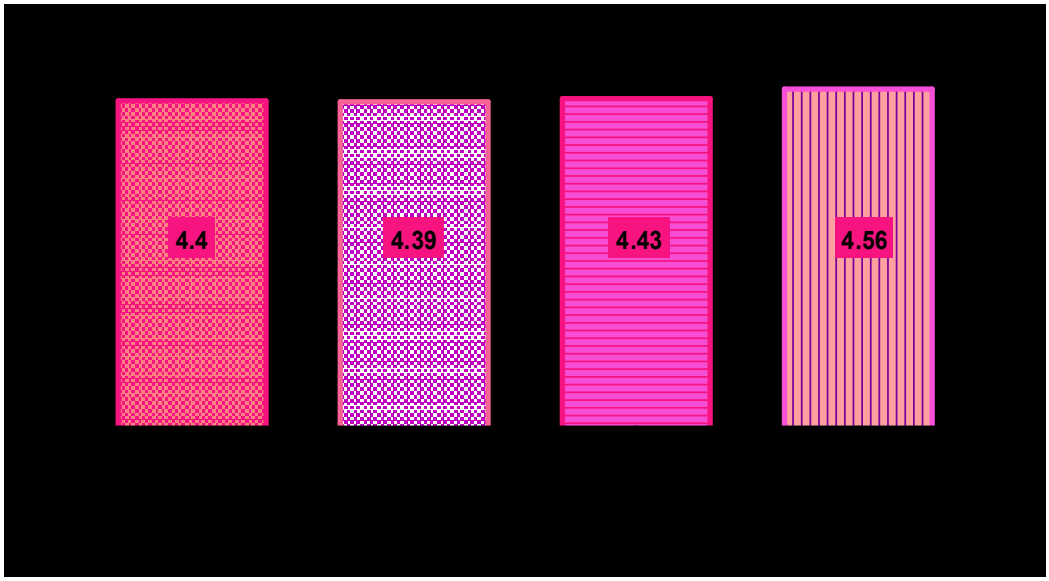


Figura 3.1.3 Conţinutul mediu de proteină pentru laptele de bivoliţă în funcţie de anotimp

Lactoza este principala glucidă a laptelui de bivoliţă, şi în cantităţi mai mici se găsesc celelalte glucide azotate sau acide. Ea se găseşte sub 3 forme: alfa hidratată, beta anhidră şi o formă amorfă formată dintr-un amestec de alfa şi beta lactoză în raport de unu la cinci.

Lactoza are un rol deosebit în alimentaţie mai ales pentru organismele tinere favorizând asimilarea calciului şi fosforului în organism. În cazul preparării brânzeturilor aproximativ 90% din lactoză trece în zer **(Rotaru Gabriela, 1978)**.

În cazul încălzirii laptelui de bivoliţă se formează acid lactic într-o proporţie de aproximativ 5% şi în proporţie mai mică acid butiric, acetic, propionic şi piruvic. Aciditatea creşte progresiv, în cazul

încălzirii laptelui, datorită interacţiunii grupărilor aminice cu lactoza. Unii hidraţi de carbon se află în cantităţi mici în laptele de bivoliţă, fiind cuprinse în această categorie glucidele neazotate (glucoza şi galactoza), glucidele azotate (N-acetilglucozamina şi N-acetilgalactozamina) şi acide (acizi sialici) care se află în gruparea prostetică a cazeinei k.

Lactoza se descompune parţial la temperaturi de 70-80ºC cu formare de acizi organici în special, acid formic şi lactic. Lactoza alfa hidratată cristalizează frecvent şi dă unele defecte ale laptelui concentrat, brânzei topite şi îngheţatei. Prin gruparea aldehidică lactoza poate reacţiona la încălzire cu diverse substanţe azotoase: proteine, amoniac, aminoacizi şi rezultă un ansamblu de fenomene numit reacţia Mailard.

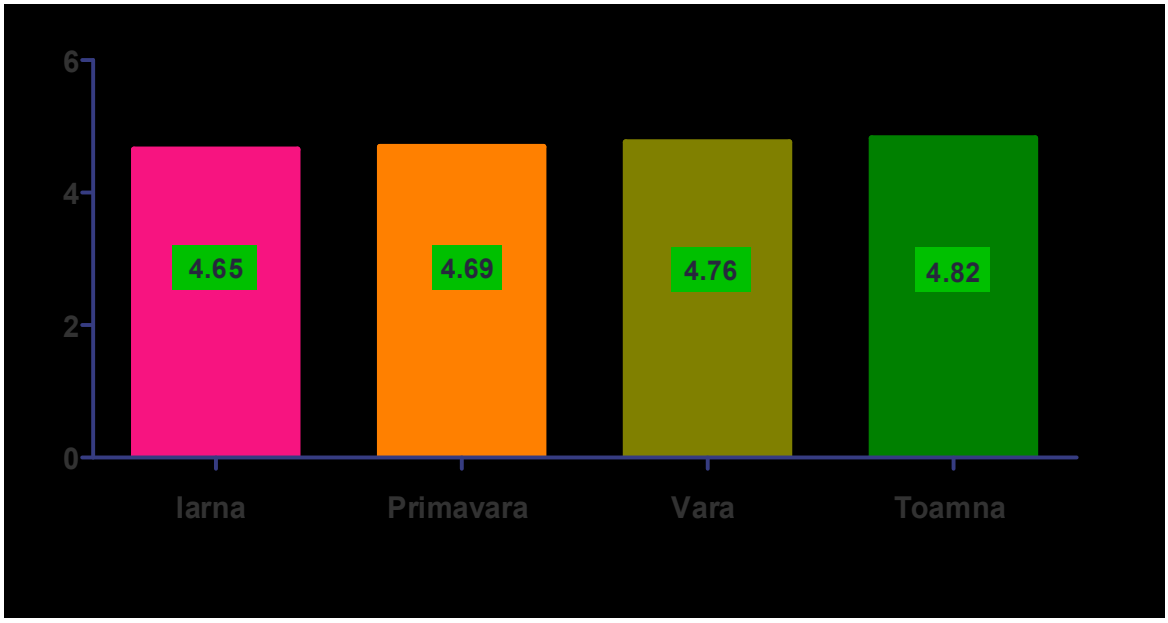


Figura 3.1.4 Conţinutul mediu de lactoză pentru laptele de bivoliţă în funcţie de anotimp

Lactoza are proprietăţi reducătoare datorită grupării aldehidice, pe acestea bazându-se unele reacţii de identificare şi metode de dozare **(Chindriş V., 1998)**.

După cum se poate observa din figura 3.1.4, conţinutul de lactoză cel mai ridicat în cazul laptelui de bivoliţă este în sezonul de toamnă.

Lactoza reprezintă componenta glucidică a laptelui, de o foarte mare valoare energetică şi poate ajunge în lapte până la procentul de 7.8%. Lactoza variază în lapte în limite foarte largi, între 2.8 şi 7.66% cu o medie de 4.6%. La diferite specii conţinutul în lactoză este de regulă invers proporţional cu proteinele. Lactoza este sintetizată de către mamelă pe baza glucozei sanguine, fiind un dizaharid care participă la formarea gustului laptelui proaspăt **(Rotaru şi Mihaiu, 2001)**.

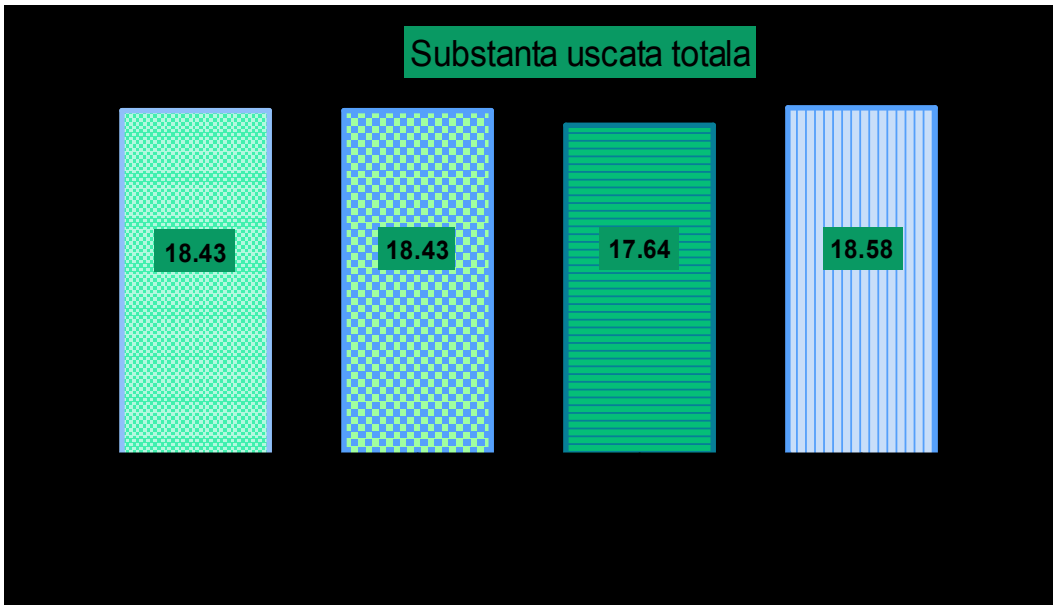


Figura 3.1.5 Valorile medii pentru SUT în laptele de bivoliţă în funcţie de anotimp

SUT, după cum se poate observa din figura 3.1.5 prezintă valori maxime toamna şi iarna şi minime vara.

Compoziţia laptelui poate fi modificată atât înainte cât şi după muls. Dacă modificările apar în interiorul glandei mamare, este în mod aproape sigur vorba despre o boală sau un tratament pe bază de antibiotice sau alt tip de medicamentaţie. Alimentaţia poate de asemenea să altereze compoziţia normală a laptelui, dar aceste modificări sunt întâlnite extrem de rar, însă la intervale oarecum regulate; sezonul poate să afecteze compoziţia laptelui, datorită diferenţelor de alimentaţie din anumite perioade ale anului **(Chindriş V., 1998)**.

În urma cercetărilor realizate de către **(Guzan V., 1996)** asupra laptelui de bivoliţă, grăsimea a fost de 7.74%, proteina totală de 4.35%, din care cazeina: 3.57%, lactoza: 4.57%, sărurile minerale: 0.79% şi substanţa uscată totală: 17.45%.

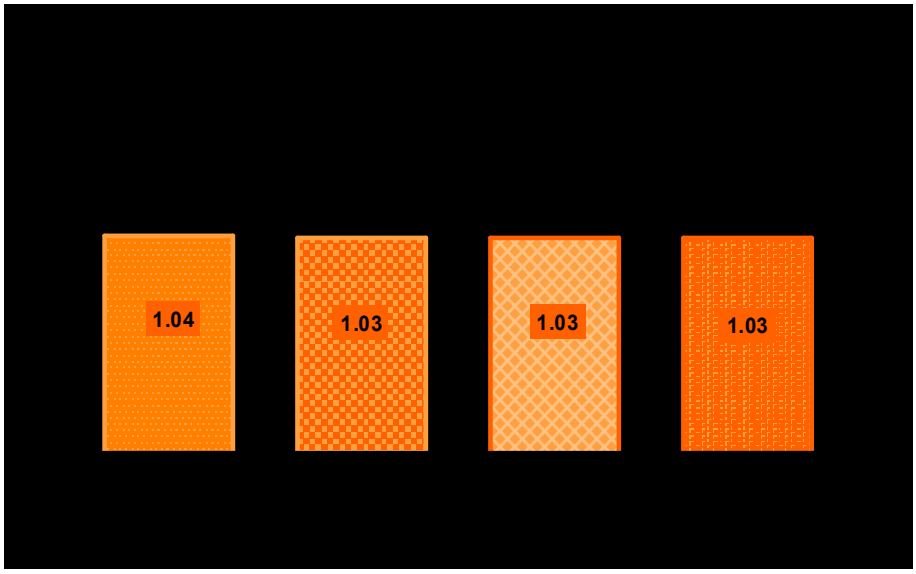


Figura 3.1.6 Variabilitatea densităţii în funcţie de anotimp pentru laptele de bivoliţă

Tabelul 3.1.3

Valorile medii şi variabilitatea principalilor indici fizico-chimici ai laptelui de bivoliţă în funcţie de sezon la bivoliţele din judeţul Sălaj

Anotimpul			Caracteristica				
			Grăsime	Proteină	Lactoză	SUT	Densitate
Iarna	n=23	$x \pm s_X$	8.52±0.09	4.93±0.04	4.78±0.02	18.93±0.04	1.03±0.01
		V%	4.95	4.07	2.06	1.13	0.12
Primăvara	n=23	$x \pm s_X$	7.70±0.05	4.70±0.02	4.84±0.01	17.77±0.02	1.04±0.01
		V%	3	2.52	1.48	0.45	1.31
Vara	n=20	$x \pm s_X$	7.24±0.07	4.36±0.02	4.75±0.02	17.78±0.02	1.03±0.01
		V%	4.23	2.43	2.29	0.47	1.14
Toamna	n=16	$x \pm s_X$	7.94±0.02	4.50±0.03	4.66±0.03	18.44±0.04	1.03±0.01
		V%	1.14	2.23	2.58	0.91	1.02

Date comparative privind procentul de grăsime la bivoliţele de diferite provenienţe şi cercetate de diferiţi autori: **(Roşca R. şi col., 1958)** realizând cercetări asupra bubalinelor româneşti în judeţul Cluj relatează procentul de grăsime ca fiind de 7.89%; **(Boudier şi col., 1981)**, procentul de grăsime a fost de 6.8%; **(Bud I., 1983)** realizând cercetări asupra bubalinelor româneşti din Transilvania, grăsimea a fost de 7.39%; **(Jouzier şi col., 1986)** realizând cercetări asupra bubalinelor a obţinut un procent pentru grăsime de 7.9%; **(Velea C. şi col., 1993)**, pe bubalinele româneşti din Transilvania grăsimea a fost de 8.35%; **(Elisei L. şi col., 1995)** în urma cercetărilor realizate pe bubalinele româneşti din zona Făgăraşului procentul de grăsime a fost de 7.36%; **(Banu C. şi col., 1998)**, grăsimea a fost de 7.80%; **(Georgescu Gh., 2000)**, grăsimea a fost de 7.85%; **(Pucheanu C. şi col., 2000)** în urma cercetărilor realizate pe bubalinele româneşti de la Şercaia au obţinut un procent de grăsime de 6.94%.

Conţinutul mediu de grăsime şi proteină este mai mare iarna, toamna şi primăvara şi în cazul bivoliţelor luate în studiu din judeţul Sălaj. Vara conţinutul de grăsime este de 7.24±0.07 şi conţinutul de proteină de 4.36±0.02.

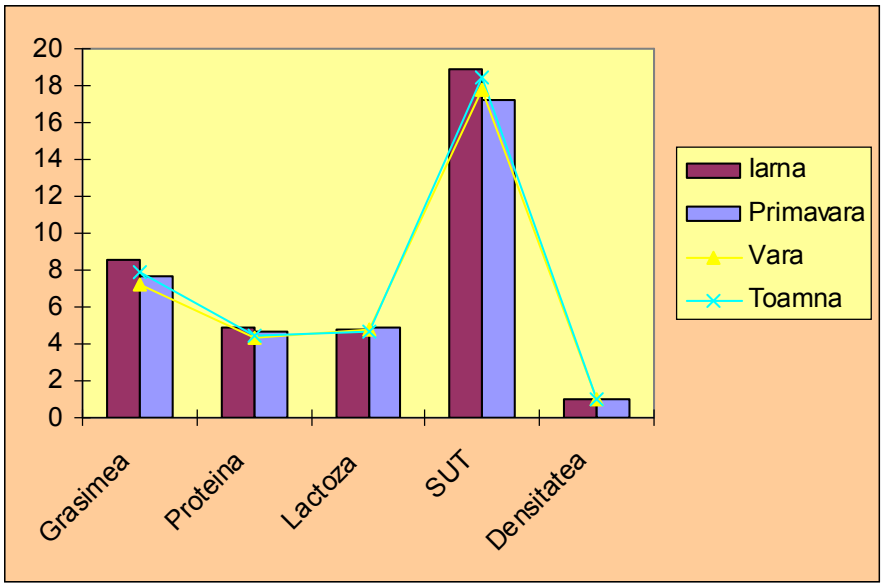


Figura 3.1.7 Variabilitatea însuşirilor fizico-chimice în funcţie de anotimp la bivoliţele din judeţul Sălaj

Bei-Zhong Han în 2006 studiază însuşirile fizico-chimice la mai multe rase de bubaline: pentru rasa Murrah grăsimea (%) a fost de 6.57±1.21, proteina de 4.27±0.43, lactoza de 5.07±0.13, pH-ul de 6.53; pentru rasa Nili-Ravi grăsimea a fost de 6.53±1.28, proteina de 4.16±0.20, lactoza de 4.56±0.10, şi pH-ul de 6.39±0.06.

În conţinutul laptelui proaspăt se deosebesc două faze distincte: una fiind dată de grăsime, iar cealaltă de apă, în care sunt dispersate numeroase substanţe conţinute. Faza lipidică este formată din fosfolipide, steroli, carotenoizi şi vitamine liposolubile, iar cea apoasă

conţine sub formă de soluţie lactoza, vitaminele hidrosolubile şi minerale.

De asemenea laptele vehiculează în stare coloidală proteinele şi o bună parte din mineralele conţinute **(Colcombet, 1985; Dumoulin şi Leseur, 1991; Faraoult, 1988)**.

