
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. XXI, N2, 92

SECTIO EE

2003

Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt
Akademii Rolniczej w Lublinie

MAGDALENA POPIOŁEK-PYRZ

*Przeżywalność mikroflory chorobotwórczej i warunkowo
chorobotwórczej, wyizolowanej z mleka zbiorczego
w różnych temperaturach przechowywania*

Survival Rate of Pathogenic and Conditionally Pathogenic Microflora Isolated
from Collected Milk at Different Storage Temperatures

Stan zdrowia krów dojnych wywiera zasadniczy wpływ na jakość i ilość wyprodukowanego mleka. Wszystkie schorzenia, którym towarzyszy wzrost ciepłoty ciała, wpływają na zmniejszenie ilości uzyskiwanego mleka oraz na pogorszenie jego jakości. Wśród schorzeń bakteryjnych wpływających wyjątkowo niekorzystnie na produkcję mleka należy wymienić schorzenia przewodu pokarmowego, którym towarzyszą objawy silnej biegunki oraz zapalenie gruczołu mlecznego, zwane *mastitis* (5, 7, 8). Problem zdrowotności gruczołów mlecznych istnieje wszędzie tam, gdzie prowadzona jest intensywna gospodarka mleczna i dlatego *mastitis* jest „chorobą zawodową” krów mlecznych (2).

Według Malinowskiego (8) zapalenia gruczołu mlekowego krów stanowią główny kompleks chorobowy, który nie tylko negatywnie wpływa na jakość i cenę żywności pochodzenia zwierzęcego, ale także ogranicza opłacalność hodowli.

Wymię krowy jest bardzo wrażliwe i szczególnie narażone na zakażenia bakteryjne, wywołane najczęściej przez paciorkowce i gronkowce. Drobnoustroje te znajdują się w bezpośrednim otoczeniu zwierzęcia, na jego skórze, powierzchni wymienia, rękach dojarza, sprzęcie dojar skim i ubraniu hodowcy. Do zakażenia dochodzi najczęściej w wyniku nieprzestrzegania higieny doju, niewłaściwego zasuszania krów, nieprawidłowego doju ręcznego i mechanicznego (5). Mikroorganizmy mogą przedostać się do gruczołu z krwiobiegu przez kanał strzykowy bądź uszkodzoną skórę.

Zdaniem Malinowskiego (7) około 80–90% infekcji wymienia powodują bakterie, które można podzielić na dwie grupy. Do pierwszej z nich (*major pathogens*) zaliczane są: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* i *Actinomyces pyogenes*, do drugiej (*minor pathogens*) zaliczane są m.in. gronkowce koagulazo-ujemne i *Corynebacterium bovis*.

Istnieje pewien odsetek krów ze stanami zapalnymi gruczołu mlekowego, u których nie udaje się wykazać czynnika etiologicznego rutynowymi badaniami mikrobiologicznymi. *Mastitis* tego typu klasyfikuje się jako bezbakteryjne podrażnienie lub zapalenie aseptyczne. Przyczyną takich zapaleń mogą być drobnoustroje z rodzaju *Mycoplasma*, bowiem z wydzieliny zapalnej izolowano: *M. bovis*, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. bovirhinis*, *M. arginini*, *M. dispar* oraz *Acholeplasma laidlawii* (1).

Według Krukowskiego (4) i Malinowskiego i wsp. (6) czynnikiem etiologicznym 2–13% zapaleń wymienia są drożdżaki i grzyby (najczęściej z rodzaju *Candida*). Źródłem zakażenia jest stara, wilgotna, zbutwiała i spleśniała ściółka oraz pasza. Najczęściej jednak grzybice pojawiają się po leczeniu *mastitis* antybiotykami. Stosowanie dużych ilości antybiotyków powoduje obniżenie zawartości witaminy A w organizmie i prowadzi do niszczenia pęcherzyków i przewodów mlecznych tkanki gruczołowej wymienia, co w konsekwencji ułatwia inwazję grzybów. Ponadto antybiotyki wyjąławiają gruczoł mlekowy, obniżają jego odporność i stymulują namnażanie się grzybów. Spory mogą być wprowadzane w czasie niehigienicznego aplikowania antybiotyków.

