

Mleko odpadowe

– zagrożenia związane z wykorzystaniem w gospodarstwie

Hanna Markiewicz¹, Wiesław Krumrych², Ryszard Gouda²

z Laboratorium Badania Mleka¹ oraz Zakładu Immunobiologii² Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

Waste milk – hazards associated with its use on a farm

Markiewicz H.¹, Krumrych W.², Gouda R.², Milk Testing Laboratory¹,
Department of Immunobiology², Kazimierz Wielki University, Bydgoszcz

This article aims at the presentation of important consequences that result from the use of waste milk on a farm. It may have economic justification, however it brings numerous threats that should be taken into account in the balance of profits and losses. Low concentrations of antibiotics present in the milk in withdrawal period may lead to the resistant strains selection and the induction of mobile genetic elements transfer. Sub-MIC concentrations can also cause an increase in the mutagenesis of bacteria, which may be one of the mechanisms conditioning the emergence of drug resistance. They can also induce changes in the morphology and physiology of bacterial cells, which makes their proper identification and diagnosis difficult.

Keywords: waste milk, bacterial antibiotic resistance, diagnostic procedures.

Mleko odpadowe, czyli mleko niedopuszczone do Msprzedaży, to zarówno mleko cechujące się obecnością pozostałości antybiotyków, jak i mleko tzw. mastytowe z wysoką liczbą komórek somatycznych oraz bakterii, a także siara i mleko przejściowe. Wykorzystanie takiego mleka jako zamiennika preparatów mlekozastępczych jest powszechne w odchowcie cieląt. Czas karmienia cieląt mlekiem trwa zwykle około 8 tygodni i jest to okres, w którym odnotowuje się największą zachorowalność i śmiertelność tych zwierząt. Ryzyko związane z wykorzystaniem mleka odpadowego dotyczy ewentualnej obecności bakterii chorobotwórczych i/lub ich toksyn, mogących być przyczyną biegunk, oraz obecności pozostałości antybiotyków, które mogą przyczyniać się do wyselekcjonowania szczepów opornych w mikrobiomie jelit.

Okres karencji jest to niezbędny czas, w którym stężenie antybiotyku ulega obniżeniu <MRL (maximum residue limit – najwyższe dopuszczalne stężenie pozostałości). Po zakończeniu okresu karencji pozostałości leków antybiotycznych mogą jednak pozostać w stężeniach subinhibicyjnych, które wpływają na fizjologię bakterii. Przykładowo, MRL dla penicyliny (penicylina G, amoksycylina, ampicylina) wynosi 4 µg/kg⁻¹, podczas gdy stężenie 2 µg/kg⁻¹ hamuje wzrost *Bacillus stearothermophilus*, który jest drobnoustrojem testowym (1).

Wykazano, że obecność antybiotyków w mleku w stężeniach niższych niż minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii (MIC) może prowadzić do selekcji szczepów opornych. Uważa się, że stężenia subinhibicyjne w organizmie mogą być konsekwencją niewłaściwego stosowania, lub też stosowania antybiotyków

tkankowo swoistych, które w innych tkankach i organach nie osiągają MIC. Pojenie cieląt mlekiem zawierającym pozostałości antybiotyków sprzyja selekcji szczepów opornych nie tylko w środowisku mikrobiomu jelitowego, ale również w drogach oddechowych, poprzez kontakt mleka ze śluzawicą. Wchłanianie antybiotyków w jelitach przyczynia się też do selekcji szczepów opornych w innych częściach ciała (2).

Cielęta pojone mlekiem zawierającym pozostałości antybiotyków (ampicylina, penicylina G, ceftiofur, oksytetracyklina) miały w kale istotnie więcej bakterii *E. coli* opornych na ampicylinę, ceftiofur, cefoksitin, streptomycynę i tetracykliny. Szczepy wrażliwe cechowały się natomiast zahamowaniem wzrostu nawet w przypadku ekspozycji na subinhibicyjne stężenia antybiotyków. Stężenie to nazywane jest minimalnym stężeniem selekcyjnym – MSC (3). Stężenia podprogowe antybiotyków z jednej strony silnie wpływają na selekcjonowanie szczepów opornych, z drugiej zaś przyczyniają się do powstawania bakterii zmienionych morfologicznie. Ponadto środowisko takie sprzyja transferowi mobilnych elementów genetycznych na drodze horizontalnego transferu genów, co prowadzi do rozpowszechnienia genów oporności nawet pomiędzy bakteriami odległymi filogenetycznie.

