

AGNIESZKA WISZNIEWSKA, JOANNA SZTEYN

BADANIE OPORNOŚCI BAKTERII WYZOŁOWANYCH Z URZĄDZEŃ UDOJOWYCH NA ŚRODKI DEZYNFEKCYJNE

RESISTANCE OF BACTERIA ISOLATED FROM MILKING EQUIPEMENT TO DISINFECTANTS

Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
10-718 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 14
Kierownik: prof. dr hab. *J. Uradziński*

W pracy prześledzono wrażliwość bakterii termo- i psychrofilnych wyizolowanych z urządzeń udojowych w gospodarstwach produkujących mleko na środki dezynfekcyjne. Badania wykazały występowanie szczepów opornych na substancje czynne zawarte w preparatach użytych w doświadczeniu.

Słowa kluczowe: środki dezynfekcyjne, bakterie termofilne, bakterie psychrofilne, wrażliwość bakterii

Key words: disinfectants, thermotrophic bacteria, psychrotrophic bacteria, bacteria sensitivity

WSTĘP

O jakości zdrowotnej żywności, w tym także mleka, decyduje wiele czynników. Jednym z nich jest jakość mikrobiologiczna. Zachowanie reżimu sanitarnego w gospodarstwie produkującym mleko, systematycznie i właściwie przeprowadzany proces mycia i dezynfekcji urządzeń udojowych zabezpiecza wymię krowy przed zakażeniem bakteryjnym, przedłuża sprawność sprzętu mechanicznego oraz ma zasadniczy wpływ na jakość pozyskiwanego surowca. Czynność ta powinna być podstawowym obowiązkiem dojarza. Aby uzyskać optymalny efekt, zabiegi higieniczne powinny być przeprowadzane w odpowiedniej kolejności i z użyciem przeznaczonych do tego celu środków myjąco-dezynfekcyjnych [7, 15]. Wybierając środek odkażający należy zwrócić uwagę na substancję czynną, która powinna eliminować z urządzeń bakterie patogenne, mogące spowodować zagrożenie dla zdrowia ludzi, a także maksymalnie zredukować liczbę drobnoustrojów saprofitycznych tak, aby sprzęt dojący nie stanowił źródła kontaminacji mleka. Nieprawidłowo dobrany lub niewłaściwie stosowany środek może powodować dwojakiego rodzaju zagrożenia: 1) pozostałości substancji chemicznych używanych w gospodarstwie [9, 16] oraz 2) pojawianie się opornych szczepów bakterii, w tym także drobnoustrojów patogennych [6].

Dla przetwórstwa mleka, a zwłaszcza procesów termicznych, które mają gwarantować wyprodukowanie bezpiecznego pod względem mikrobiologicznym wyrobu, istotny jest skład gatunkowy mikroflory mleka. Wymóg chłodzenia mleka i powszechne stosowanie chłodziarek spowodowało zachwianie równowagi między drobnoustrojami termofilnymi a psychrofilnymi obecnymi w mleku surowym, które cechują się różnym wpływem na jakość uzyskiwanego produktu mlecznego.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wrażliwości szczepów bakterii psychrofilnych i termofilnych wyizolowanych z urządzeń udojowych na powszechnie stosowane środki dezynfekcyjne: Chlorinol, Atos i L-Naftol.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań były szczepy bakteryjne wyizolowane z urządzeń udojowych w gospodarstwach indywidualnych. Trzykrotnie w odstępach 1 miesiąca, pobierano wacikami wymazy ze zbiorników na mleko surowe i kubków strzykowych dojarek. Po przewiezieniu do laboratorium waciki umieszczano w płynie do rozcieńczeń (1% woda peptonowa) i starannie wytrząsano. Tak przygotowane próbki posiewano na 2 płytki z podłożem do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów w celu izolacji bakterii termofilnych i psychrofilnych. Inkubację przeprowadzano zgodnie z PN-93 A-86 034/06.