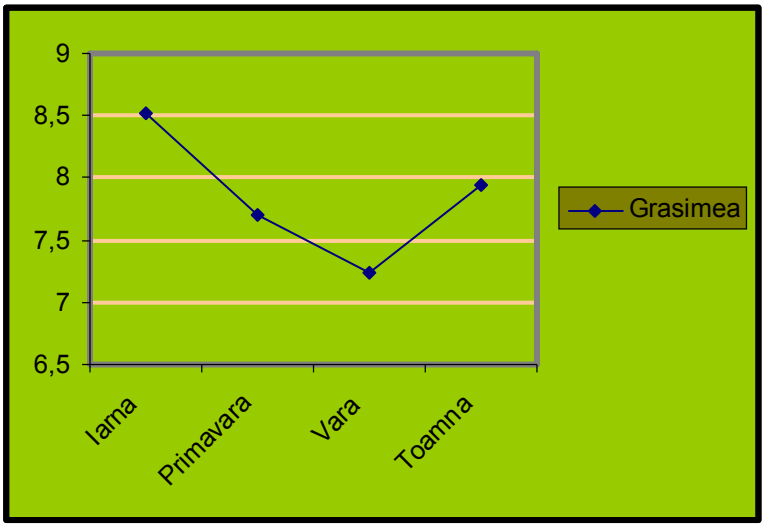


Figura 3.1.8 Conţinutul mediu de grăsime în funcţie de lactaţie la bivoliţele din judeţul Sălaj

În figura 3.1.8 s-a reprezentat conţinutul grăsimii în funcţie de anotimp pentru bivoliţele din judeţul Sălaj, cu variaţii cuprinse între 7.24 şi 8.52%.

Compoziţia chimică a laptelui de bivoliţă după **(Valeria Guzan, 1996)** este următoarea: S.U.T.: 17.45%; grăsimea: 7.74%; proteina totală: 4.35%; cazeina: 3.57%; lactoza: 4.57%; săruri minerale: 0.79%.

Caracteristicile fizico-chimice după **(Marian M. şi col., 1998)** pentru laptele de bivoliţă sunt următoarele: aciditate (ºT, max.): 21; densitate: 1.031; grăsime (%, min.): 6.5; substanţa uscată negrasă (%,

min.): 10; titru proteic, (%, min): 4.5; grad de impurificare (max.): I, temperatura (ºC): 14.

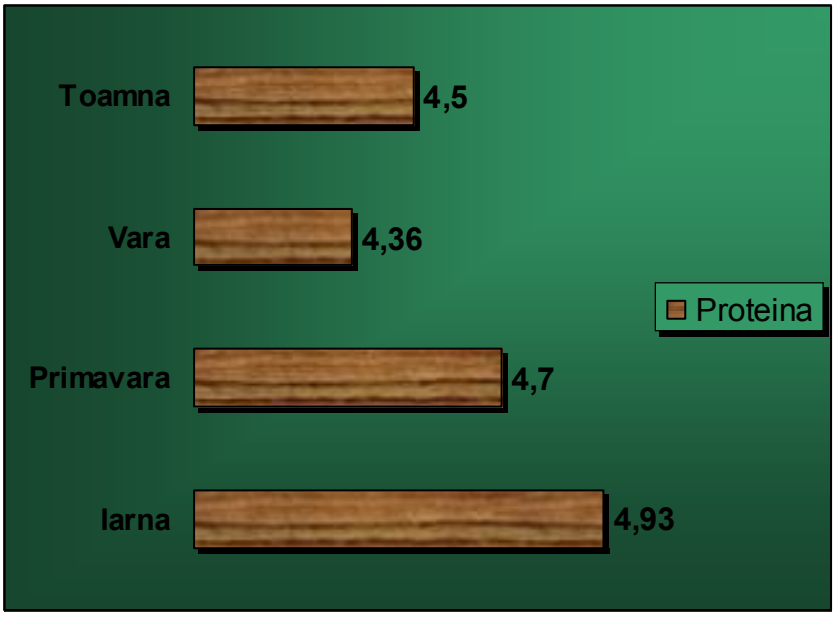


Figura 3.1.9 Conţinutul mediu de proteină în funcţie de lactaţie la bivoliţele din judeţul Sălaj

Prin conţinutul în proteină putem spune că laptele de bivoliţă este superior multor specii, precum şi prin conţinutul ridicat de cazeină, albumină, globulină. Laptele de bivoliţă conţine mai puţină apă dar mai multă substanţă uscată totală, grăsime, lactoză şi proteină.

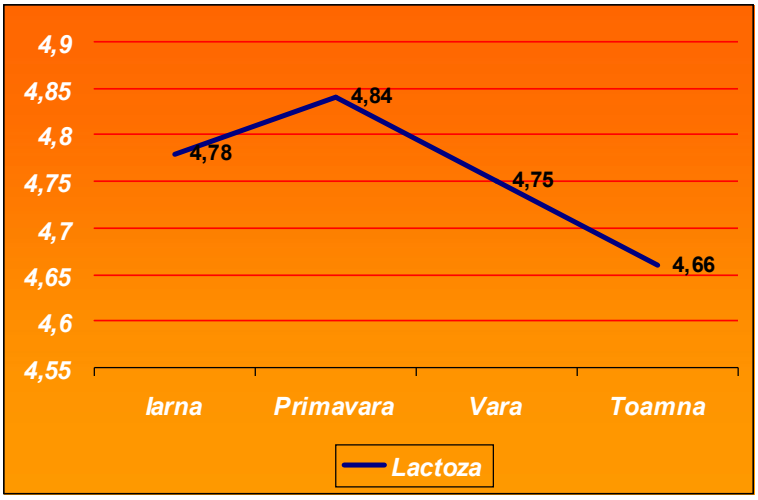


Figura 3.1.10 Conţinutul mediu de lactoză în funcţie de lactaţie la bivoliţele din judeţul Sălaj

În figurile 3.1.9 şi 3.1.10 sunt reprezentate grafic conţinutul mediu de proteină şi lactoză în funcţie de anotimp pentru bivoliţele luate în studiu din judeţul Sălaj.

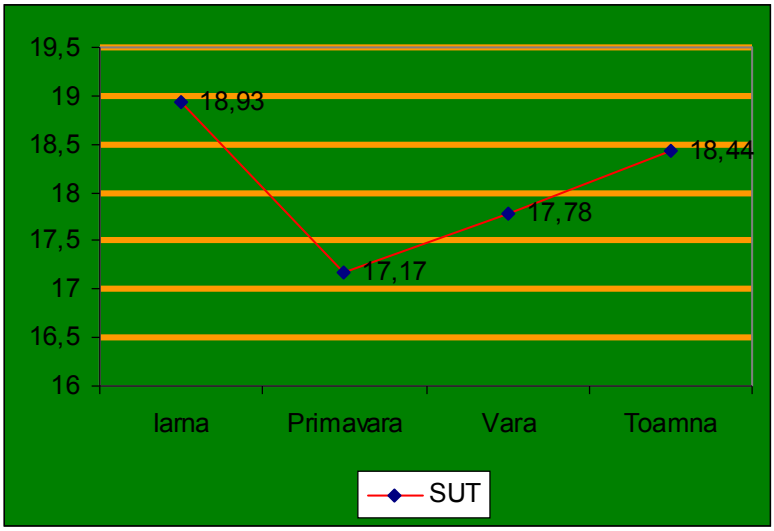


Figura 3.1.11 Conţinutul mediu în SUT în funcţie de lactaţie la bivoliţele din judeţul Sălaj

Probele de lapte de bivoliţă prelevate de la crescătorii din judeţul Sălaj şi analizate în vederea stabilirii conţinutului de SUT prezintă valori apropiate cu cele de la fema TNP Mesendorf, după cum se poate observa şi din figurile (3.1.5 şi 3.1.11).

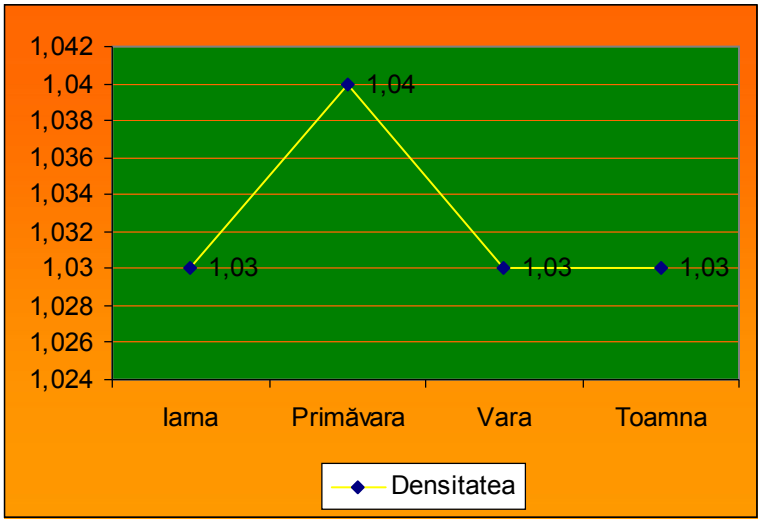


Figura 3.1.12 Variabilitatea densităţii în funcţie de anotimp pentru laptele de bivoliţă

Lactaţia şi producţia laptelui depind de factori genetici şi factori de mediu. Cei genetici sunt daţi de specie, rasă şi individ. Rasa este un factor care influenţează nu numai producţia cantitativă şi calitativă de lapte, dar şi alte însuşiri importante cum sunt precocitatea, longevitatea, capacitatea de conversie a nutreţurilor.

Rasa influenţează şi conţinutul în grăsime şi proteină. Un alt factor îl reprezintă determinismul genetic al populaţiilor; s-au stabilit relaţii între baza ereditară şi factorii mediului ambiant. Producţia cantitativă şi calitativă de lapte variază de la un individ la altul.

Creşterea şi dezvoltarea până la viaţa productivă, cu două perioade distincte: prenatală şi postnatală, reprezintă un alt factor de influenţă. Factorul vârstă are în vedere dinamica producţiei de lapte pe întreaga viaţă productivă a animalului şi care constituie un caracter de rasă **(Chindriş V., 1998)**.

Grăsimea este unul dintre cei mai importanţi componenţi ai laptelui de bivoliţă în ceea ce priveşte proprietăţile organoleptice, dar şi sub aspect nutritiv şi economic; prezintă valori minime în prima lună de lactaţie şi maxime spre sfârşitul acesteia, iar în comparaţie cu celelalte tipuri de lapte prezintă valorile cele mai mari, fiind cuprinse între 5.1-9.0% **(Chindriş V., 1998)**.

Nardone A. şi col., în anul 1993, în cercetările complexe pe care le-au realizat asupra bubalinelor din diferite zone, au obţinut următoarele valori medii pentru grăsime: în cazul bubalinelor din Bulgaria: 5.70%; pentru bubalinele din Italia: 8.10%; bubalinele din România: 7.10%; bubalinele din Egipt: 6.80% şi bubalinele din Turcia: 8.70%. Calitatea laptelui este influenţată de sezonul fătării, mai ales în ceea ce priveşte conţinutul în grăsime, în sensul că valorile obţinute în sezonul rece sunt superioare celor obţinute în alte sezoane: cu 12.94% mai mari comparativ cu cea înregistrată primăvara, cu 33.2% vara şi cu 28.8% toamna **(Bud I., 1990).** Frecvenţa mulsului afectează atât producţia totală de lapte, cât şi cantitatea de grăsime. În baza cercetărilor efectuate de **(Velea C. şi col. 1984)** referitoare la însuşirile morfologice ale ugerului la bivoliţă, se poate concluziona că acesta are o bună dezvoltare şi dinamică de creştere pe lactaţii în strânsă corelaţie cu nivelul de producţie.

Tabelul 3.1.4

Valorile medii şi variabilitatea principalilor parametrii fizico-chimici în funcţie de lactaţie la Ferma TNP Mesendorf

Lactaţia	N	$X \pm S_X$ V%	Grăsimea	Proteina	Lactoza	SUT	Densitatea
I	n=60	$x \pm s_X$	7.31±0.05	4.77±0.01	4.70±0.08	17.22±0.29	1.03±0.01
		V%	4.82	2.34	3.58	13.21	1.18
II	n=29	$x \pm s_X$	7.49±0.06	4.68±0.03	4.79±0.03	17.72±0.04	1.034±0.01
		V%	4.08	3.09	3.47	1.02	1.30
III	n=23	$x \pm s_X$	7.61±0.09	4.75±0.03	4.80±0.02	17.86±0.13	1.033±0.01
		V%	5.80	3.50	2.10	3.51	0.12
IV	n=10	$x \pm s_X$	7.64±0.13	4.82±0.03	4.84±0.03	18.06±0.03	1,030±0.01
		V%	5.20	2.22	1.90	0.61	1.09
V	n=5	$x \pm s_X$	7.96±0.26	4.87±0.04	4.87±0.03	18.30±0.23	1.029±0.01
		V%	7.32	1.78	1.33	2.85	1.11
VI	n=8	$x \pm s_X$	8.10±0.09	4.81±0.03	4.84±0.03	18.01±0.04	1.034±0.01
		V%	3.19	1.55	1.58	0.63	1.33
VII	n=8	$x \pm s_X$	8.34±0.10	4.76±0.03	4.82±0.02	18.15±0.07	1.035±0.01
		V%	3.48	1.64	1.34	1.05	0.81
VIII	n=5	$x \pm s_X$	8.77±0.07	4.82±0.03	4.89±0.02	18.34±0.24	1.04±0.01
		V%	1.81	1.58	1.08	2,96	0.80

Compoziţia chimică medie a laptelui de bivoliţă după **Inihov** este următoarea: apă: 82.7%; substanţa uscată: 17.3%; grăsimea: 7.7%; proteină: 4.1%; lactoza: 4.8%; cenuşa: 0.7%.

Conform cercetărilor efectuate de **(Pucheanu G., 2005)**, procentul de proteină pentru laptele obţinut la bivoliţele întreţinute în sistem mixt a fost în medie de 4.69%, înregistrând o variabilitate relativ normală (9.18%). Acest procent este superior faţă de procentul de proteină din laptele de bivoliţă calculat de **(Georgescu Gh., în 2000)** care a fost de 4%.

Dacă comparăm aceste date cu cele obţinute la bivoliţele italiene, **(Nardone A. şi col., 1993)** au obţinut un procent mediu pentru proteină de 4.65%.

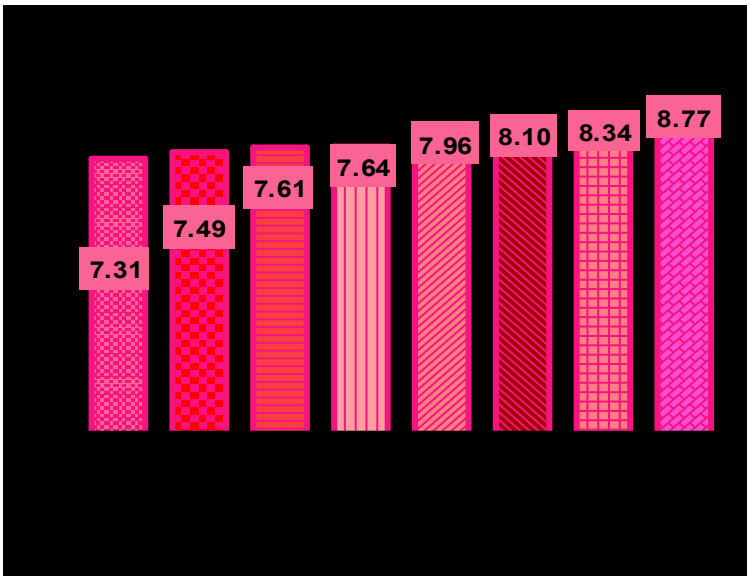


Figura 3.1.13 Grăsimea în laptele de bivoliţă în funcţie de lactaţie la Ferma TNP Mesendorf

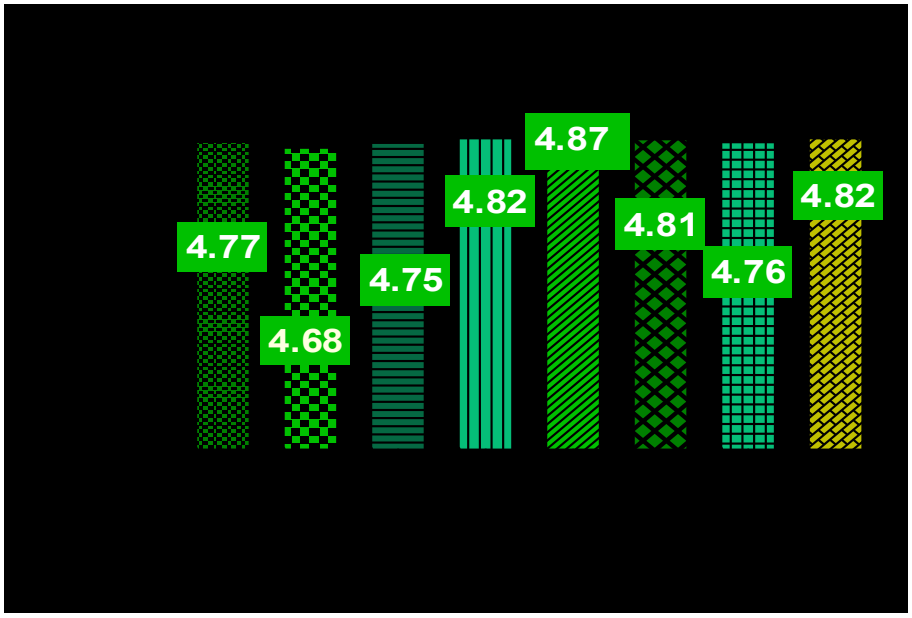


Figura 3.1.14 Conţinutul mediu de proteine în funcţie de lactaţie la TNP Mesendorf

Polikhronov D. şi col., 1977, în cercetările realizate asupra bubalinelor bulgăreşti a obţinut pentru grăsime o valoare medie de 8.20%, iar în cazul rasei Murrah procentul de grăsime a fost mai scăzut: 8.01%. Grăsimea din laptele de bivoliţă reprezintă componenta cea mai variabilă din lapte, fiind influenţată de factori genetici şi de specie. Media pentru laptele de vacă este 3.5%, cu minima 2.8 şi maxima peste 4%. Cel mai gras lapte este considerat cel de balenă cu 35%, apoi laptele de ren cu 17.5%, laptele de bivoliţă 8.2%, de oaie 6.8%, de scroafă 6%, de pisică 5%. Cel mai sărac lapte în grăsime îl produce măgăriţa şi iapa 1.5% **(Chindriş Vasile, 1998)**.