Celem pracy była ocena stopnia zanieczyszczenia mikroflorą chorobotwórczą i warunkowo chorobotwórczą mleka zbiorczego pochodzącego od dostawców indywidualnych oraz ocena przeżywalności wybranych szczepów w różnych temperaturach przechowywania.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło mleko surowe pochodzące od dziesięciu dostawców indywidualnych, podlegających Okręgowej Spółdzielni Mleczarskiej w Krasnymstawie. Badania przeprowadzono w okresie od maja do grudnia 2001 roku. Łącznie oceniono 100 prób mleka. Próby pobierano od poszczególnych rolników bezpośrednio z konwi lub zbiorników na mleko, a następnie posiewano na następujące podłoża: agarowe wzbogacone krwią, Edward's-Chodkowskiego, Saborouda i Mc Conceya (bio-Merieux). Po inkubacji w temperaturze 37°C przez 18–24 godziny wyrosłe kolonie identyfikowano, wykorzystując próbę katalazową, koagulazową i test hemaglutynacji (*Slidex Staph.* kit.). Próbę uznawano za dodatnią, jeżeli wyrosło co najmniej 5 kolonii bakteryjnych lub grzybiczych.

Materiał do dalszych badań stanowiły próby mleka, w których stwierdzono szczepy gronkowców koagulazo-ujemnych, *Staph. aureus*, *Str. agalactiae* oraz *Escherichia coli*. Próby te przecho-

wywano w temperaturach: -20°C , $+1^{\circ}\text{C}$, posiewając co 4 dni, oraz w temperaturze $+20^{\circ}\text{C}$, posiewając co 12 godzin. Za maksymalny czas przechowywania prób mleka w temp. -20°C i $+1^{\circ}\text{C}$ przyjęto 24 dni, zaś w temperaturze pokojowej 72 godziny. Wyrosłe kolonie identyfikowano tak jak podczas izolacji drobnoustrojów.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania nad mikroflorą patogenną w mleku zbiorczym dają możliwość potencjalnej oceny populacji drobnoustrojów odpowiedzialnych za *mastitis*, z drugiej zaś strony uświadamiają zagrożenia dla zdrowia konsumentów. Zdaniem Truszczyńskiego (11) gronkowce są ważną przyczyną wywołującą u ludzi zatrucia pokarmowe po spożyciu zakażonych nimi lodów, kremów, szynki i innych produktów spożywczych. Przyczyną zatrucia jest enterotoksyna, wytwarzana przez pewne szczepy gronkowców. Chorobotwórcza rola paciorkowca bezmleczności polega przede wszystkim na wywoływaniu zapaleń wymienia u bydła, jednakże stwierdzano go w różnych przypadkach chorobowych u człowieka (zakażenie pęłogowe, zapalenie wsierdzia, płuc i opon mózgowych).

Escherichia coli, podobnie jak szereg innych drobnoustrojów, działa chorobotwórczo dzięki swej inwazyjności, jak też zawartym w niej toksynom ciepłostalym (endotoksyna) i ciepłochwiejnym (enterotoksyna). Powodują one zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego i inne objawy zatrucia (11).

Tab. 1. Procentowy udział wyizolowanych szczepów w 100 badanych próbach mleka zbiorczego
Proportion of bacteria strains in 100 examined samples of milk

Gatunek / rodzaj drobnoustroju	Odsetek (%) prób w których wyizolowano dany drobnoustrój
<i>Staphylococcus aureus</i>	38
CNS	88
<i>Streptococcus agalactiae</i>	42
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	19
<i>Streptococcus uberis</i>	32
<i>Escherichia coli</i>	39
<i>Pseudomonas sp.</i>	14
<i>Klebsiella sp.</i>	6
<i>Candida sp.</i>	5