W wyniku przeprowadzonych badań wyizolowano ogółem 68 szczepów bakterii: 49 szczepów psychrofilnych i 19 szczepów termofilnych, które następnie przechowywano na skosach agarowych.

Wyizolowane szczepy bakteryjne poddane zostały następnie badaniu na oporność wobec środków dezynfekcyjnych stosowanych w gospodarstwach produkujących mleko: Chlorinol (Inco-veritas – Polska, substancja czynna – podchloryn sodu, metakrzemian sodu, polifosforan sodu), Atos (Compex – Polska, substancja czynna – podchloryn sodu) oraz L-Naftol (substancja czynna – l-naftol). W tym celu, ze skosu agarowego pobierano eż niewielką ilość materiału i posiewano na bulion odżywczy. Probówkę następnie inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Po inkubacji 0,1 ml hodowli przeniesiono do probówek zawierających po 5 ml przygotowanego roztworu roboczego środka dezynfekcyjnego. Odpowiednie stężenie środka odkażającego uzyskano stosując się do zaleceń producenta. Następnie roztwór rozlewany był z zachowaniem warunków jałowych do probówek (po 5 ml). Roztwory przygotowywane były bezpośrednio przed badaniem. Próbkę kontrolną stanowiła zawiesina hodowli bulionowej badanego szczepu bakterii w 5 ml jałowego roztworu soli fizjologicznej.

Inoculowane próbki z roztworami roboczymi badanych środków dezynfekcyjnych oraz próbki kontrolne inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 20°C przez 20 min, a następnie posiewano 1ml zawiesiny na płytki *Petrie*go metodą zalewową wykorzystując jako podłoże odżywcze agar mleczny. Płytki inkubowano w cieplarni w temperaturze 37°C przez 24 h. Po inkubacji sprawdzano wzrost bakterii na płytce. Badanie wykonano trzykrotnie. Obecność kolonii bakteryjnych na płytkach we wszystkich trzech powtórzeniach badania uznawano za wynik dodatni oporności danego szczepu na badany środek dezynfekcyjny (przy dodatniej próbie kontrolnej), szczepy wykazujące brak wzrostu w jednym bądź dwóch powtórzeniach badania uważane były za wrażliwe.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wyniki badań wykazały, że większość wyizolowanych bakterii psychrofilnych cechowała wrażliwość na badane preparaty dezynfekcyjne (tab. I). Największą skutecznością wykazał się L-Naftol, na który wrażliwych było 94% badanych psychrotrofów. Skuteczność preparatu Atos i Chlorinol to odpowiednio 90% i 84%. Bakterie termofilne charakteryzowały

się większą opornością na badane preparaty (tab. II). W przypadku tych drobnoustrojów najwyższą skutecznością wykazał się Chlorinol- 47% wrażliwych szczepów, następnie L-Naftol – 42% i Atos – 25% wrażliwych szczepów bakterii termofilnych.

Tabela I. Wrażliwość szczepów bakterii psychrofilnych na robocze stężenia środków odkażających
Sensitivity of the psychotropic bacteria on the concentration of disinfectants

Psychrofilne szczepy bakteryjne	Środki dezynfekcyjne					
	Chlorinol		Atos		L-Naftol	
	liczba szczepów	%	liczba szczepów	%	liczba szczepów	%
Wrażliwe – brak wzrostu we wszystkich powtórzeniach	29	59,18	30	61,22	40	81,63
Dające wzrost w 1 lub 2 powtórzeniach	17	34,50	16	32,65	8	16,32
Oporne – wzrost we wszystkich powtórzeniach	3	6,12	3	6,12	1	2,04

Tabela II. Wrażliwość szczepów bakterii termofilnych na robocze stężenia środków odkażających
Sensitivity of the thermotrophic bacteria on the concentration of disinfectants