În cazul bivoliţelor primipare **(Pucheanu G., 2005)**, în urma cercetărilor efectuate au constatat că acestea au realizat cel mai redus procent de proteină de 3.73% cu o variabilitate normală de 7.93%. Componentul glucidic de bază din laptele de bivoliţă este lactoza, care din punct de vedere chimic este un dizaharid ce eliberează prin hidroliză o moleculă de glucoză şi una de galactoză. Lactoza conferă laptelui de bivoliţă gustul dulceag şi are o moleculă asimetrică cu putere de rotaţie, existând doi izomeri cu grad şi solubilitate diferit în aceleaşi condiţii de temperatură **(Chindriş V., 1998)**.

Hidraţii de carbon se găsesc în lapte sub formă de lactoză, al cărui precursor este glucoza circulantă, nivelul acestuia influenţând cantitatea de lapte produs şi rata de sinteză a acizilor graşi cu lanţ scurt **(Hanzen, 1996).** Concetraţia lactozei este în corelaţie cu evoluţia lactozei şi scade în deficitul de aport glucidic sau în cazul infecţiilor mamare.

Pucheanu C. în anul 2000, în urma cercetărilor realizate asupra bivoliţelor de la S.C.P.C.B Şercaia au înregistrat un procent mediu de proteină pentru lapte de 3.78%.

Solubilitatea lactozei prezintă particularităţi cu importanţă practică în fabricarea laptelui concentrat şi a îngheţatei. La aceste produse se formează nucleii cristalini pe care se depun cristale de lactoză perceptibile gustativ datorită faptului că lactoza se găseşte în soluţie suprasaturată. Lactoza este sensibilă la acţiunea căldurii peste 100°C, suferind diferite modificări de la pierderea apei până la schimbarea culorii şi chiar caramelizare. Prin reacţie cu substanţele azotate la temperaturi mari se formează produşi de culoare brună cu proprietăţi reducătoare, fenomen cunoscut sub denumirea de reacţie Mailard.

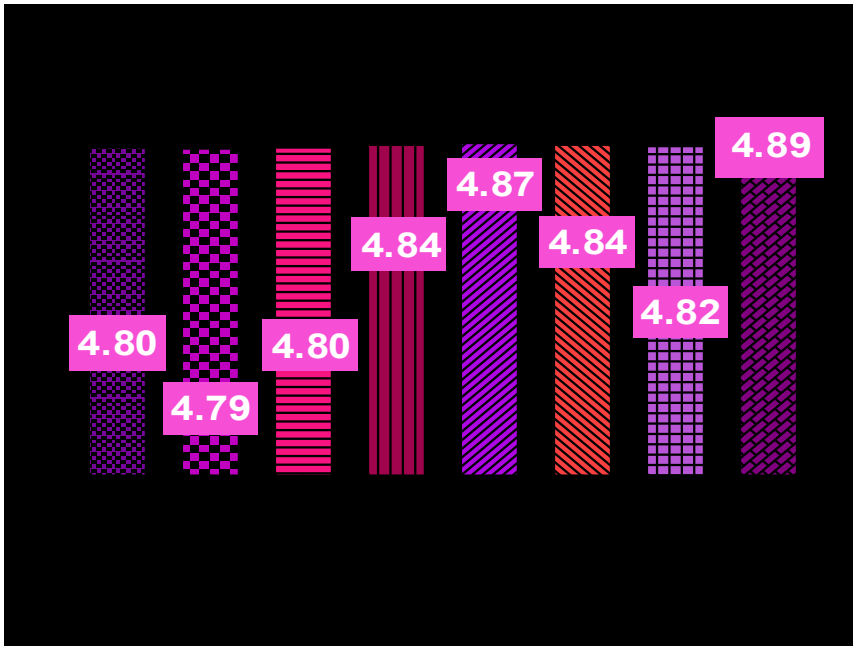


Figura 3.1.15 Conţinutul mediu de lactoză din lapte în funcţie de lactaţie la TNP Mesendorf

Una dintre proprietăţile cele mai importante ale lactozei este capacitatea de fermentare sub acţiunea microorganismelor, obţinându-se produşi diferiţi. Fermentaţia lactică este cea mai cunoscută şi apreciată din punct de vedere tehnologic, cu formare de acid lactic sub acţiunea bacteriilor lactice.

Acidul lactic, sub acţiunea bacteriilor propionice, poate fi transformat în acid propionic şi dioxid de carbon, fermentaţie care se produce în timpul maturării brânzeturilor cu pastă tare şi asigură aroma specifică şi desenul acestui tip de brânzeturi. O fermentaţie nedorită este cea produsă de bacteriile anaerobe, care transformă acidul lactic în acid butiric şi hidrogen, producând balonarea târzie a brânzeturilor.

Timpul de întrerupere a lactaţiei pare să fie corelat negativ cu producţia de lapte. Acesta este mai scurt la începutul şi la mijlocul perioadei de lactaţie, comparativ cu sfârşitul acesteia. O ejecţie mai rapidă a laptelui este observată când producţia de lapte este mai ridicată **(Chindriş V., 1998)**.

În urma cercetărilor efectuate am constatat că variaţia componentelor laptelui de bivoliţă din zona de colectare este destul de neuniformă, cauza principală o constituie existenţa unei populaţii de bubaline heterogene, cu slabe performanţe în ceea ce priveşte producţia de lapte, hrănite cu furaje de calitate inferioară şi exploatate extensiv, fiind utilizate de multe ori la munca câmpului. În acest caz este necesară aplicarea unei tehnologii de exploatare optimizate pentru realizarea unui salt calitativ al producţiei de lapte la specia bubalină, aceasta reprezentând dezideratul privind calitatea materiei prime.

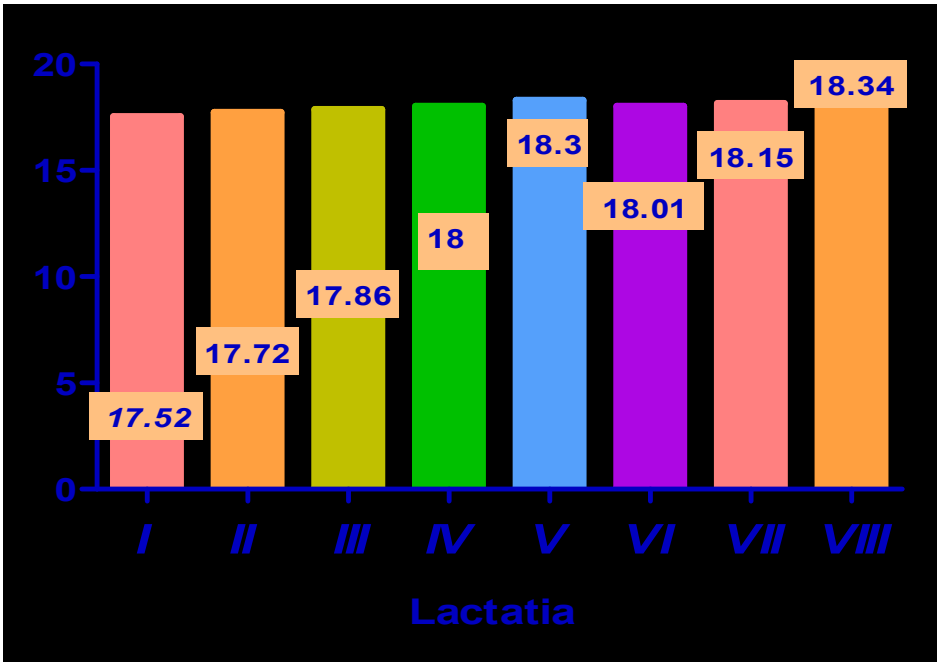


Figura 3.1.16 Conţinutul mediu de SUT al laptelui în funcţie de lactaţie la TNP Mesendorf

Proteinele din lapte au o valoare biologică ridicată, aproximativ 18 aminoacizi, toţi aminoacizii esenţiali ai organismului. Cazeina este o fosfolipidă care conţine fosfor sub formă de acid fosforic. Laptele de bivoliţă datorită conţinutului ridicat în grăsime, din punct de vedere energetic este mult mai valoros decât laptele de vacă.

Grăsimea din laptele de bivoliţă are un conţinut ridicat în fosfolipide, colesterol şi acizi graşi saturaţi comparativ cu laptele de vacă. Procentul de grăsime este evaluat de regulă invers faţă de producţia cantitativă.

Sezonul influenţează direct o serie de indici fiziologici la bubaline, acţionând prin diferiţi factori asupra temperaturii, activităţii cardiace şi respiraţiei, iar indirect asupra producţiei de lapte **(Chindriş V., 1998)**.

Compoziţia chimică medie a laptelui de bivoliţă pe lactaţii după **(Velea C. şi col., 2006)** este următoarea : lactaţia I: grăsimea 7.39%, proteina 4.23%, lactoza 4.68%, cenuşa 0.89%, aciditatea 8.28, valoarea energetică 1110 cal/kg, densitatea medie 1.032, S.U.T.17.39%; lactaţia II: grăsimea 7.49%, proteina 4.62%, lactoza 4.65%, cenuşa 0.91%, aciditatea 8.42, valoarea energetică 1150 cal/kg, densitatea medie 1.032, S.U.T., 17.67%; lactaţia III: grăsimea 7.81%, proteina 4.79%, lactoza 4.68%, cenuşa 0.94%, aciditatea 8.46, valoarea energetică 1180 cal/kg, densitatea medie 1.033 şi S.U.T. 18.22%.

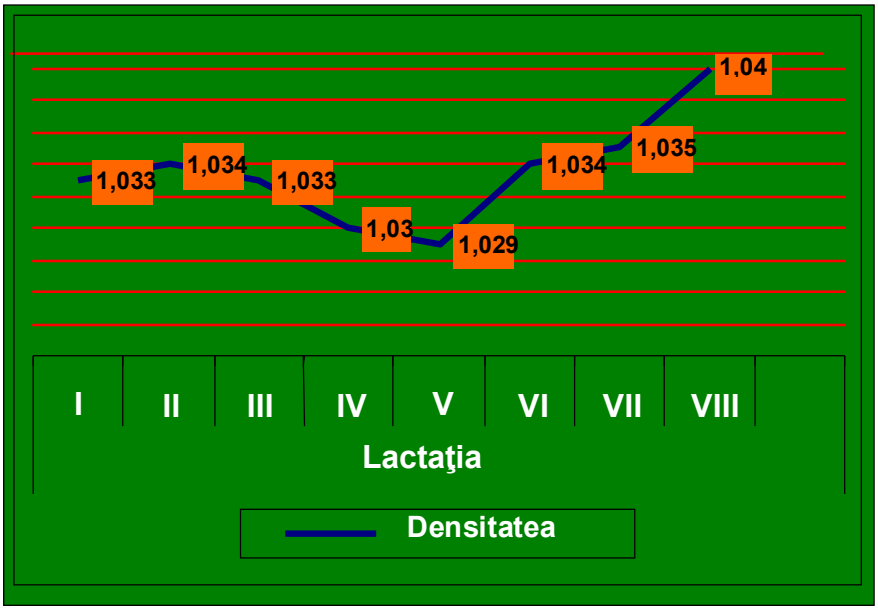


Figura 3.1.17 Variabilitatea densităţii laptelui în funcţie de lactaţie la TNP Mesendorf

Procentul de grăsime variază în funcţie de stadiul lactaţiei şi de volumul producţiei de lapte. Un studiu efectuat pe rasa Nili-Ravi în Pakistan arată că procentul de grăsime creşte constant de la 5.5% în prima lună de lactaţie la 7.5% în luna a-10-a de lactaţie. Există o

corelaţie negativă între producţia de lapte şi procentul de substanţă uscată (S.U.).

Valorile medii şi variabiliatatea pentru principalii parametri fizico-chimici în funcţie de lactaţie la bubalinele din judeţul Sălaj sunt evidenţiate în tabelul 3.1.5.

După cum se poate observa şi din figura 3.1.13, conţinutul în grăsime (%) creşte din lactaţia I unde este de 6.95±0.05, până în lactaţia a X-a, în care atinge valoarea de 8.60±0.06. În cazul procentului de grăsime în funcţie de nivelul lactaţiei, acesta tinde să scadă de la lactaţia I-a şi până la lactaţia a IV-a, după care tinde să crească până în lactaţia a VIII-a, când atinge maximum de 7.73%, după care urmează o uşoară scădere, atingând nivelul minim de 7.41% (aceste cercetări au fost realizate de către **(Bud I., 1983)** pe bivoliţele din Nord-Vestul Transilvaniei).

Banu C. şi col., în anul 1998 în cercetările realizate asupra bubalinelor din ţara noastră au obţinut o valoare medie pentru grăsime de 7.80%, aceleaşi valori fiind obţinute şi de către **Georgescu Gh., în anul 2000.**

Velea C. şi col., în anul 1994, în numeroasele cercetări realizate pe bubaline, atât pe bubalinele din Transilvania, cât şi pe rasa Murrah, au obţinut următoarele valorii medii pentru grăsime: 7.40% - bubalinele româneşti şi 8.35% - pentru rasa Murrah.

Tabelul 3.1.5

Valorile medii şi variabilitatea principalilor parametri fizico-chimici în funcţie de lactaţie la bivoliţele din judeţul Sălaj

Lactaţia	N	$X \pm S_X$ V%	Grăsimea	Proteina	Lactoza	SUT
I	n=15	$x \pm s_X$	6.95±0.05	4.86±0.01	4.88±0.01	18.05±0.04
		V%	2.86	0.85	1.05	1.12
II	n=13	$x \pm s_X$	7.14±0.03	4.74±0.01	4.83±0.02	17.94±0.05
		V%	1.37	0.55	1.56	1.07
III	n=11	$x \pm s_X$	7.34±0.02	4.75±0.02	4.79±0.02	18.03±0.04
		V%	1.04	1.16	1.57	0.82
IV	n=10	$x \pm s_X$	7.49±0.02	4.80±0.02	4.82±0.02	18.16±0.03
		V%	0.94	1.42	1.47	1.43
V	n=12	$x \pm s_X$	7.73±0.02	4.86±0.03	4.83±0.03	18.21±0.01
		V%	0.89	2.28	2.00	1.98
VI	n=10	$x \pm s_X$	7.92±0.02	4.80±0.02	4.90±0.03	18.37±0.06
		V%	0.66	1.27	2.17	1.03
VII	n=8	$x \pm s_X$	7.98±0.03	4.68±0.03	4.89±0.02	18.52±0.07
		V%	1.02	1.96	1.28	1.02
VIII	n=6	$x \pm s_X$	8.21±0.10	4.65±0.04	4.87±0.03	18.48±0.08
		V%	3.06	2.34	1.47	1.08
IX	n=6	$x \pm s_X$	8.39±0.04	4.71±0.01	4.92±0.02	18.68±0.02
		V%	1.17	0.61	1.03	2.25
X	n=7	$x \pm s_X$	8.60±0.06	4.81±0.02	4.89±0.03	18.93±0.02
		V%	1.80	1.13	1.69	2.87

Valorile reprezentative ale componentelor principale din laptele de bivoliţă după **(Ionel I., 1999)** sunt următoarele: greutatea specifică (g/cm^3): 1.029-1.031; substanţa uscată (g/100 g lapte): 16.7-18.5; grăsimea (g/100 g lapte): 7.1-8.4; proteina (g/100 g lapte): 3.9-4.3; cazeina (g/100 g lapte): 3.2-3.5; albumina (g/100 g lapte): 0.55-0.72; lactoza (g/100 g lapte): 4.6-4.8; substanţe minerale (g/100 g lapte): 0.69-0.79.