Uzyskane wyniki wskazują na dość liczną i zróżnicowaną pod względem systematycznym mikroflorę chorobotwórczą w mleku zbiorczym (tab. 1). Oceniane próby mleka wykazywały wysoki stopień zanieczyszczenia gronkowcami

koagulazo-ujemnymi (88%). Gronkowiec złocisty izolowany z prób mleka stanowił 38%. W mleku konwiowym znaczący procent osiągały również paciorkowce: *Streptococcus agalactiae* – 42%, *Streptococcus uberis* – 32%, *Streptococcus dysgalactiae* – 19%, zaś *Escherichia coli* – 39%. W badanym mleku stwierdzono także obecność mikroflory z rodzaju: *Enterobacteriaceae* (*Pseudomonas* sp. 14%, *Klebsiella* sp. 6%) oraz drożdżaków (5%). Podobny zestaw patogenów, chociaż różniący się procentowo, izolowano we wcześniejszych badaniach. Popiołek-Pyrz i Majewski (10) wykazali, że obok zróżnicowania w zawartości mikroflory chorobotwórczej w poszczególnych próbach istnieją znaczne różnice w zależności od sezonu pobierania prób. W okresie letnio-jesiennym najwyższy odsetek prób zawiera drożdżaki z rodzaju *Candida* – 33,75%, w okresie zimowym natomiast z 48,75% prób izolowano gronkowce koagulazo-ujemne. Malinowski i wsp. (6) oraz Kurek i Rutkowiak (5) w swoich badaniach stwierdzili, że średnio 80–97% drobnoustrojów wyisobnionych z wydzieliny zapalnej wymion krów stanowiły paciorkowce i gronkowce.

Obecnie obserwuje się zjawisko epizootologiczne polegające na znacznym wzroście liczby przypadków zapaleń gruczołu mlekowego na tle gronkowcowym w porównaniu z poprzednimi latami, kiedy głównym czynnikiem etiologicznym był paciorkowiec bezmleczności. Fakt ten przypisuje się zaawansowanemu procesowi leczenia schorzeń gruczołu mlekowego za pomocą antybiotyków. Terapia zmierzająca do zdecydowanego ograniczenia paciorkowca bezmleczności jako czynnika etiologicznego *mastitis* przyniosła spodziewane efekty, ale równocześnie w sposób gwałtowny wpłynęła na wzrost liczby przypadków zakażeń spowodowanych przez gronkowce, głównie CNS (7). Natomiast badania nad etiologią gronkowcowych stanów zapalnych gruczołu mlekowego krów, przeprowadzone przez Kostrzyńskiego i Kozaneckiego (3), dowodzą, że w oborach, w których *mastitis* na tle *Staphylococcus aureus* stanowi poważny problem (81,4% przypadków), infekcje wymienia powodowane przez gronkowce koagulazo-ujemne występują tylko u nielicznych krów (18,6%).

Na przeżywalność wyizolowanych szczepów drobnoustrojów chorobotwórczych i warunkowo chorobotwórczych mają wpływ różne temperatury przechowywania, co obrazuje tab. 2. Z przeprowadzonych badań wynika, że gronkowiec złocisty charakteryzuje wysoka przeżywalność zarówno w temperaturze -20°C , jak i $+1^{\circ}\text{C}$. Świadczy o tym fakt, że kolonie *Staphylococcus aureus* izolowane były jeszcze po 20 dniach przechowywania prób w tych temperaturach.

Temperatura -20°C stanowiła korzystne warunki termiczne również dla bakterii z gatunku *Streptococcus agalactiae*, które obserwowane były po 24 dniach przechowywania. W tych samych warunkach gronkowce koagulazo-ujemne i pałeczki *Escherichia coli* wykazywały większą wrażliwość, ginąc po 16 dniach przechowywania.