Termofilne szczepy bakteryjne	Środki dezynfekcyjne					
	Chlorinol		Atos		L-Naftol	
	liczba szczepów	%	liczba szczepów	%	liczba szczepów	%
Wrażliwe – brak wzrostu we wszystkich powtórzeniach	9	47,36	4	21,05	8	42,1
Dające wzrost w 1 lub 2 powtórzeniach	5	26,31	5	26,31	9	47,36
Oporne – wzrost we wszystkich powtórzeniach	5	26,31	10	52,63	2	10,52

Badanie szczepów bakterii psychro- i termofilnych wyizolowanych z powierzchni urządzeń kontaktujących się z surowcem mlecznym w gospodarstwach produkcyjnych wykazały, że znajdują się na nich szczepy bakterii odporne na powszechnie używane środki odkażające. Wyniki korespondują z pracami wykonywanymi przez innych badaczy [1, 3, 8, 12].

Przeżywalność bakterii w procesie mycia i dezynfekcji może być wytłumaczona w różny sposób. Drobnoustroje mogą tworzyć na mytych powierzchniach biofilm, który zabezpiecza część komórek przed dostępem substancji chemicznej [4, 5]. Część drobnoustrojów wykazuje natomiast dziedziczną bądź nabytą oporność na stosowane środki odkażające. Dziedziczna (pierwotna) oporność jest cechą naturalną i charakterystyczną dla większości

szczepów danego gatunku. Jest ona związana z genem chromosomalnym. Oporność nabyta zwykle jest wynikiem mutacji genów na chromosomie lub nabyciem przez wrażliwy wcześniej drobnoustroj genów oporności [14].

W badaniach własnych zauważono różnicę we wrażliwości bakterii psychrofilnych i termofilnych na te same substancje chemiczne. Zaskakujący jest fakt, że o ile bakterie psychrofilne wykazywały zbliżoną wrażliwość zarówno na Chlorinol jak i na Atos (preparaty zawierające tą samą substancję czynną – podchloryn sodu), to bakterie termofilne były znacząco mniej wrażliwe na drugi preparat.

Działanie bakteriobójcze preparatu, przed wprowadzeniem na rynek, określa się na organizmach testowych (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus hirae*), których wrażliwość na substancje czynne najczęściej jest różna od wrażliwości szczepów „dzikich”, występujących w środowisku. Dlatego też, aby zapewnić wysoką jakość mikrobiologiczną surowca, powinny być wykonywane badania określające skuteczność działania środków dezynfekcyjnych w gospodarstwie. Skład flory bakteryjnej i jej wrażliwości na stosowane środki do dezynfekcji urządzeń udojowych może wpłynąć na jakość skupowanego mleka i uzyskiwanych z niego przetworów, tym bardziej, że obecność zarówno jednych jak i drugich szczepów drobnoustrojów niesie za sobą inne zagrożenia dla jakości produktów mlecznych. Głównym efektem obecności w mleku psychrotrofów jest rozkład białek i jęlczenie tłuszczów przez ciepłostale enzymy lipo- i proteolityczne wytwarzane przez te bakterie, co skutkuje obniżeniem jakości produktu i krótszą jego trwałością. Bakterie termofilne poprzez swoją oporność na temperaturę, mogą przetrwać proces pasteryzacji mleka i tym samym wpływać na obniżenie jakości mikrobiologicznej uzyskanego produktu spożywczego [2, 10, 11]. Nie bez znaczenia jest również możliwość uzyskania oporności na stosowane substancje dezynfekcyjne przez drobnoustroje patogenne, takie jak *Listeria monocytogenes* czy *Escherichia coli* [6].

Występowanie szczepów opornych na coraz to nowe środki myjące i dezynfekujące jest wyzwaniem dla producentów i przetwórców żywności na całym świecie

WNIOSKI

1. Zdolność nabywania przez bakterie oporności na środki dezynfekujące zmusza nas do tworzenia coraz to nowych i doskonalszych preparatów, a także do rozważnego ich stosowania. Nieumiejętne stosowanie substancji przeciwbakteryjnych przyspiesza ten proces.