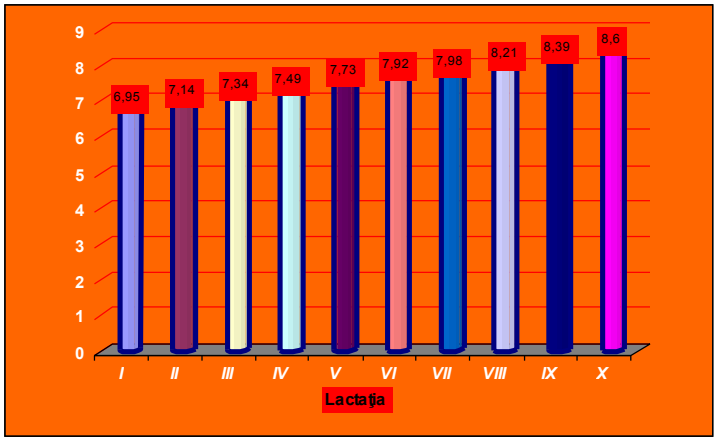


Figura 3.1.18 Conţinutul mediu de grăsime în funcţie de lactaţie la bivoliţele din judeţul Sălaj

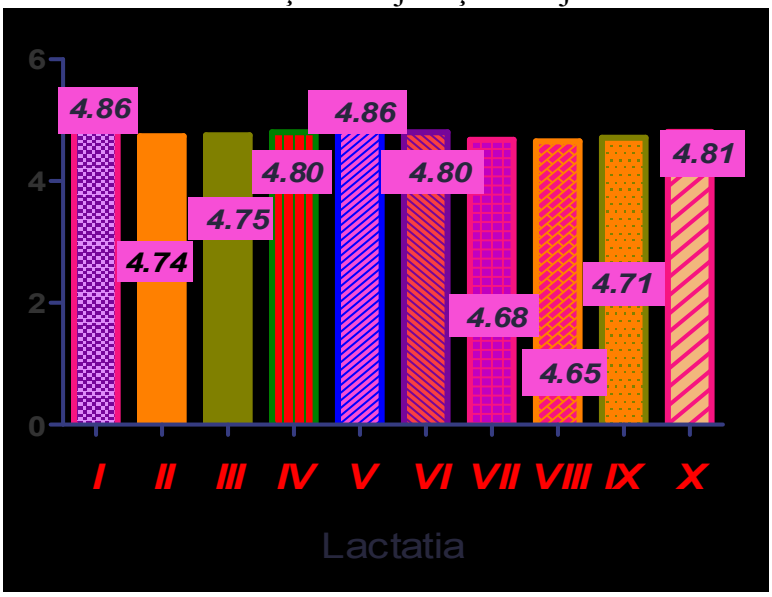


Figura 3.1.19 Conţinutul mediu de proteine în funcţie de lactaţie la bivoliţele din judeţul Sălaj

Proteina din laptele de bivoliţă variază (%) în funcţie de lactaţie astfel: în lactaţia I - 4.86±0.01, lactaţia II - 7.14±0.03, lactaţia III - 7.34±0.02, lactaţia IV - 7.49±0.02, lactaţia V - 4.86±0.03, lactaţia VI - 4.80±0.02, lactaţia VII - 4.68±0.03, lactaţia VIII - 4,65±0.04, lactaţia IX - 4.71±0.01, lactaţia X - 4.81±0.02.

Georgescu Gh., în anul 2000, la bivoliţele luate în studiu a constat că procentul mediu de proteină în lapte a fost de 4.0%. Dacă comparăm aceste date cu cele obţinute la bivoliţele italiene, **(Nardone A. şi col., 1993)** au obţinut un procent mediu de proteină de 4.65%.

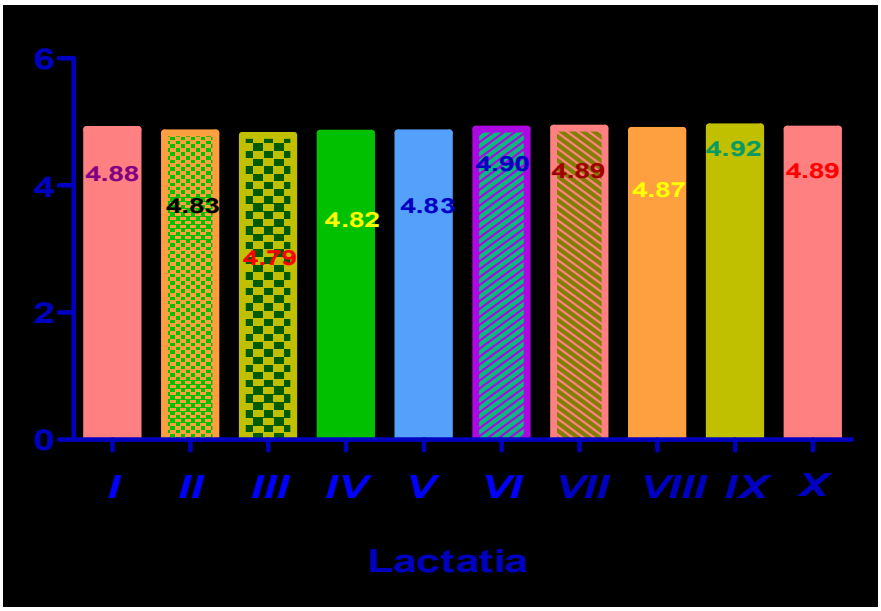


Figura 3.1.20 Conţinutul mediu de lactoză în funcţie de lactaţie la bivoliţele din judeţul Sălaj

Aleksiev A. şi col., 1986, în urma cercetărilor realizate asupra bubalinelor au obţinut următoarele valori pentru grăsime: în cazul bubalinelor bulgăreşti: 7.50%; pentru Murrah bulgăresc: 7.55%; Murrah bulgăresc şi caucazian 8.02%.

În ceea ce priveşte SUT din laptele de bivoliţă, aceasta variază astfel: în lactaţia I este de 18.05%, după care scade puţin în lactaţia a-II-a şi creşte începând cu lactaţia a-III-a până în lactaţia a-VII-a, după care scade foarte puţin în lactaţia a-VIII-a şi creşte până la 18.93% în lactaţia a-X-a (figura 3.1.21).

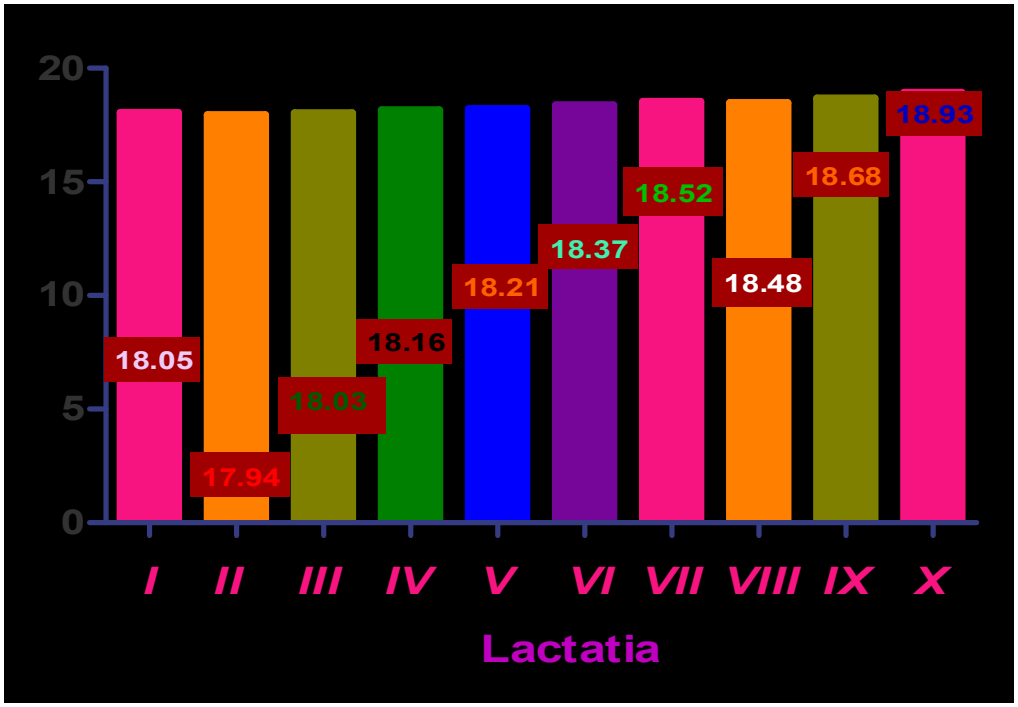


Figura 3.1.21 Conţinutul mediu în SUT în funcţie de lactaţie la bivoliţele din judeţul Sălaj

CAPITOLUL 4

CERCETĂRI PRIVIND VALOAREA PARAMETRILOR MICROBIOLOGICI AI LAPTELUI DE BIVOLIŢĂ

4.1 ASPECTE GENERALE

Determinările efectuate pentru evidenţierea calităţii microbiologice a laptelui de bivoliţă s-au realizat în cadrul următoarelor unităţi: Autoritatea de Sănătate Publică Cluj-Napoca, Fundaţia pentru Controlul Calităţii Laptelui Floreşti şi Laboratorul de Chimie din cadrul Facultăţii de Agricultură al USAMV Cluj-Napoca.

Pentru realizarea obiectivului propus pentru acest subcapitol au fost determinaţi următorii parametrii: celulele somatice, numărul total de germeni, numărul de drojdii şi mucegaiuri, *bacteriile coliforme*, numărului de *Stafilococi coagulazo pozitivi*, reziduurile de antibiotice, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, NTG aerobi mezofili şi evidenţierea microbiotei din laptele de bivoliţă cu ajutorul microscopului Axio Observer.

Probele de lapte de bivoliţă utilizate pentru examenul microbiologic au fost recoltate de la ferma TNP Mesendorf şi de la diferiţi crescători privaţi din judeţul Sălaj, în condiţii tehnice şi igienice corespunzătoare. Recipientele în care au fost prelevate probele au fost sterile şi pregătite în prealabil.

Primele jeturi de lapte de bivoliţă au fost aruncate, iar probele de lapte au fost recoltate individual. Recipientele în care au fost

recoltate probele de lapte au fost impermeabile la apă şi grăsimi. Toate etapele pentru examenul microbiologic s-au realizat cu ajutorul ustensilelor sterile. Probele de lapte de bivoliţă au fost introduse în lucru imediat cum au sosit în laborator.

Materialele utilizate: lapte de bivoliţă; plăci Petri sterile; pipete gradate sterile; mediul de cultură agar-glucoză-cartof; ser fiziologic steril; mojar steril; citrat de sodiu 2% steril, mediu nutritiv: triptonă-extract de drojdie-glucoză-agar, acid acetic 1%, mediul de îmbogăţire Chapmann lichid, anse bacteriologice sterile, medii de cultură: bulion cu verde malachit şi clorură de magneziu şi bulion selevit cistină: bulion cu triptoză şi lauril sulfat, BBLV (bulion lactozat cu bilă şi verde briliant).

Instrumente utilizate: microscopul Axio Observer A; Bactoscan FC; Screening test BRT.

4.2.1 Determinarea numărului de celule somatice din laptele de bivoliţă

Codex Alimentarius şi Federaţia Internaţională a laptelui în ultimii ani acordă o importanţă majoră laptelui şi produselor lactate de bivoliţă, inclusiv asupra calităţii microbiologice **(Ganguli N.C., 1997)**.

Conţinutul laptelui în celule somatice constituie un parametru atât de exploatare (numărul mare de celule somatice exprimă bivoliţe cu mamite, care determină pierderi economice), cât şi igienic (laptele

mamitic are aspect anormal, gust alterat şi compoziţie modificată) **(Pucheanu C., 2000)**.

Contaminarea iniţială şi temperatura de păstrare are influenţă asupra calităţii microbiologice a laptelui astfel: la o temperatură de 4.5ºC, într-un timp de 24 de ore poate să ajungă la 4000-300.000 germeni/ml; după 48 de ore: 4500-600.000 germeni/ml; la 10ºC timp de 24 de ore: 12.000-1.200.000; la 48 de ore:120000-15.000.000; la 16ºC: timp de 24 de: 1.500.000-27.000.000; şi la 48 de ore: 2.300.000-70.000.000.

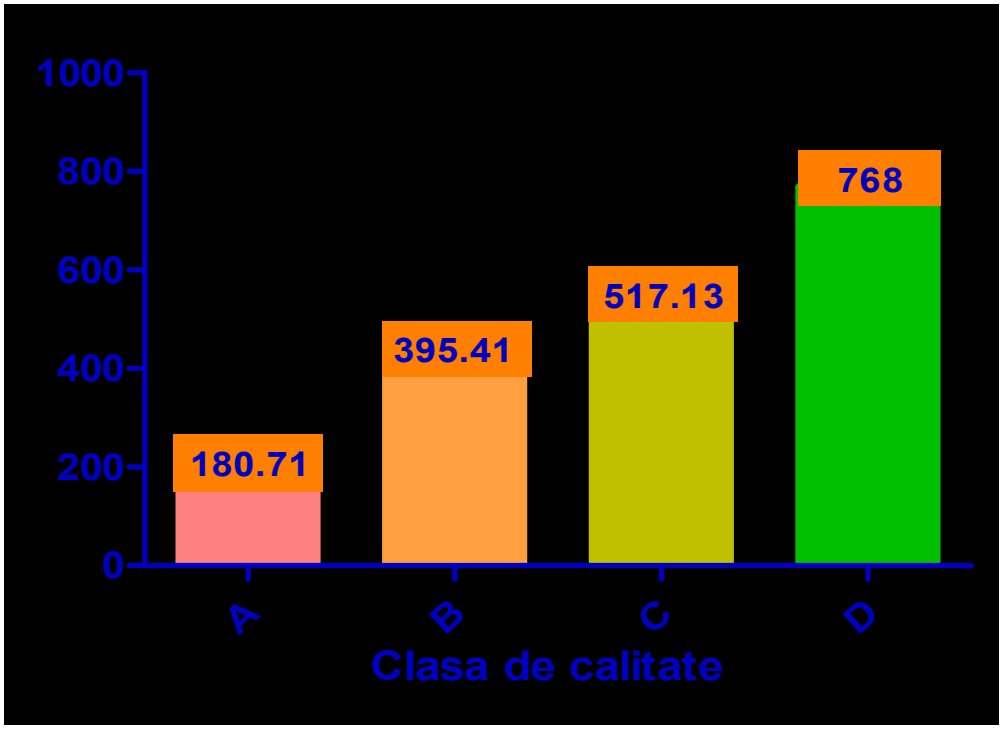


Figura 4.2.1 Valorile medii pentru celulele somatice în funcţie de clasa de calitate

Celulele somatice din laptele de bivoliţă au fost determinate conform metodei: SR EN ISO 13366-3-2001. Reprezentarea grafică a

numărului de celule somatice pentru probele analizate sunt redate în figura 4.2.1.

În Sir Lanka, în laptele de la diferite rase de bubaline, **(Silva S., 1994)** relatează că probele considerate normale (CMT negativ şi valorii medii ale pH-ului de 6.58) au un număr total de celule somatice care variază între 50.000 şi 375.000 celule/ml, fiind predominante leucocitele polimorfonucleare neutrofile, cu un număr relativ de 56%, mai mare faţă de laptele de vacă, urmate apoi de limfocite 28%, macrofage 8%, celule epiteliale 5% şi polimorfonucleare enzinofile 1%.

Investigaţiile făcute în ţara noastră într-o serie de ferme, rezultă că celulele somatice au variat între 190.000 şi 410.000/ml, atestând o situaţie mai bună decât în cazul încărcăturii microbiene **(Arţan C.N., 2007)**.

Conform Directivei U.E. 92/46 se prevede ca laptele să conţină un număr optim de celule somatice/ml sub 250.000 şi maxim 400.000 (până în anul 1997 a fost admis ca numărul maxim să fie de 500.000 celule/ml).

Consecinţele prezenţei unui număr mare de celule somatice are puternice repercursiuni economice asupra fermei, deoarece: se obţine un preţ mic pe laptele de bivoliţă, are loc reducerea producţiei de lapte la bubaline, precum şi creşterea costurilor cu substanţele medicamentoase.

Pragul maxim admis pentru laptele considerat sănătos s-a stabilit în jurul valorii de 400.000 celule/ml. Peste această limită, indiferent

dacă laptele prezintă sau nu modificări senzoriale sau biochimice, intră automat în categoria suspect şi este scos din circuitul de valorificare.

4.2.2 Determinarea numărului total de germeni

Normele internaţionale şi în special cele ale Uniunii Europene prevăd ca laptele crud să aibă un număr de germeni sub 100.000/ml, în cazul în care este mai mare generează dificultăţi de conservare şi în consecinţă este impropriu pentru procesare, totodată intervenind şi cheltuieli speciale pentru pasteurizare şi sterilizare **(Georgescu Gh., 2000)**.

Primele două clase de calitate A şi B pentru lapte se achiziţionează la preţuri mai mari, iar pentru ultima clasă preţul oferit este mai scăzut, din cauza faptului că există pericolul să compromită calitatea produselor cerute pe piată.

În funcţie de conţinutul în germeni, se stabileşte calitatea bacteriologică a laptelui. Aşadar, cele mai multe fabrici oferă preţul pentru lapte în funcţie de calitatea bacteriologică. Numărul total de germeni a fost determinat cu ajutorul Bactoscan FC. Rezultatele obţinute în urma determinării acestui parametru sunt prezentate în figura 4.2.2.

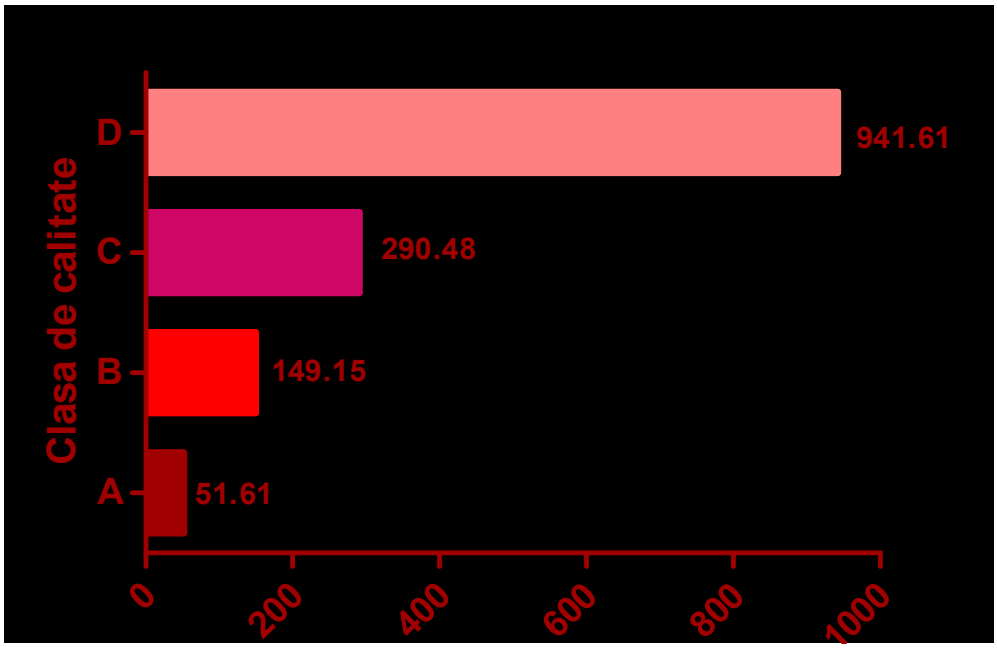


Figura 4.2.2 Valorile medii pentru numărului total de germeni în funcţie de clasa de calitate

Cu privire la numărul total de germeni (figura 4.2.2), în cazul probelor de lapte de bivoliţă prelevate din diverse exploataţii familiale din judeţul Sălaj, după cum se poate observa au existat şi probe care se încadrează în clase de calitate mai slabe C şi D; una dintre cauzele existenţei unui număr de germeni şi unui număr de celule somatice mai mare este şi faptul că mulsul se realizează manual şi în condiţii care nu corespund din punct de vedere igienic.