Tab. 2. Przeżywalność mikroflory chorobotwórczej i warunkowo chorobotwórczej
Survival rate of pathogenic and conditionally pathogenic microflora

Drobnoustroj	Temperatura przechowywania	Przeżywalność badanego szczepu bakteryjnego						
		posiew „0”	po 4 dniach	po 8 dniach	po 12 dniach	po 16 dniach	po 20 dniach	po 24 dniach
<i>Staph. aureus</i>	-20°C	+	+	+	+	+	+	-
	+1°C	+	+	+	+	+	+	-
CNS	-20°C	+	+	+	+	-	-	-
	+1°C	+	+	+	+	-	-	-
<i>Str. agalactiae</i>	-20°C	+	+	+	+	+	+	+
	+1°C	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-20°C	+	+	+	+	-	-	-
	+1°C	+	+	+	-	-	-	-
Drobnoustroj	temperatura przechowywania	posiew „0”	po 12 h	po 24 h	po 36 h	po 48 h	po 60 h	po 72 h
<i>Staph. aureus</i>	temperatura pokojowa	+	+	+	+	+	+	+
CNS		+	+	+	+	+	+	+
<i>Str. agalactiae</i>		+	+	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i>		+	+	+	+	+	+	+

Poza *Staphylococcus aureus* wszystkie omawiane szczepy bakteryjne w temperaturze +1°C nie obserwowane były już po 12 dniach, co wskazuje na ich wrażliwość, związaną najprawdopodobniej z większą podatnością na zmiany chemiczne w środowisku bytowania (wzrost pH).

Najmniej sprzyjające warunki do rozwoju badane szczepy *Staphylococcus aureus*, gronkowców koagulazo-ujemnych, *Escherichii coli* i *Streptococcus agalactiae* znajdują w temperaturze pokojowej. W warunkach tych intensywnie namnażają się pałeczki z rodzaju *Lactobacillus*, a zmniejszona przeżywalność bakterii chorobotwórczych i warunkowo chorobotwórczych związana jest ze wzrostem kwasowości mleka. Według Molskiej (9) w czasie przetrzymywania mleka w stanie niesłodzonym gronkowce mogą się namnażać tak długo, aż wzrost kwasowości mleka, powodowany działaniem bakterii kwaszących, zahamuje dalszy ich rozwój. Badania własne wykazały obecność mikroflory patogennej w mleku przechowywanym w temperaturze pokojowej jeszcze po 72 godzinach, pomimo stwierdzonych „gołym okiem” zmian organoleptycznych mleka. Jedynym drobnoustrojem, który zanikł po 60 godzinach, był *Staphylococcus aureus*.

Stosowany powszechnie w dzisiejszej technologii mleczarskiej proces pasteryzacji i UHT zabezpiecza zdrowie konsumentów przed kontaktem z mikroflorą patogenną. Jednakże należy mieć na uwadze, że część mleka w Polsce spożywana jest bezpośrednio przez mieszkańców gospodarstw wiejskich jako mleko niepoddawane obróbce termicznej. Część takiego niepasteryzowanego mleka trafia także na rynek miejski. Mleko niepasteryzowane znajduje więc zbyt, przez co może zaistnieć możliwość narażenia zdrowia konsumentów.

WNIOSKI

1. Drobnoustroje patogenne najczęściej izolowane z badanego mleka zaliczono do gronkowców (gronkowce koagulazo-ujemne – 88%, gronkowiec złoćisty – 38%), paciorkowców – *Streptococcus agalactiae* – 41%, *Streptococcus uberis* – 32%, natomiast pałeczki gram-ujemne w najwyższym odsetku reprezentowane były przez *Escherichię coli* – 39%.

2. Najmniejszy udział procentowy (5%) w zawartości mikroflory chorobotwórczej stanowiły drożdżaki.

3. *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus agalactiae* izolowane z mleka konwiowego charakteryzowały się wysoką przeżywalnością w temperaturze – 20°C, podczas gdy pozostałe (CNS i pałeczki *Escherichia coli*) zanikały w tych samych warunkach po 16 dniach przechowywania.

4. Temperatura pokojowa (ok. 20°C) stanowiła dość korzystne warunki termiczne dla izolowanych drobnoustrojów, gdyż w czasie 72 godzin zachowywały one swoją żywotność, pomimo zmian organoleptycznych zachodzących w mleku.