Mleko karencyjne wykorzystywane do pojenia cieląt nie jest jednak jedyną przyczyną selekcji szczepów niewrażliwych na działanie antybiotyków. Wykazano bowiem liczną obecność opornych szczepów *E. coli* w mikrobiomie jelit cieląt, które nigdy nie otrzymywały leków przeciwbakteryjnych (4). Również brak wrażliwości pałeczek *E. coli*, izolowanych z kału, na sulfonamidy, tetracykliny i aminoglikozydy był powszechny u cieląt, niezależnie od rodzaju pokarmu. Podobnie oporność na erytromycynę (98,9%), penicylinę G (100%) i pirlimycynę (99,4%) nie zależała od specyfiki mleka wykorzystywanego do pojenia. Brak podatności na różne klasy antybiotyków izolowanych szczepów sugeruje nabycie genów oporności poprzez wymianę materiału genetycznego. Fenotypowa oporność na tetracykliny wskazuje z dużym prawdopodobieństwem brak wrażliwości na streptomycynę (5). Wydaje się, że ograniczenie wykorzystywania mleka od krów leczonych w okresie laktacji powinno zmniejszyć częstotliwość występowania opornych szczepów *E. coli* u cieląt. W celu zmniejszenia ekspozycji cieląt na pozostałości antybiotyków nie zaleca się też wykorzystywania mleka pozyskanego w pierwszym dniu po leczeniu, lub przynajmniej z pierwszego doju po zakończeniu leczenia (6, 7).

Mleko karencyjne może zawierać, oprócz pozostałości antybiotyków, również bakterie wielolekooporne, które rozprzestrzeniają się u cieląt. (8). Ekspozycja

na różne klasy antybiotyków w tym samym czasie jest czynnikiem sprzyjającym selekcji takich szczepów. Wykorzystywanie mleka, zarówno od krów poddanych antybiotykoterapii w okresie laktacji (głównie leczenie *mastitis*), jak i od krów, które wchodząc w zasuszenie, otrzymywały preparaty DC do każdej ćwiartki, kiedy karencją objęte jest mleko z kilku udojów po wycieleniu, wiąże się też z możliwością zakażenia cieląt przez patogeny niepoddające się leczeniu. W gospodarstwach, w których stosowana jest tzw. kompletna terapia w zasuszeniu, nie ma siary bez pozostałości antybiotyków. W badaniach przeprowadzonych w Holandii wykazano, że w 67% próbek siary stężenie antybiotyków nie przekraczało MRL, 29% przekraczało MRL dla ampicyliny, a 1% dla penicyliny (9). Na ilość antybiotyku obecnego w siarze (pierwszy dój po wycieleniu) i w tzw. mleku przejściowym (1–4 dzień *post partum*) ma wpływ długość okresu zasuszenia. W przypadku wcześniejszego wycielenia okres karencji powinien zostać wydłużony o czas między rzeczywistym a przewidywanym wycieleniem. Ryzyko selekcji szczepów opornych może wzrastać, kiedy stężenie antybiotyku w mleku jest wyższe niż w przypadku wycielenia w terminie.

Wykazano, że wykorzystywanie siary od krów, u których do profilaktyki i terapii w zasuszeniu stosowano penicylinę i aminoglikozydy, nie wpływało na wzrost wydalania z kałem opornych szczepów *E. coli* (6). Z kolei u cieląt pojonnych mlekiem odpadowym zawierającym pozostałości cefalosporyn, pasteryzowanym lub niepasteryzowanym, stwierdzono wyższą prewalencję opornych szczepów *E. coli* w porównaniu z cielętami pojonymi mlekiem zbiorczym. Nie wykazano natomiast różnic w oporności pomiędzy szczepami *Enterococcus* spp. (10). Przyczyną braku różnic może być oporność naturalna tych patogenów lub podwyższona ekspresja naturalnych genów oporności na skutek presji antybiotykowej.

Pojenie cieląt mlekiem zawierającym pozostałości antybiotyków wpływa na wzrost ilości opornych szczepów *E. coli* wydalanych z kałem zwierząt w wieku 2–3 tygodni. W wieku 7 tyg. obserwowano natomiast zmniejszenie ilości takich szczepów w kale, a w wieku 12 tyg. (6 tyg. po zaprzestaniu podawania mleka) widoczny był dalszy spadek ilości szczepów opornych. Nie wykazano również różnic co do składu mikroflory jelit między cielętami pojonymi mlekiem karencyjnym a pojonymi mlekiem niezawierającym pozostałości antybiotyków (10, 11). Dane te pokazują, że presja selekcyjna wywierana przez pozostałości antybiotyków nie jest jedynym czynnikiem wpływającym na skład mikroflory jelit.