Cu privire la încadrarea principalilor parametrii de calitate ai laptelui de bivoliţă pe clase de calitate, cele mai importante componente şi cu implicaţii profunde sunt numărul total de celule somatice, precum şi numărul total de germeni (tabelele 4.2.1 şi 4.2.2).

Tabelul 4.2.1

Valorile medii şi variabilitatea pentru principalii indici în funcţie de clasa de calitate a laptelui de bivoliţă din judeţul Sălaj

N	Clasa de calitate A							
	$x \pm s_X$ V%	Grăsimea (%)	Proteina (%)	Lactoza (%)	SUN (%)	Punct Îngh. (°C)	NCS (mii/ml)	NTG (mii/ml)
12	$x \pm s_X$	8.02±0.02	4.70±0.04	4.79±0.03	10.74±0.06	-0.534	218±22.90	52.14±4.32
	V%	0.94	2.96	1.94	1.78	-1.70	63.04	49.70
	Clasa de calitate B							
16	$x \pm s_X$	7.92±0.19	4.62±0.04	4.71±0.03	10.70±0.05	-0.530	411.16±23.31	149.15±21.38
	V%	9.35	3.75	2.94	2.0	-0.92	24.71	57.35
	Clasa de calitate C							
22	$x \pm s_X$	7.36±0.34	4.50±0.18	4.63±0.21	10.47±0.06	-1.054	517.13±63.06	290.48±30.34
	V%	22.02	20.45	21.85	2.49	-1.87	58.48	50.09
	Clasa de calitate D							
26	$x \pm s_X$	7.53±0.07	4.55±0.91	5.65±0.05	10.55±0.05	-1.04	768±161.63	941.61±23.28
	V%	5.03	5.03	6.02	2.53	-0.96	50.03	12.61

În tabelul 4.2.2 sunt prezentate însuşirile calitative ale laptelui de bivoliţă şi încadrarea pe clase de calitate. În cazul fermei Mesendorf, probele recoltate au fost supuse examenului fizico-chimic şi microbiologic şi încadrate în două clase de calitate şi anume un număr de 36 de probe sunt încadrate în clasa de calitate A şi un număr de 19 probe sunt încadrate în clasa de calitate B.

Sub raportul principalelor componente studiate, putem trage concluzia că în cadrul fermei Mesendorf (tabelul 4.3.2) însuşirile calitative ale laptelui de bivoliţă sunt superioare celor din judeţul Sălaj (tabelul 4.3.1), deoarece sunt încadrate doar pe două clase de calitate, acest fapt fiind datorat stimulării mulgătorilor din cadrul fermei din punct de vedere

financiar, care sunt remuneraţi în funcţie de clasa de calitate în care este încadrat laptele.

În figura 4.2.3 sunt reprezentate însuşirile fizico-chimice pentru probele de lapte care au corespuns din punct de vedere microbiologic clasei de calitate A şi prezintă următorele valori: pentru grăsime (%): 8.02±0.02, proteină (%): 4.70±0.04, lactoza (%): 4.79±0.03, S.U.N. (%): 10.74±0.06, punctul de îngheţ: -0.534°C.

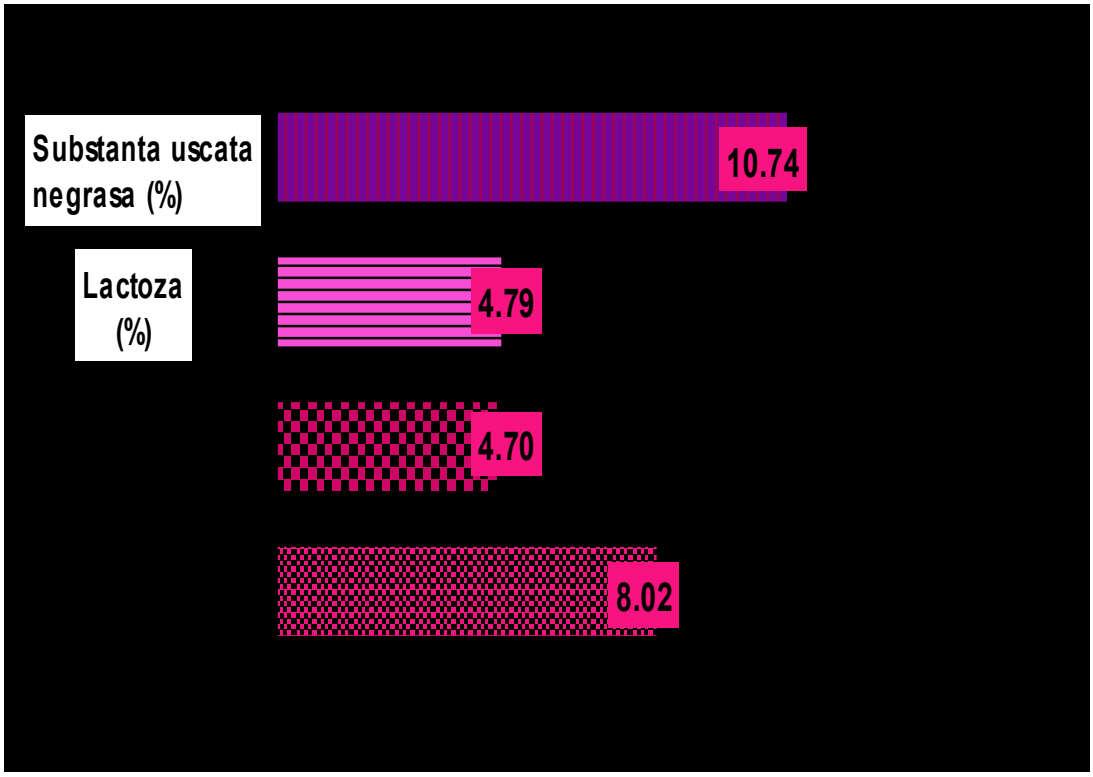


Figura 4.2.3 Variabilitatea parametrilor fizico-chimici pentru clasa de calitate A

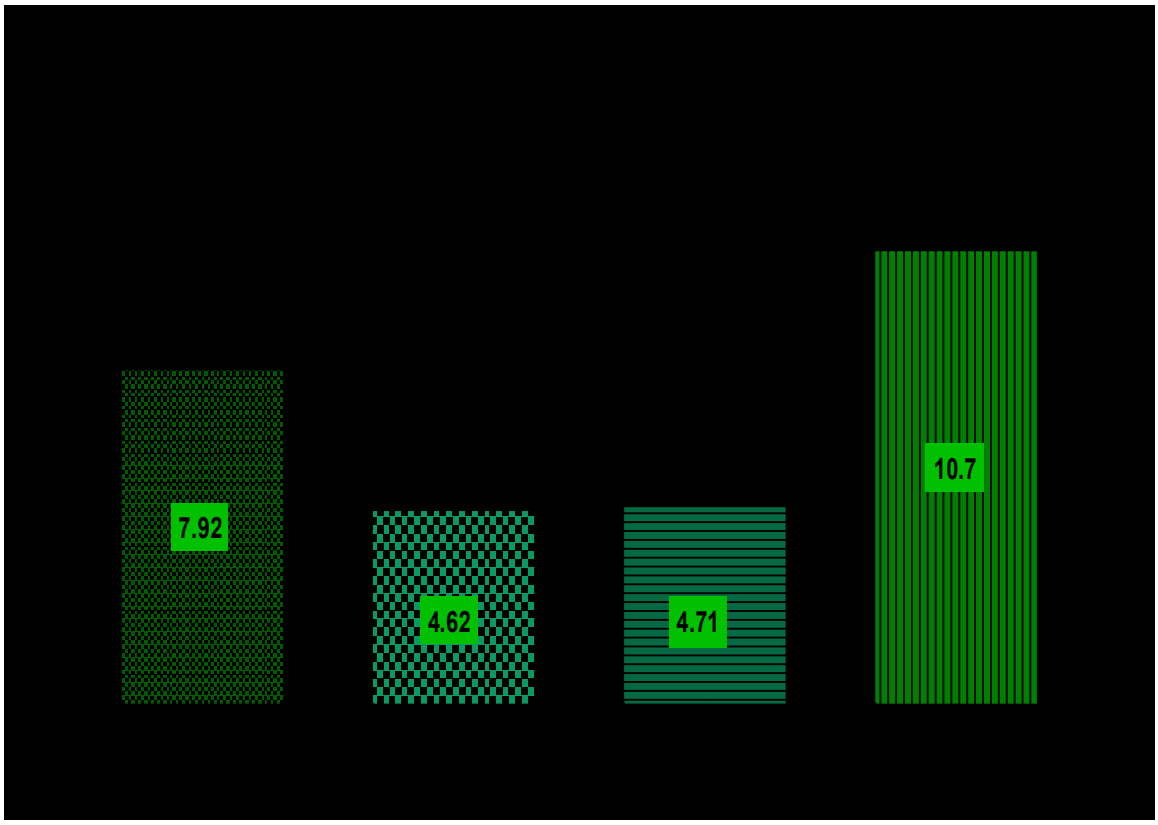


Figura 4.2.4 Variabilitatea parametrilor fizico-chimici pentru clasa de calitate B

Parametrii fizico-chimici pentru probele examinate şi care din punct de vedere microbiologic au fost încadrate în clasa B, ca urmare a NTG-ului şi NCS-ului, prezintă următoarele valori: grăsimea (%): 7.92±0.19, proteina (%): 4.62±0.04, lactoza (%): 4.71±0.03, S.U.N. (%): 10.70±0.05, punctul de îngheţ: -0.530°C, valori comparabile cu datele din literatură.

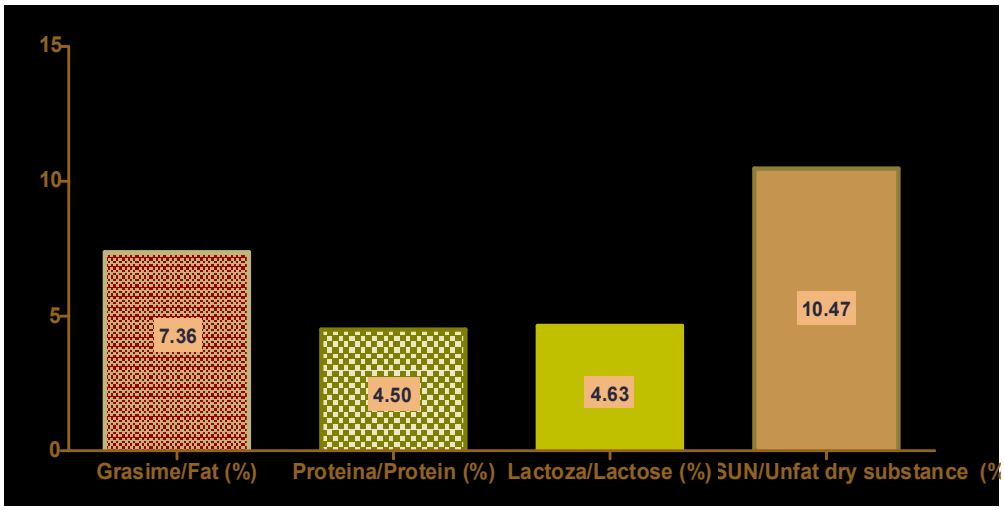


Figura 4.2.5 Variabilitatea parametrilor fizico-chimice pentru clasa de calitate C

Cercetările realizate pe lapte de bivoliţă de către **(Fundora şi col., 2001 şi Lindmark-Mansson şi col., 2003)** indică următoarele valori: media pentru grăsime (%) este de 7.59±1.31, proteina (%): 4.86±0.44 şi lactoza (%): 4.74±0.20.

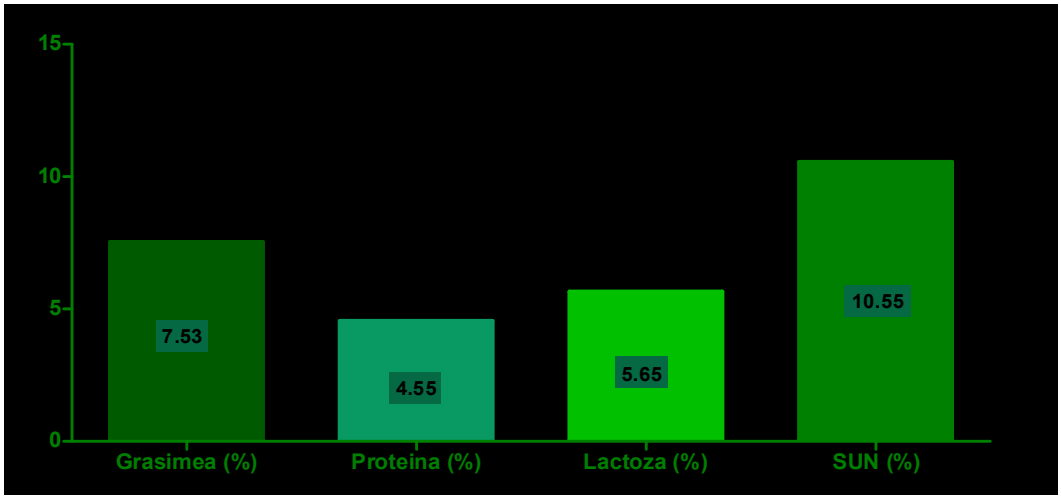


Figura 4.2.6 Variabilitatea parametrilor fizico-chimice pentru clasa de calitate D

În figurile 4.2.5 şi 4.2.6 sunt prezentaţi parametrii fizico-chimici pentru probele de lapte de bivoliţă încadrate în clasele de calitate C şi D pe baza examenului microbiologic.

Pentru probele de lapte de bivoliţă provenite de la ferma TNP Mesendorf, media pentru grăsime (%) a fost între 7.42±0.11 şi 8.08±0.03, pentru proteină (%) a fost între 4.73±0.01 şi 4.81±0.03, pentru lactoză (%): 4.85±0.01 şi 4.84±0.02, pentru SUN (%): 10.61±0.04 şi 10.80±0.04, punctul de îngheţ: -0.540 şi -0.530°C.

Tabelul 4.2.2

Valorile medii şi variabilitatea principalilor indici calitativi pentru laptele de bivoliţă de la ferma TNP Mesendorf

N	Clasa de calitate A							
	$x \pm s_X$ V%	Grăsimea	Proteina	Lactoza	SUN	Punct Îngh.	NCS	NTG
36	$x \pm s_X$	7.42±0.11	4.73±0.01	4.85±0.01	10.61±0.04	-0.540	180.71±32.31	51.61±6.13
	V%	9.26	1.54	1.54	2.23	-1.49	71.52	41.18
	Clasa de calitate B							
19	$x \pm s_X$	8.08±0.03	4.81±0.03	4.84±0.02	10.80±0.04	-0.530	395.41±43.97	116.89±23.07
	V%	4.25	2.49	1.93	1.54	-4.39	44.48	86.04

4.2.3 Determinarea numărului de drojdii şi mucegaiuri

Drojdiile şi mucegaiurile sunt foarte răspândite în natură, prezenţa lor indică condiţii necorespunzătoare în timpul procesului tehnologic de obţinere şi pe parcursul depozitării, iar acţiunea lor

asupra alimentelor modifică aspectele organoleptice **(Guş Camelia şi col., 2005)**.

Tehnica de lucru: înainte de a se realiza însămânţarea în mediile de cultură, probele de lapte de bivoliţă au fost omogenizate. Se recoltează 1 ml care se introduce în 10 ml ser fiziologic steril şi se obţine o diluţie de 10^{-1}. Pentru probele din brânza telemea s-au cântărit 10 g care a fost uniformizat, într-un mojar steril, amestecat cu 90 ml soluţie citrat de sodiu 2% sterilă ca diluant, se încălzeşte proba la 47°C până la realizarea unei suspensii omogene, diluţie de 10^{-1}.

După realizarea diluţiei, din fiecare diluţie se pune câte 1 ml în câte 2 plăci Petri, inclusiv din proba nediluată şi se adaugă mediul topit şi răcit la 45°C, după care se realizează o rotire a plăcilor. După solidificare se incubează la tempertura de 20°C, la întuneric, 5 zile.

Numărarea coloniilor drojdiilor şi mucegaiurilor se face pe toată suprafaţa plăcilor, dar sunt luate în considerare doar plăcile care au între 10 şi 100 colonii. Se calculează media aritmetică a numărului de colonii găsite în cutiile Petri inoculate din aceiaşi diluţie. Numărul calculat se înmulţeşte cu factorul de diluţie, exprimarea se face în număr de colonii/ml produs.

4.2.4 Determinarea prezenţei şi a numărului de *stafilococi coagulazo pozitivi*

Stafilococii sunt bacterii Gram pozitive, de formă cocoidă, grupaţi în ciorchine. În microbiologia alimentelor interesul este axat pe

speciile *Stafilococus aureus*, care produc o enterotoxină termostabilă şi este evidenţiată prin testul coagulazei. *Stafilococii* sunt medii care preferă mediile hipersaline (7.5-15.0% NaCl) **(Guş Camelia şi col., 2005)**.