5. Przeżywalność mikroflory chorobotwórczej i warunkowo chorobotwórczej izolowanej z mleka zbiorczego wskazuje na możliwość narażenia zdrowia konsumenta, spożywającego mleko niepoddane obróbce termicznej (pasteryzacja, UHT).

PIŚMIENNICTWO

1. Bassalik-Chabielska L.: Zmiany w klasyfikacji bakterii izolowanych z gruczołu mlekowego krowy. Med. Wet., 46, 272, 1990.
2. Czupa St.: Mastitis „chorobą zawodową” krów mlecznych. Przegl. Mlecz., 1, 20, 1998.
3. Kostrzyński St., Kozanecki M.: Badania nad etiologią gronkowcowych stanów zapalnych gruczołu mlekowego krów. Med. Wet., 46, 274, 1990.
4. Krukowski H.: Zapalenia wymienia na tle grzybiczym u krów. Med. Wet., 57, 18, 2001.
5. Kurek Cz., Rutkowiak B.: Schorzenia wymienia krów. PWRiL, Warszawa 1997.
6. Malinowski E., Kłossowska A., Krukowski H., Lesiak M., Janiak K.: Zdrowotność wymion krów i czynniki etiologiczne mastitis w gospodarstwach położonych w różnych regionach kraju. Med. Wet., 48, 216, 1992.

7. Malinowski E.: Przyczyny, leczenie i zapobieganie *mastitis* u krów. PI Wet., Puławy, 1997.
8. Malinowski E., Kłossowska A.: Stan zdrowia wymienia krów punktem krytycznym w produkcji mleka. Przegl. Mlecz., 9, 308, 2000.
9. Molska I.: Zarys mikrobiologii mleczarskiej. PWRiL, Warszawa 1998.
10. Popiołek-Pyrz M., Majewski T.: Ocena jakości higienicznej surowego mleka zbiorczego na podstawie obecności mikroflory patogennej. Annales UMCS, sectio DD, vol. 55, 531, 2000.
11. Truszczyński M.: Bakteriologia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa 1969.

SUMMARY

Studies on the pathogenic and conditionally pathogenic microflora in collected milk on the one hand give the chance to evaluate the microorganisms population responsible for mastitis and on the other, they raise the awareness of the health risk for milk consumers.

Microorganisms isolated from the examined milk were classified as Staphylococci (CNS – 88%, *Staph. aureus* – 38%), Streptococci (*Str. agalactiae* – 41%, *Str. uberis* – 32%), while the highest percentage of gram-negative bacteria was represented by *E. coli* – 39%. *Staph. aureus* and *Str. agalactiae* isolated from the collected milk displayed a characteristically high survival rate in the temperature of -20°C , while the remaining bacteria (CNS and *E. coli*) vanished after 16 days of storage in the same conditions. Room temperature (of about 20°C) offered quite good thermal conditions for the isolated strains because they retained vitality despite the organoleptic changes taking place in the milk.

Survival rate of pathogenic and conditionally pathogenic microflora isolated from collected milk indicates the possibility of health risk for consumers of non-pasteurised milk.

zagrożenie dla środowiska, zwłaszcza dla trywasa powietrza i wody i gleby. Źródłem powstawania zanieczyszczeń gospodarki, rolnictwa, odchody – zarówno świeżo wydalone, jak i przetwarzane w biogazowniach, zbiornikach gnojowicowych, pasza oraz urządzenia technologiczne. Zanieczyszczenia powstające zanieczyszczenia woda proporcjonalnie do wielkości produkcji, tym większe ilości zanieczyszczeń trafiających do środowiska (1, 2, 3, 9).

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu warunków przechowywania mleka na życie mikroorganizmów chorobotwórczych i warunkowo chorobotwórczych.

MATERIAL I METODY

Badania przeprowadzono na mleku surowym, które zostało dostarczone z gospodarstwa wiejskiego, w którym prowadzono produkcję mleka. Mleko było przechowywane w temperaturze -20°C oraz w temperaturze pokojowej. W badaniach wykorzystano metodę posiewu na podłożu selektywnym i metodę bezpośredniego posiewu na podłożu selektywnym.