2. Badane grupy drobnoustrojów termofilnych i psychrofilnych cechowały się różną wrażliwością na stosowane w praktyce substancje dezynfekcyjne.

3. Procent szczepów termofilnych wykazujących oporność na stosowane środki dezynfekcyjne był znacznie wyższy (od 43 do 27) niż bakterii psychrofilnych (od 6 do 16).

A. Wiszniewska, J. Szteyn

RESISTANCE OF BACTERIA ISOLATED FROM MILKING EQUIPEMENT TO DISINFECTANTS

Summary

The purpose of the study was a comparison of the sensitivity to three disinfectants of psychotropic and termotropic bacteria isolated from milking equipment. The study shows that psychotropic bacteria was more resistant on disinfectants used in experiments than termotropic. Bacteria's capability to acquire a resistant to disinfectants cause to search the new and more advance substances. Incorrect use of the antibacterial chemicals could accelerate this process.

PISMIENNIC TWO

1. *Bore E., Iangsrud S.*: Characterization of micro-organisms isolated from dairy industry after cleaning and fogging disinfection with alkyl amine and peracetic acid. *J. Appl. Microbiol.* 2005, 98, 96-105.
2. *Burbianka M, Pliszka A., Murzyńska H.*: Mikrobiologia żywności. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1983.
3. *Costa E.O., Gardna C.R., Pires M.F., Coutinho S.D., Castilho W., Teixeira C.M.*: Sourvey of bovine mycotic mastitis in dairy heros In the state of Sao-Paulo, Brazil. *Mycopathologia* 1993, 124, 13-17.
4. *Evans D.J., Allison D.G., Bron M.R.W. and Gilbert P.*: Effect of growth-rate on resistance of Gram-negative biofilms to cetrimide. *J. Antymicrobial Chemotherapy* 1990, 26, 473-478.
5. *Gilbert P., Allison D.G. and McBain A.J.*: Biofilms *in vitro* and *in vivo*: dp singular mechanisms imply cross-resistance? *J. Appl. Microbiol.* 2002, 92, 98S-110S.
6. *Holah J.T., Taylor J.H., Dawson D.J., Hall K.E.*: Biocide use In the ford industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *J. Appl. Microbiol.* 2002, 92 (111S-120S).
7. Kot M. 1999. Konserwacja urządzeń udojowych. *Ogólnopolski Informator Mleczarski* 35, nr 10 (18).
8. *Krakowski H., Tietze M., Majewski T., Różański P.*: Survey of yeast mastitis in dairy heroes of small-type farms in the Lublin Region, Poland. *Mycopathologia* 2001, 150 (5-7).
9. *Mikolajczyk A., Szteyn J.*: Problemy mycia i dezynfekcji urządzeń udojowych. *Przegl. Hod.* 1997, 12 (9-11).
10. *Molska I.*: Zarys mikrobiologii mleczarskiej. Państwowe Wydawnictwa Rolnicze i Leśne. Warszawa 1988.
11. *Müller G.*: Podstawy mikrobiologii żywności. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. Warszawa 1983.
12. *Petersen K.M., Westall S., Jespersen L.*: Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-ripened cheeses. *J. Dairy Science* 2002, 85 (478-486).
13. PN – 93 A – 86 034/06.
14. *Sęktas M.*: Bariery molekularne w wymianie genów pomiędzy bakteriami. *Post. Mikrobiol.* 2004, 43, 4 (345-359).
15. *Twardoń J., Dejneka G.J., Dzieciol M.*: Urządzenia udojowe jako potencjalne źródło zakażeń wymienia. *Życie Wet.* 2001, 76, Nr 9 (480-483).
16. *Wieżorek J., Smoczyński S.*: Częstość występowania substancji hamujących w mleku z rejonu Olsztyna oraz czułość testów mikrobiologicznych na obecność detergentów. *Medycyna Wet.* 1992, 48 (129-131).

Otrzymano: 2005.07.04