Tehnica de lucru: pentru determinarea stafilococilor coagulazo-pozitivi, s-au inoculat după omogenizarea produsului din fiecare diluţie (10^{-1}) câte 1 ml în 3 tuburi cu mediul de îmbogăţire Chapmann lichid, de culoare roşie şi se incubează la 37°C, 24 de ore. Stabilirea numărului de stafilococi se face folosind tabelele Mac-Crady. Din fiecare tub în care există dezvoltare microbiană, se face un frotiu pentru constatarea stafilococilor şi se fac treceri cu ansa pe mediul turnat în plăci, prin striere şi apoi se incubează. Coloniile caracteristice de *stafilococi* dezvoltate de mediul selectiv se supun testului de patogenitate, testul de hemoliză.

Rezultate: cu privire la *stafilococi coagulazo pozitivi* în probele de lapte de bivoliţă luate în studiu, nu a fost confirmată prezenţa lor.

4.2.5 Izolarea şi identificarea *Salmonellelor*

Salmonella este o enterobacterie patogenă pentru om şi animale, existând peste 2000 de serotipuri. Toxiinfecţiile produse de germenii din genul *Salmonella* sunt mai frecvente în sezonul cald, deoarece temperatura este un factor favorizant al dezvoltării şi multiplicării lor **(Guş Camelia şi col. 2005)**.

Modul de lucru: Pentru evidenţierea *salmonellelor* sunt necesare următoarele etape: **Etapa de preîmbogăţire:** din proba de lapte de bivoliţă se cântăresc 25 de ml, iar pentru brânza telemea se cântăresc 25 g pentru analiză. Probele se introduc în 200-225 ml apă peptonată tamponată şi se incubează la +35ºC, timp de 16 h.

Etapa de îmbogăţire: acestă etapă se realizează pe următoarele medii de cultură: bulion cu verde malachit şi clorură de magneziu şi bulion selevit cistină.

Etapa de izolare selectivă: se realizează pe medii solide Edel şi Kampelmacher.

Etapa de confirmare: din plăcile cu colonii prezumptive de a fi *Salmonella* se selectează 5 colonii caracteristice de *Salmonella* şi se însămânţează în câte o eprubetă cu agar înclinat TSI şi LIA. Însămânţarea se face prin înţepare şi striere în pantă, şi are loc incubarea la +37°C, timp de18 h.

În cazul prezenţei *Salmonellei* se observă pe mediul TSI apariţia culorii roşii; de-a lungul înţepăturii coloanei se observă sau nu prezenţa H_2S prin prezenţa sau absenţa culorii negre. Pe mediul LIA, prezenţa *salmonellelor* se examinează prin:coloana violet purpurie; partea superioară negricioasă. Coloniile care au răspuns tipic pentru *salmonella* de pe mediile de izolare se supun aglutinării.

Tabelul 4.2.3

Rezultatele obţinute la examenul microbiologic al laptelui de bivoliţă

N	Parametrii statistici	Bacteriile coliforme/ml	Nr. total de drojdii şi mucegaiuri/g	NTG aerobi mezofili x 10^5/ml	*Salmonella*/25 ml	Stafilococ Coagulazo Pozitiv/1	*Bacilus cereus*
23	$s \pm s_x$	4.96±0.47	633.47±20.01	4.46±0.11	Absent	Absent	Absent
	s	2.04	87.22	0.48			
	v	41.17	13.17	10.83			

Escherichia coli a fost prezentă în 3 probe din cele 23 de probe de lapte de bivoliţă analizate şi a avut următoarele valori: 1.5 *E.coli* x 10^3/ml, 1.1 *E.coli* x 10^3/ml, respectiv 2.9 *E.coli* x 10^3/ml.

În urma determinării parametrilor microbiologici din laptele de bivoliţă media pentru *bacteriile coliforme* a fost de 4.96±0.47, pentru numărul total de drojdii şi mucegaiuri a fost de 633.47±20.01, pentru NTG aerobi mezofili a fost de 4.46±0.11.

În ceea ce priveşte *Salmonella*, *Stafilococul coagulazo pozitiv* şi *Bacilus cereus*, aceştia au fost absenţi.

Bacteriile coliforme în laptele de bivoliţă la rasa Murrah au fost de 3.95±0.07, *Escherichia coli* de 1.80±0.23 şi *Streptococus aureus* de 1.80±0.23, fungii 1.33±0.46; la rasa Nili-Ravi: bacteriile coliforme 2.16±0.30, *Escherichia coli* 1.80±0.23, *Streptococus aureus* 1.95±0.36, fungii de 1.33±0.46 **(Bei-Zhong Han şi col., 2006)**.

Aminah M. şi col., 2004, în cazul laptelui de bivoliţă obţine o medie de 1.68 ± 0.19 la *Streptococus aureus* comparativ cu media de 4.2±0.02 în cazul laptelui de vacă **(Han Sesenna şi col., 2005)**.

Desmasures B. şi col., în 1997 în urma cercetărilor efectuate asupra laptelui de bivoliţă au obţinut o medie pentru *bacteriile coliforme* de 2.42±0.12 şi 1.53±0.17 pentru *Escherichia coli*.

4.2.6 Evidenţierea *Bacteriilor coliforme şi Escherichiei coli*

4.2.6.1 Material şi metodă

Bacteriile coliforme: sunt bacterii care la temperatura de 30, 35, 37°C, provoacă fermentarea lactozei cu producere de gaz. Bacteriile coliforme se cultivă, conform SR ISO 5541/1; SR ISO 5541/2 pe medii de îmbogăţire selective: bulion cu triptoză şi lauril sulfat (ce poate fi mediu dublu concentrat sau mediu simplu concentrat), BBLV (bulion lactozat cu bilă şi verde briliant) simplu şi dublu concentrat, mediu ce se introduce în eprubete cu tub Durham pentru a putea urmări degajarea de gaze.

Din produsul omogenizat şi din diluţiile acestuia se însămânţează câte 1 ml într-o eprubetă ce conţine unul din mediile selective enumerate mai sus. În cazul produselor solide (când se verifică prezenţa în 1 g produs), din fiecare diluţie (10^{-1}) se inoculează 1 ml într-o eprubetă cu 10 ml mediu BBLV dublu concentrat.

Diluția Nr.eprubetei	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-	-
3	+	+	-	-	-	-

Dezvoltarea unei culturi bacteriene cu gaze în tubul de fermentaţie, formată exclusiv din bacili sau cocobacili Gram negativi (frotiu), se consideră prezenţă de bacterii coliforme. În funcţie de diluţii sau de numărul de eprubete din fiecare diluţie care conţin bacterii coliforme, se raportează prezenţa sau absenţa la cantitatea de produs sau numărul de bacterii coliforme pe g/ml produs.

Numărul de tuburi pozitive din fiecare diluţie luată în calcul conduce la o formulă care prin comparare cu scara Mac-Crady, dă numărul probabil de bacterii coliforme, pe care dacă este cazul o înmulţim cu 10, 100, 1000, în funcţie de câte diluţii am neglijat până la realizarea formaţiei. Un exemplu reprezintă cel prezentat mai jos.

Formaţia 2 2 1. În cazul nostru îi corespund 3 germeni *coliformi*/g, pe care-i înmulţim cu 100 deoarece am neglijat două diluţii (10^{-1}, 10^{-2}) şi încă cu 10 deoarece vrem să aflăm produsul nediluat. Cifra obţinută se compară cu numărul de *coliformi* admişi/g, la sortimentul de produs.

Escherichia coli. Din cultura dezvoltată cu ajutorul unei anse bacteriologice sterile, se striază pe agarul Levine. Plăcile însămânţate se incubează la 35-37°C, 24 h. Coloniile caracterisice pentru *Escherichia coli* închise la culoare cu luciu metalic verzui sunt considerate *E. coli prezumptive*.

Pentru confirmare din două sau mai multe colonii caracteristice se însămânţează o eprubetă cu BBLV sau bulion EC sau bulion triptoză şi lauril sulfat cu tuburi de fermentare; o eprubetă cu apă triptonată şi un agar nutritiv înclinat.

Aceste eprubete se incubează la 45°C timp de 24 h, considerându-se confirmată *Escherichia coli* când s-a înregistrat producere de gaze în tubul Durham, reacţia indolului pozitivă (după adăugarea reactivului Erlich-Kovacs în apa triptonată) şi creşterea de colonii specifice pe agarul înclinat (colonii mici de 2-6 mm diametru, opace, nepigmentate, de tip S). De pe mediul cu agar înclinat se face o seroaglutinare rapidă pentru identificarea antigenului somatic „O” cu seruri polivalente şi teste biochimice.

Escherichia coli este specia reprezentativă a genului *Enterobacteriaceae*, care este capabilă să se dezvolte atât în condiţii anaerobe, cât şi în condiţii aerobe. Este capabilă să utilizeze carbon şi azot ca şi sursă de a-şi satisface nevoile energetice si metabolice. Astfel, *E. coli* se poate multiplica, poate creşte în medii care conţin numai glucoză, amoniu şi săruri minerale.

E.coli se dezvoltă pe o varietate de medii care conţin combinaţia de carbon cu alte substanţe; însă preferă mediile cu glucoză. Glucoza

este transportată de-a lungul membranei citoplasmatice **(Konings, W.N., 1981)**.

Tabelul 4.2.4

Metode de determinare a parametrilor microbiologici

Parametrii microbiologici	Metode de determinare
Număr de bacterii coliforme	SR ISO 5541/1 sau SR ISO 5541/2 sau STAS 6349/4
Număr de *Escherichia coli*	SR ISO 11866 STAS 6349/4

Izolarea *E. coli* O_{157}:H_7 din alimente este mult mai dificilă din cauza prezenţei în număr mic. Dată fiind doza minimă infectantă extrem de redusă, specialiştii americani acceptă folosirea numai a metodelor foarte sensibile, capabile să detecteze bacteria şi din alimentele contaminate cu 3 celule bacteriene/g produs. În acest scop s-au pus la punct mai multe metode de lucru care toate includ o fază de îmbogăţire, una de izolare selectivă şi alta de identificare şi confirmare **(Kornberg H.L, 1966)**.

Cercetările au ca scop stabilirea lui *Escherichia coli* în laptele de bivoliţă, materie primă, de la ferma TNP Mesendorf, lapte care a fost menţinut la o temperatură de 0-4°C, pînă în momentul analizei.

Mod de lucru: din fiecare probă de lapte de bivoliţă s-au efectuat analize specifice pentru determinarea prezenţei *bacteriilor coliforme* şi ulterior a *Escherichiei coli.* Apoi din fiecare probă de lapte de bivoliţă materie primă s-au repartizat câte 10 ml lapte în eprubete;

după care s-au însămânţat câte 1, 2 şi respectiv 3 ml de *Escherichia coli*-cultură pură obţinută în prealabil.

Obţinerea culturilor pure de microorganisme din specia *Escherichia coli* a fost pentru prima dată izolată şi descrisă de pediatrul german **(Theodor Escherich, 1885)**, care a demonstrat existenţa ei ca musafir obişnuit al intestinului copilului. Pentru a marca tropismul său pentru colon, autorul a numit această bacterie *Bacterium coli commune*. În **1919, Castelani şi Chalmers** îi dau numele definitiv de *Escherichia coli*, ca un omagiu adus lui Escherich.

Escherichia coli: cultura pură de microorganisme (*Escherichia coli),* este prezentă sub formă liofilizată în anse microbiologice. Se procedează într-o primă etapă la rehidratarea lor prin cultivarea în bulion şi se incubează 24 h la 37°C.

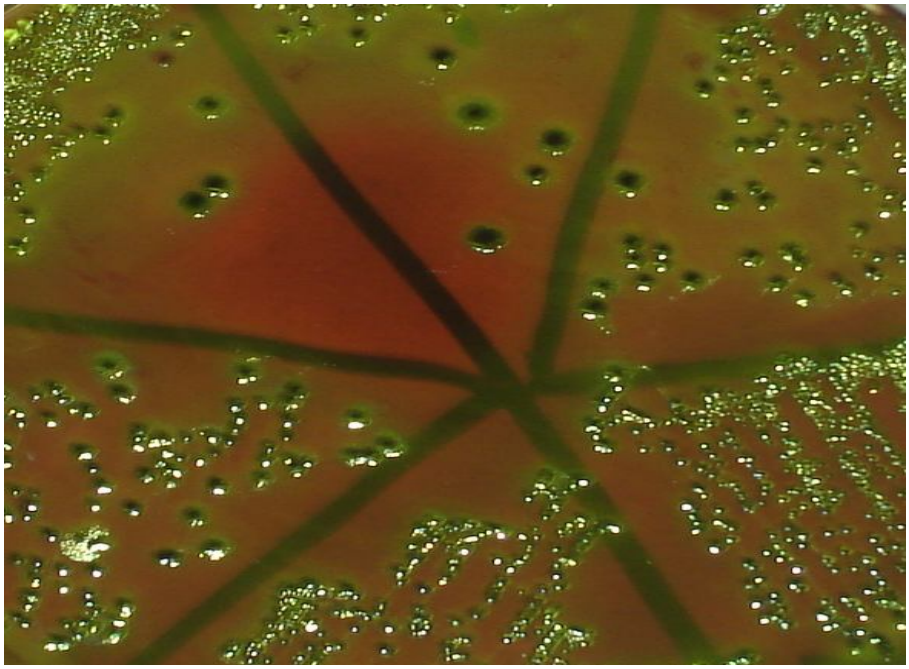


Figura 4.2.7 Culturile pure însămânţate în bulion

În cele ce urmează se realizează izolarea selectivă din diferite diluţii ale culturii pure pe agar Levin (diluţii şi incubare 24 h la 37°C). Stabilirea numărului de *bacterii coliforme* se face folosind tabelele Mac-Crady. Eprubetele cu mediul însămânţat se incubează la 37°C, 24-48 h.

Dezvoltarea unei culturi bacteriene cu gaze în tubul de fermentaţie, formată exclusiv din *bacili* sau *cocobacili Gram negativi* (frotiu), se consideră prezenţă de bacterii coliforme.

În funcţie de diluţii sau numărul de eprubete din fiecare diluţie care conţin *bacterii coliforme*, se raportează prezenţa sau absenţa la cantitatea de produs sau numărul de *bacterii coliforme* pe g/ml produs.

Laptele reprezintă un mediu de cultură complet şi foarte favorabil pentru numeroase microorganisme sau mediu convenabil de supravieţuire a altor microorganisme care nu se pot multiplica în lapte, dar care îl pot polua (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *rickettsii*, *virusuri*) **(Bărzoi D., 2002)**.

4.2.6.2 Medii de cultură, reactivi şi soluţii de diluare

1. Ser fiziologic, clorură de sodiu 8.5 ml; apă distilată 1000 ml. Se ajustează la pH 7.2 cu NaOH 1/N (aprox.175 ml) şi se aduce volumul la 1 litru cu apă distilată. Aceasta reprezintă soluţia de lucru, care se repartizează în recipiente de lucru şi se sterilizează, la 121°C, 15 minute.

2. Bulion - bilă - lactoză - verde briliant (BBLV). Simplu concentrat: peptonă 10 g, lactoza 10 g, bilă uscată de bou 20 g, verde briliant 0.0133, sau 13.3 ml soluţie alcoolică $1^{o}/_{oo}$, apă distilată 1000 ml la pH de 7.3; dublu concentrat: peptonă 20 g, lactoza 20 g , bilă uscată de bou 40 g, verde briliant 0.0266, sau 26.6 ml soluţie alcoolică $1^{o}/_{oo}$, apă distilată 1000 ml la pH de 7.3.

Cele 20 g bilă uscată de bou se pot înlocui cu 200 ml bilă lichidă, scăzând la 800 ml cantitatea de apă. La apa distilată se adaugă peptona şi bila de bou. Se fierb până la dizolvare, se ajustează pH-ul, se filtrează prin vată într-un balon în care s-au pus lactoza şi verdele briliant. Se repartizează în eprubete cu tuburi de fermentaţie. Se autoclavează 20 min. la 110°C.

Interpretare: fermentarea cu gaze a lactozei: apariţia gazelor în tubul de fermentaţie.

Determinarea speciei *Escherichia coli.* Din eprubetele pozitive pe mediul BBLV, se striază cu ansa pe suprafaţă agarul Levine turnat în placa Petri.

Plăcile însămânţate se incubează la 35-37°C, 24 h. Coloniile caracteristice pentru *Escherichia coli*, închise la culoare, cu luciu metalic verzui sunt considerate *E. coli* prezumptive. Pentru aprecierea cantitativă a *Escherichiei coli* se însămânţează în mediul Levine din fiecare diluţie pozitivă pentru bacteriile coliforme şi se incubează la 35-37°C, 24 h. Se determină apoi numărul de diluţii la care s-au obţinut rezultate pozitive, respectiv coloniile cu irizaţie metalică verzuie. Se citesc rezultatele finale cu ajutorul tabelului Mac-Crady.

Pentru confirmare, din două sau mai multe colonii caracteristice se însămânţează o eprubetă cu BBLV sau bulion triptoză şi lauril sulfat cu tuburi de fermentare; o eprubetă cu apă triptonată şi un agar nutritiv înclinat. Aceste 3 eprubete se incubează la 45°C timp de 24 h, considerându-se confirmată *Escherichia coli* când s-a înregistrat producere de gaze în tubul Durham, reacţia indolului pozitivă (după adăugarea reactivului Erlich-Kovacs în apa triptonată) şi creşterea de colonii specifice pe agarul înclinat (colonii mici de 2-6 mm diametru, opace, nepigmentate de tip S).

Soluţii de diluare, medii de cultură şi reactivi: agar cu lactoză - eozină - albastru de metilen (agar Levine): peptonă 10 g, proteoză 10 g, fosfat dipotasic 2 g, agar 15 g, eozină yellow 0.4, albastru de metilen 0.065, apă distilată 1000 ml, pH 7.1

Se prepară mai întâi mediul de bază care conţine peptonă, fosfat, agar şi apă în cantităţile din reţetă. Se repartizează câte 100-200 ml în recipiente adecvate şi se autoclavează. Se poate păstra timp îndelungat la rece şi întuneric.

Mediul de bază poate conţine (după unele formule) şi lactoză. În acest caz autoclavarea se face 20 minute la 115°C. În momentul folosiri, la 100 ml mediu de bază se adaugă: 5 ml soluţie 20% lactoză (sterilizată prin filtrare); 2 ml eozină galbenă sol. 2% şi 1.3 ml albastru de metilen, soluţie 0,5%. Amestecul se agită pentru omogenizare şi se toarnă în plăci. Mediul gata de folosit are culoarea roz-roşu cu reflexe violet.

Interpretare: coloniile de *Escherichia coli* au diametrul de 2-3 mm, sunt de culoare verzuie, cu reflexe metalice şi centrul mai închis,

semitransparente sau netede de tip S, nepigmentate, cu miros amoniacal.

Celelalte *bacterii coliforme*: colonii de culoare albastră închis, fără luciu metalic sau colonii atipice, opace, mucoase, roze, cu centrul gri-brun.

Agar TSI (triple sugar iron agar) (Kligler modificat): extract de carne 3 g, extract de drojdie 3 g, peptonă bacto 15 g, proteoză peptonă 5 g, lactoză 10 g, zaharoză 10 g, glucoză 1 g, sulfat feros 0.2 g, clorură de sodiu 5 g, tiosulfat de sodiu 0.3 g, agar 15-20 g, fenol roşu 0.024 sau 2.4 ml din sol. 1%, apă distilată 1000 ml, pH 7.4.

Se repartizează câte 10-15 ml în eprubete şi se sterilizează. Mediul are culoare roşcată. Se păstrează la rece şi întuneric. În momentul folosirii, se topeşte şi se repartizează aseptic, câte 3-4 ml în eprubete de reacţie sterile, care se înclină imediat în aşa fel încât prin solidificare, mediul să formeze coloană înaltă şi pantă scurtă.

Se însămânţează cu ansa coloana prin înţepare şi panta prin striere. Mediul turnat în eprubetele de reacţie se va folosi în aceeaşi zi sau se poate păstra 2-3 zile la frigider. În acest ultim caz, eprubetele în care mediul s-a desprins de perete nu se mai folosesc.

Interpretare:

- ✓ H_2S prezent: coloana sau numai partea ei superioară de culoare neagră.
- ✓ Glucoza fermentată: coloana galbenă.
- ✓ Glucoza nefermentată: coloana roşie.
- ✓ Lactoza şi/sau zaharoza fermentate: panta galbenă.
- ✓ Lactoza şi/sau zaharoza nefermentate: panta roşie.

Mediu MILF: extract drojdie 3 g, glucoză 0.75 g, L-lizină 5, DL-triptofan 1, DL- fenilalanină 4, NaCl 5, Agar 3 g, bromcrezol purpur 1/500 (8 ml), apă distilată 1000 ml.

Ingredientele se dizolvă la cald şi, după ajustarea pH-ului la 6.8, mediul se repartizează în eprubete de 10/10 mm şi se sterilizează 30 minute la 110°C. După sterilizare mediul trebuie să fie perfect limpede. Solidificarea se face în poziţie verticală. Însămânţarea se execută prin înţepare pe toată înălţimea coloanei şi se incubează 24 h la 37°C **(Bărzoi D., 1997)**.

Exprimarea şi interpretarea rezultatelor. Am constatat că în laptele materie primă sunt prezente bacteriile coliforme într-un procent mai mare, iar în laptele însămânţat cu *Escherichia coli* sunt prezente în procent mai scăzut. Imaginile de mai jos prezintă exemplele pozitive şi negative privind numărul de bacterii coliforme şi *Escherichia coli*, calculate conform tabelului Mac-Crady. Formaţia de eprubete pozitive din cele trei diluţii pentru probele studiate s-a calculat conform tabelului Mac-Crady.

Aproximativ 95% din tulpinile de *Escherichia coli* sunt β-galaxolidază şi β-glucuronidază pozitive şi sunt clasificate în biotipul 1, iar restul tulpinilor nu elaborează una sau ambele enzime menţionate şi astfel aparţin biotipului 2. Având în vedere prevalenţa categorică a lui *Escherichia coli* biotipul 1 în totalul microorganismelor prezente în fecalele omului şi animalelor, se consideră a fi cel mai important şi mai fidel pentru aprecierea contaminării fecale a apei şi alimentelor **(Switzer R.L., 1977)**. Din aceleaşi motive, Comitetul American Naţional pentru Criteriile Microbiologice la Alimente (NACMCF) a

introdus câţiva ani *Escherichia coli* biotip 1 (*Escherichia coli* generică) ca indicator igienico-sanitar şi test obligatoriu pentru verificarea la nivelul abatoarelor a contaminării fecale a carcaselor animalelor de măcelărie şi ale păsărilor.

Acest test a fost introdus şi în ţara noastră şi se regăseşte în Programul Naţional al Acţiunilor Strategice Sanitare-Veterinare. Proprietăţile biochimice cele mai generale sunt fermentarea glucozei, lactozei, trehalozei, manitei, producerea de lizin-decarboxilază. Sunt unele excepţii, astfel, tulpinile enteroinvazive sunt lactoză si lizin-decarboxilază negative, ceea ce înseamnă că unele tulpini rămân nedecelabile prin metodele folosite curent în laboratoare. Majoritatea serotipurilor si tulpinilor de *E. coli* fermentează sorbitolul şi produc β-galaxolidază (excepţie *E. coli* O_{157}:H_7), sunt indolpozitive, nu pot folosi citratul ca unică sursă de carbon, dau recţia roşului de metil pozitivă şi VP negativă **(Baumberg, S., 1981)**.

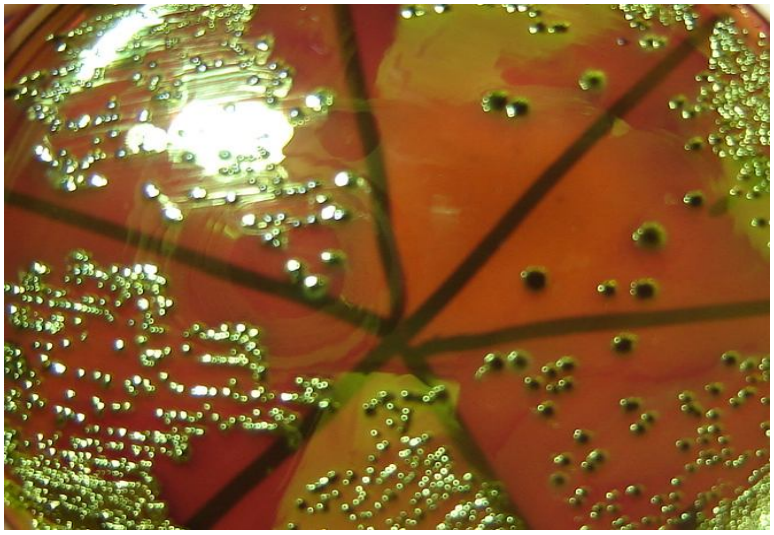


Figura 4.2.8 Evidenţierea lui *Escherichia coli*

Escherichia coli poate de asemenea să utilizeze şi acizii graşi, acetaţii, ca şi carbonul ca sursă de energie **(Nunn W.D., 1986)**. O parte din acetaţi, acizii graşi trebuie să fie formaţi din catene cu mai puţin de 12 atomi de carbon ca să poată carbonul fi o sursă de energie. Aici este o condiţie care trebuie supravegheată şi coordonată de la începerea sintezei a mai puţin de cinci acizi graşi, şi anume enzimele oxidative **(Kemp J.D., 1966)**.

În privinţa posibilităţii de a se dezvolta la temperatura de 44-45°C, mult timp s-a considerat că aceasta este una din însuşirile principale ale *E. coli*, care ar diferenţia-o de *Enterobacter*, *Klebsiella* şi alte enterobacterii **(Jensen K. F., 1990)**.

Se dezvoltă bine în mediile uzuale la temperatura optimă de 37°C, în bulionul nutritiv produce turbiditate intensă, uneori inel la suprafaţa coloanei de mediu, iar în culturile mai vechi, depozit abundent, neaderent. Pe suprafaţa agarului formează colonii cu diamnetrul de 2-6 mm, opace, nepigmentate, uşor bombate, de tip S. Culturile degajă un miros amoniacal-fecaloid.

Discuţia rezultatelor: Am constatat că din probele analizate un procent mai mare este reprezentat de *bacteriile coliforme* comparativ cu specia *Escherichia coli*, în laptele de bivoliţă ca materie primă, astfel înregistrându-se depăşiri ale valorii de referinţă din ORD. MS 975/98.

Prezenţa *bacteriilor coliforme* şi a genului *Escherichia coli* (considerat indicator sanitar) denotă deficienţe igienice grave. Aceasta poate proveni din apă sau de la personalul manipulator, indicând o contaminare fecală recentă. Înglobat în substraturi proteice şi în grăsime rezistă şi la temperaturi de pasteurizare.

Escherichia coli este specia reprezentativă a genului *Enterobacteriaceae*, care este capabilă să se dezvolte atât în condiţii anaerobe cât şi în condiţii aerobe **(Baumberg S., 1981)**. Este capabilă să utilizeze carbon şi azot ca şi sursă de a-şi satisface nevoile energetice şi metabolice **(Kornberg, H.L., 1966)**.

Escherichia coli se poate multiplica, poate creşte în medii care conţin numai glucoză, amoniu şi săruri minerale **(Nagatani, H., 1971)**.

E. coli se dezvoltă pe o varietate de medii care conţin combinaţia de carbon şi alte substanţe; însă preferă mediile cu glucoză.

Se constată că *Escherichia coli* se dezvoltă foarte bine dacă este într-o concentraţie mare, la rece, la temperatura de refrigerare. Alte specii care aparţin genului *Escherichia* sunt: *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. fergusonni*, *E. hermanii* şi *E. vulneris*. *E. adecarboxylata* este un microorganism de culoare galbenă **(Cole, J. A., 1968).**

Studiile recente au arătat că *E. adecarboxylata* poate sa facă parte din grupul *Enterobacter agglomerans-Erwinia* şi a fost încadrat în noul gen *Leclercia* **(Gyles, C. L., 1994)**.

Tabelul 4.2.5

Normele microbiologice conform OMS 975-1998

1	Denumirea alimentului	Număr total de germeni aerobi, mezofili	Bacterii coliforme	*Escherichia coli*	*Salmonella* 25 g	Stafilococ coagulazo pozitiv	*Bacillus cereus*	Bacterii sulfito-reducătoare	Drojdii şi mucegaiuri
1.	Lapte crud	1 000000	1 000	100	abs	abs	10	-	-
2.	Lapte consum	300 000	10	1	-	-	-	-	-

Evidentierea microbiotei din laptele de bivoliţă cu ajutorul microscopului Axio Observer A

Pentru evidenţierea microbiotei din laptele de bivoliţă s-a utilizat agar selectiv de *lactabacili* (7234). Acest agar inhibă dezvoltarea lui *Escherichia coli* şi *Staphylococcus aureus*, dar este posibilă dezvoltarea lui *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* şi *Lactobacillus plantarum*.

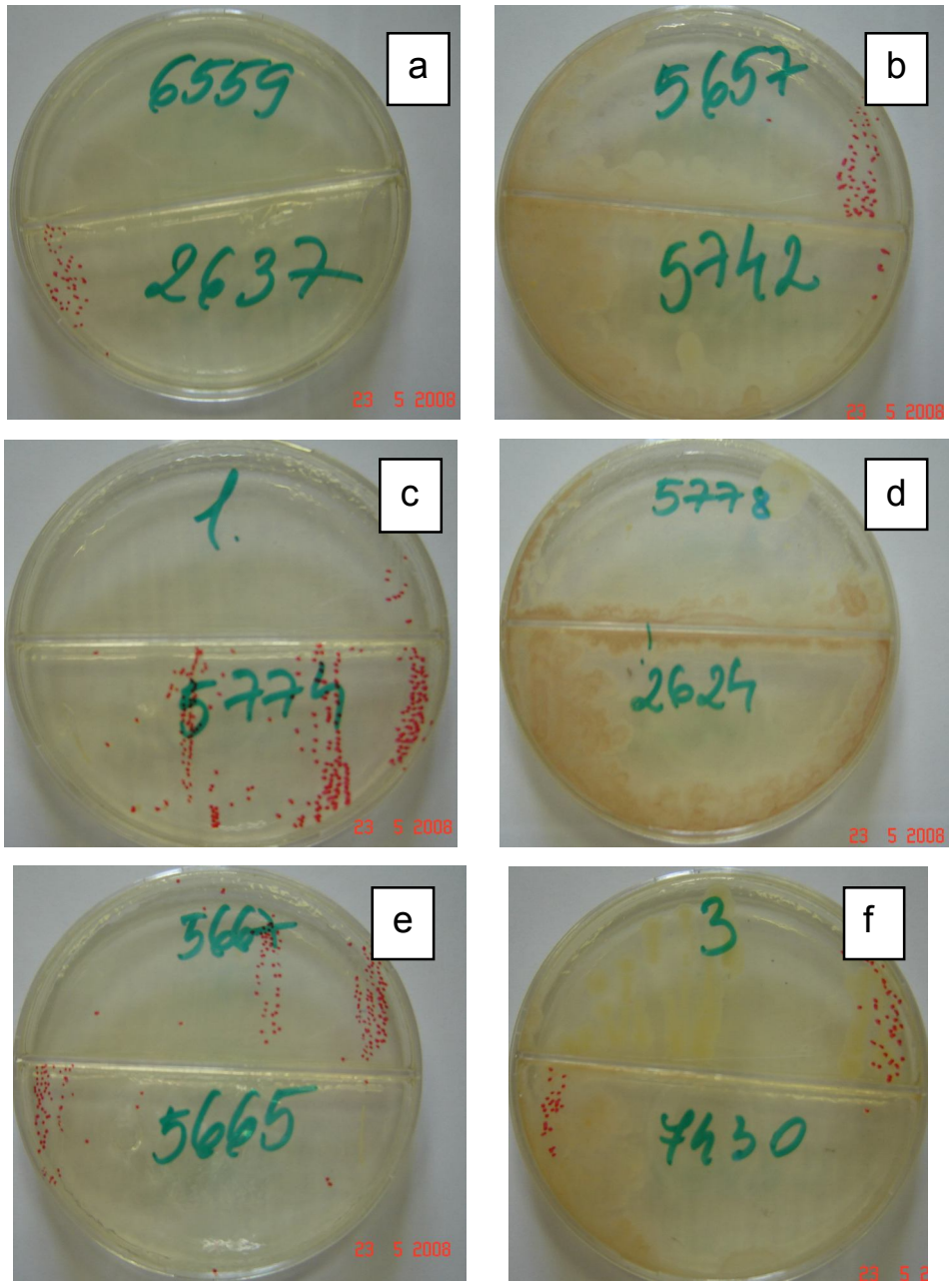


Figura 4.2.10 Aspectul probelor de lapte de bivoliţă după însămânţare

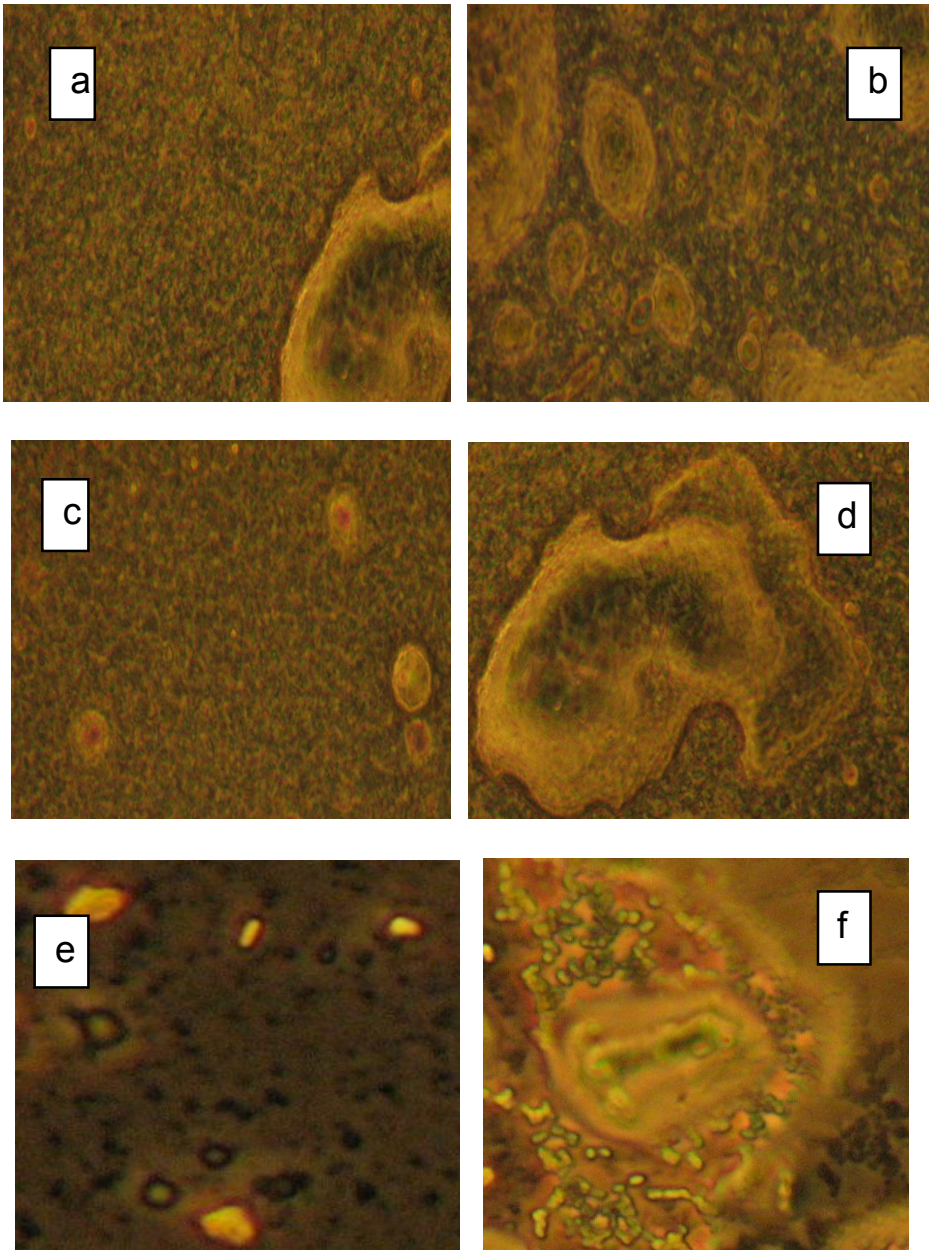


Figura 4.2.11
a, b, c, d - Evidenţierea microbiotei din laptele de bivoliţă

BIBLIOGRAFIE

1. Apostu, S., Mihaela Anca Rotar, 2000, Microbiologia produselor agro-alimentare, *Ed. Risoprint, Cluj-Napoca*.

2. Apostu, S., Mihaela Anca Rotar, 2003, Lucrări practice de Microbiologie alimentară, *Ed. Risoprint, Cluj-Napoca*.

3. Apostu, S., V. Stănescu, F. Chirilă, Mihaela Anca Rotar, 2000, Evidenţierea toxinelor de *Escherichia coli* prin tehnici "in vitro", *al VIII-lea Congres de Medicină Veterinară, Băile Felix*, 431-432.

4. Arţan, C.N., 2007, Analiza riscurilor şi controlul punctelor critice în producerea şi procesarea laptelui, *Teză de doctorat, Bucureşti*.

5. Aurelia Pece, C. Coroian, Sanda Andrei, Adela Pintea, G. Muresan (2008). Evidence of a vitamin and total proteins from buffalo milk using high performance liquid cromatography. *European Society for new Methods in Agricultural Research the XXXVIIIth Annual ESNA Meeting,* Krakovia, Polonia.

6. Banu, C., Camelia Vizireanu, 1998, Procesarea industrială a laptelui, *Ed. Tehnică, Bucureşti*.

7. Banu, C., şi col., 2000, Biotehnologii în industria alimentară, *Ed. Tehnică, Bucureşti*.

8. Banu, C., şi col.,1999, Manualul inginerului din industria alimentară, Vol. II, *Ed. Tehnică, Bucureşti*.

9. Baumberg, S., M.J. Carlile, J.F. Collins, and B.E.B. Moseley, 1981, The evolution of metabolic regulation. In: Molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution, *Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge*, 229-272.

10. Bărzoi, D., 1985, Microbiologia produselor alimentare de origine animală, *Ed. Ceres Bucureşti*.

11. Bărzoi, D., S. Apostu, 2002, Microbiologia produselor alimentare, *Ed. Risoprint, Cluj-Napoca.*

12. Bărzoi, D., S. Meica, M. Neguţ, 1999, Toxiinfecţii alimentare. *Ed. Diacon Coresi.*.

13. Bărzoi, D., Sanda Lăzărescu, Natalia Maier, Lidia Tuluş, R. Korn, Olga Nucă, Florina Dumitrescu, 1997, Metode microbiologice pentru examenul de laborator al produselor alimentare de origine animală *M.A.A.*

14. Bei-Zhong, H., Y.Meag, L.Min, X. Ying-Yang, F. Zheng, Z.K.Qing, M.J.R. Nout, 2007, A survey on the microbiological and chemical composition of of buffalo milk in China. *Science Direct, Food Control*, 18, 742-746.

15. Bud, I., 1983, Contribuţii la caracterizarea morfoproductivă a bubalinelor din nord-vestul Transilvaniei, *Teză de doctorat, Cluj-Napoca*.

16. Bud, I., 1984, Contribuţii la caracterizarea morfoproductivă a bubalinelor din nord-vestul Transilvaniei, *Rezumat al Tezei de doctorat, tipo „ Agronomia„ Cluj-Napoca*.

17. Bud, I., C. Velea, Gh. Mureşan, N. Marcu, V. David, I. Barabaş, 1983, Consideraţii privind dinamica producţiei de lapte la bubaline şi influenţa sezonului de fătare asupra acesteia, *Simpozionul Naţional, Cluj-Napoca*.

18. Bud, I., C. Velea, N. Marcu, Gh. Mureşan, 1979, Contribuţii la cunoaşterea exteriorului şi producţiei de lapte la bivolul din Transilvania, *Buletin Institutul Agronomic, Cluj-Napoca*, 65-68.

19. C. Heuer, H. J. Luinge, E.T.G. Lutz, Y. H. Schukken, J. H. van der Maas, H. Wilmink, and J.P.T.M. Noordhuizen, 2001, Determination of

Acetone in Cow Milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Detection of Subclinical Ketosis, *J. Dairy Sci.* 84:575-582

20. C. Heuer, H. J. Luinge, E.T.G. Lutz, Y. H. Schukken, J. H. van der Maas, H. Wilmink, and J.P.T.M. Noordhuizen 2001, Determination of Acetone in Cow Milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Detection of Subclinical Ketosis, *J. Dairy Sci.*, 84:575-582.

21. Chindriş, V., 1998, Calităţile igienice ale laptelui de bivoliţă şi implicaţiile acestora asupra produselor lactate, *Teză de doctorat, Cluj-Napoca*.

22. Creţa, V., G. Comănici, 1977, Unele probleme privind creşterea şi exploatarea bubalinelor, *Revista de creşterea animalelor, Bucureşti*, nr. 4.

23. Creţa, V., M. Perhinschi, 1979, Cercetări privind producţia de lapte la bivoliţe, *Lucrări ştiinţifice, Institutul Agronomic, N. Bălcescu (Zootehnie), Bucureşti* 20, 27-30.

24. Elisei, L., 1995, Cercetări privind însuşirile fenotipice ale populaţiei de bubaline din zona Făgăraşului şi posibilităţi de ameliorare, *Teză de doctorat, Cluj-Napoca.*

25. Elisei, L., P. Chichernea, 1991, Buffalo breeding in Brasov District, *Third World Buffalo Congress*, *Sofia*, 2, 432-435.

26. Georgescu, Gh., 1998, Calităţile şi defectele laptelui în concept european, *Revista Agricultorul, Bucureşti.*

27. Georgescu, Gh., 2000, Laptele şi produsele lactate, *Editura Ceres, Bucureşti.*

28. Georgescu, Gh., 2003, Analiza laptelui si a produselor lactate, *Ed. Ceres, Bucuresti.*

29. Georgescu, Gh., 2005, Cartea producătorului şi procesatorului de lapte, *Ed. Ceres, Bucureşti*, vol.4.

30. Gergescu, Gh., 1988, Laptele produs strategic, aliment complet şi de neânlocuit, *Revista crescătorilor de Taurine*, nr. 3.

31. Guzan, Valentina, 1966, Tehnologia laptelui si produselor lactate, *Tipografia centrală Chişinău.*

32. Guzan, Valentina, G. Musteaţă, C. Banu, C. Vizireanu, 2001, Industrializarea laptelui, *Ed. Tehnică Info Chişinău.*

33. Gyles, C.L., 1994, *Escherichia coli* in domestic animals and humans, Departament of Veterinary Microbiology and Immunology, Ontario Veterinary College, *University of Guelph, Canada, CAB International*, 3-22.

34. Hansen, P. W., 1999, Screening of dairy cows for ketosis by use of infrared spectroscopy and multivariate calibration, *J. Dairy Sci.,* 82:2005-2010.

35. Hansen, P.J., 1997, Effects of Environment on Bovine Reproduction, in *Current Therapy in Large animal Theriogenology W.B. Saunders Company*, 1, 478-480.

36. Hansen, P.W., Van Brackel, A.S., Garman, J., Norgaard, L.,1999, J. Dairy Sci. 82 1351-1360. AOAC International, 1995, *Offficial Methods of Anal*ysis, 16th ed. Arlington, VA, sec. 972.16.

37. Iurcă, I.M., 1999, Produse şi subproduse lactate industrializate şi tradiţionale, *Ed. ICPIAF, Cluj-Napoca*.

38. Jensen, K.F. and S. Pedersen, 1990, Metabolic growth rate control in Escherichia coli may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components, *Microbiological Reviews*, 54, 89-100.

39. Jensen, R.G., 2000, Fatty acids in milk and dairy products, in *Fatty Acids in Food and their Health Implications, New York*, 109-123.

40. Jensen, R.G., 2002, The compoyition of Bovine Milk Lipids, *J. Dairy Sci.*, 85, 295-350.

41. Jensen, R.G., R.M. Clark, 1988, Lipid compoyition and properties, *in Fundamentals of Dairy Chemistry, 3rd ed. N. Wong, ed. Van Nostrand Reinhold Company, New York*, 171-213.

42. Kemp, J.D. and D.E. Atkinson, 1966, Nitrite reductase of *Escherichia coli* specific for reduced nicotinamide adenine dinucleotide, *Journal of Bacteriology*, 92, 628-634.

43. Konings, W.N., K.J. Hellingwerf, and G.T. Robillard, 1981, Transport across bacterial membranes, *North Holland,* 257-283.

44. Kornberg, H.L., 1966, The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*,1-11.

45. Kornberg, H.L., 1966, The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*,1-11.

46. Kwi-Hang, N.K., L., Hayas, J. Moxley, H. Monardes, 1986, Relationships between milk protein polimorphism and major milk constituents in Holstein-Friesian cows, *J.Dairy Sci.,* 69: 22-26.

47. Mihaiu, M., 1995, Cercetări privind unii indici de calitate ai laptelui obţinut în unităţi de producţie din Transilvania, *Teză de doctorat, Cluj-Napoca*.

48. Mihaiu, M., M., Romolica, 1998, Laptele si controlul calitatii sale, *Editura Risoprint*, Cluj-Napoca.

49. Mireşan Vioara, Camelia Maria Răducu, Aurelia Pece, 2008, The variability components of the milk collected from different routs located in the country of Cluj, *Jurnal Central European Agriculture, Poland,* 51.

50. Nagatani, H., M. Shimizu, and R.C. Valentine, 1971,The mechanism of ammonia assimilation in nitrogen fixing bacteria, *Archiv für Mikrobiologie*,164-175.

51. Nunn, W.D., 1986, A molecular view of fatty acid catabolism in *Echerichia coli*. *Bacteriological Reviews* 50, 179-192.

52. Pece Aurelia, Adela Pintea, Constantin Bele, Gheorghe Muresan, Cristian Coroian (2008). Determination of vitamin a in buffalo milk using HPLC method, *Croatian symposium on agriculture with international participation*, *Opatija, Croaţia*, 43:763-765.

53. Pece Aurelia, C. Coroian, Ghirilă Bianca, G. Muresan (2008). Study of the physico-chemical and microbiological parameters of cottage cheese obtained from buffalo milk. *Simpozionul ştiinţific internaţional "Performanţe şi Competitivitate în Producţia Animală", Iaşi*.

54. Pece Aurelia, Coroian C., Ghirilă Bianca, Mureşan G. (2008). Study on the separation through thin layer chromatography of the cholesterol in the buffalo milk originating in the mesendorf farm. *Simpozionul ştiinţific internaţional, Lucrări ştiinţifice Zootehnie şi Biotehnologii, Timişoara,* 41(2):236-240.

55. Pece, Aurelia, Cristian, Coroian, Camelia, Răducu, Vioara, Mireşan, Gheorghe, Mureşan, 2008, The study of the main quality parameters of the buffalo milk*, Journal Central European Agriculture, Poland,* 59.

56. Pucheanu, C., 2000, Cercetări privind cunoaşterea unor parametri morfologici, fiziologici şi productivi la bivoliţe, în relaţie cu diferiţi factori de influenţă, *Teză de doctorat, Bucureşti*.

57. Revista Standardizarea, 2006, Aplicarea voluntară a standardelor, treaptă superioară în activitatea unei organizaţii.

58. Rotaru, G., C. Moraru, 1997,H.A.C.C.P., Analiza riscurilor punctele critice de control, *Editura Academică, Galaţi.*

59. Rotaru, O., M. Mihaiu, 2003, Igiena veterinară a produselor alimentare*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca,* Vol. II., 116-117.

60. Switzer, R.L., 1977, The inactivation of microbial enzymes in vivo. *Annual Review of Microbiology*, 31, 135-157.

61. Velea C., 1990*,* Bubalinele in România, prezent si viitor. Simpozionul actualitati si perspective in zootehnie, Buletinul *U.A.S.M.V. Cluj-Napoca,* pag. 345-350.

62. Velea, C, 1992, Program de ameliorare al rasei Romanească de bubaline, *Buletinul U.S.A.C.N.,* pag., 219-224.

63. Velea, C. şi col., 1985, Îndrumător pentru creşterea şi îngrijirea tineretului taurin. *Ed. Ceres, Bucureşti*, 269.

64. Velea, C. şi col., 1998, Proiectul programului naţional de ameliorare a taurinelor. *Simp.Realizări şi perspective în zootehnie şi biotehnologii agricole. USAMV Cluj-Napoca*.

65. Velea, C., 1983, Tehnologia creşterii bovinelor. *Ed.Dacia, Cluj-Napoca*, p. 584.

66. Velea, C., 1994, Principalele însuşiri pentru producţia de lapte şi de carne ale Rasei Românească de buabline, *Buletin ştiinţific, U.S.A.M.V., Cluj-Napoca, 45-50*.

67. Velea, C., 1999-2000, Producţia, reproducţia şi ameliorarea taurinelor. *Ed. Tehnică Agricolă Bucureşti*, vol I , II,III.

68. Velea, C., 2003, Actualitate şi perspectivă în creşterea taurinelor în zona de centru şi nord vest a ţării. *Simp. USAMV Cluj – Napoca*, vol. 58.

69. Velea, C., C. Cristea, V.David, M. Vomir, V. Trânc, M. Papiu, 1990, Principalele însuşiri ale producţiei de lapte la o populaţie valoroasă de

bivoliţe din judeţul Cluj. *Simpozionul Actualităţi şi perspective în Zootehnie, USAMV Cluj-Napoca,* vol. XVI.

70. Velea, C., G. Marginean, 2006, Actualitate si perspectiva in cresterea bubalinelor, *Agrotehnica, Bucuresti*.

71. Velea, C., Gh. Mureşan, I. Bud, N. Marcu, V. David, M. Vomir, M. Corlăţeanu, A, Tăpălagă, 1981, Stadiul şi perspectivele creşterii şi exploatării bubalinelor în Transilvania, *Buletinul A.S.A.S.*

72. Velea, C., I. Bud, A. Tăpălagă, 1983, Creşterea bivolului, *Editura Ceres, Bucureşti*.

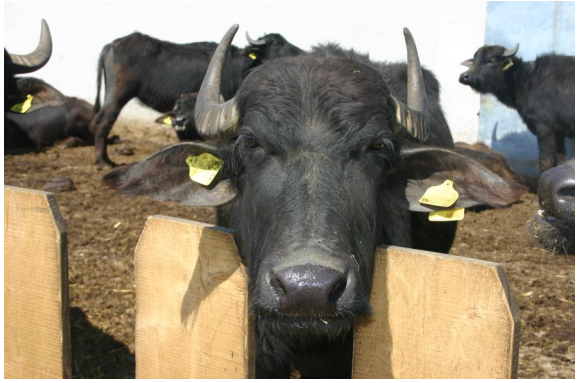
73. Velea, C., I. Bud, M. Corlăţeanu, Mureşan Gh., Marcu N., David V., Vomir M., Tăpălagă A., 1983, Estimarea producţiei de lapte la bubaline prin metoda controlului diversificat, *Buletinul I.A.C.N.,* Cluj-Napoca, 37.

74. Velea, C., I.Bud, M. Corlăţeanu, Gh. Mureşan, N. Marcu, V. David, M.Vomir, 1983, Estimarea producţiei de lapte la bubaline prin metoda controlului diversificat, *Bul. I.A.C.N.*, *Cluj-Napoca,* 37, 178-180.

75. Velea, C., L. Elisei, C. Cristea, V. David, M.Vomir, V., Tranc,1990, Efectul sezonal asupra productiei de lapte la bivolite, *Simpozionul Actualităţi şi perspective în Zootehnie, USAMV Cluj-Napoca*, vol.XVI.

76. Velea, C., Mărgineanu, Gh., 2004, Producţia, reproducţia şi ameliorarea taurinelor. *Ed. Tehnică Agricolă Bucureşti*, vol III.

77. Velea, C., V. David, V. Trânc, M. Vomir, M. Papiu, L. Elisei, G. Onaciu, Mirela Cadar, 1992, Populaţii de bubaline cu însuşiri valoroase pentru producţia de lapte*, Simpozionul USAMV, Cluj-Napoca,* vol. XVIII.

78. Velea, C. şi col., 1998, Program de ameliorare a taurinelor din centrul şi nord-vestul ţării. *Simp. Bazele Ştiinţifice ale dezvoltării producţiilor animale. ASAS Bucureşti*.

ANEXE