Stężenia podprogowe antybiotyków beta-laktamowych, najczęściej stosowanych w leczeniu *mastitis*, powodują zaburzenia w procesie syntezy składników ściany komórkowej, czego konsekwencją mogą być zmiany morfologii bakterii, co z kolei może znacznie utrudniać ich identyfikację. Zmiany dotyczą również fizjologii komórek bakteryjnych. Nowe fenotypy patogenów wydają się mieć charakter adaptacyjny (12).

Subterapeutyczne stężenia antybiotyków, będące też związkami sygnałowymi, mogą również powodować nadekspresję genów kodujących czynniki wirulencji określonych patogenów, co skutkuje wzmożoną

zjadliwością bakterii (13). Skutkiem oddziaływania antybiotyków w stężeniach subinhibicyjnych na patogeny jest nie tylko selekcja szczepów opornych, ale również indukcja transferu mobilnych elementów genetycznych. Stężenia sub-MIC powodują też wzrost mutageny bakterii, co może być jednym z mechanizmów warunkujących powstanie lekooporności (14).

Oporność patogenów na antybiotyki beta-laktamowe powodowana jest przede wszystkim przez nabycie genów oporności za pośrednictwem plazmidów, na drodze horyzontalnego transferu genów. Geny warunkujące oporność na tetracykliny umiejscowione są również na mobilnych elementach genetycznych (transpozony z rodziny Tn 916 – Tn 1545). Horyzontalny transfer genów odbywa się także pomiędzy bakteriami środowiskowymi i komensalnymi (15).

Lekooporność bakterii rozpatrywana jest głównie w kontekście klinicznych konsekwencji tego zjawiska. Oporne szczepy *E. coli* izolowane z kału mogą być źródłem genów oporności dla innych bakterii znajdujących się w otoczeniu. Pozostałości antybiotyków wydalane z odchodami i wydzielinami, jak też szczepy oporne wydalane z kałem trafiają razem z obornikiem do środowiska w celu użyznienia gleby, co niewątpliwie przekłada się na rozprzestrzenianie się opornych bakterii oraz genów oporności (16).

Subterapeutyczne stężenia antybiotyków mogą być również przyczyną stresu w komórkach bakteryjnych, w wyniku którego indukowany jest regulon odpowiedzi SOS. Odpowiedź tego typu ma miejsce, gdy dochodzi do rozległego uszkodzenia DNA mikroorganizmu. W wyniku odpowiedzi SOS dochodzi do spontanicznych mutacji, które mogą zostać utrwalone w populacji bakterii. Odpowiedź SOS bakterii jest też indukowana przez letalne stężenia antybiotyków. Stężenia te cechują się silną presją selekcyjną, czego konsekwencją jest śmierć komórki lub nabycie mutacji pozwalającej jej przeżyć (17).

Do pojenia cieląt wykorzystywane jest także mleko cechujące się wysoką liczbą komórek somatycznych oraz zmianami (np. obecność strzępków, kłaczków). Mleko takie może być źródłem zakażenia cieląt i przyczyną biegunek. Zwraca się uwagę, że również pojenie cieląt siarą niepasteryzowaną może wiązać się z większym prawdopodobieństwem występowania biegunek, gdy nieznaną jest jakość mikrobiologiczna siary, która może być potencjalnym źródłem patogenów.

Mlekiem tzw. mastitowym nie powinny być karmione szczególnie cielęta w pierwszej dobie życia, ze względu na brak szczelności jelit i możliwość zakażenia patogenami znajdującymi się w mleku.

Pasteryzacja mleka w temp. 60°C przez 2 godz. pozwala na zabicie wszystkich lub prawie wszystkich bakterii, łącznie ze szczepami ESBL – *E. coli* (ESBL – beta-laktamazy cechujące się rozszerzonym spektrum substratowym) (18). Wykazano, że pasteryzacja siary w temp. 60°C przez 120 min nie miała wpływu na zawartość w niej IgG (19). Również pasteryzacja przez 60 min w temp. 60°C pozwala wyeliminować patogeny chorobotwórcze i utrzymać odpowiednią ilość przeciwciał. Zaleca się okresową kontrolę procesu pasteryzacji. Po prawidłowym jej przeprowadzeniu całkowita liczba bakterii powinna wynosić <20 000 CFU/ml. Wykazano, że pasteryzacja przeprowadzona w optymalnych

warunkach czasu i temperatury pozwala zmniejszyć liczbę bakterii w mleku o 98–99%, co jest szczególnie istotne w przypadku takich patogenów jak *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Salmonella* spp., *Mycoplasma* spp., *Listeria monocytogenes*, *Camphylobacter* spp., *Mycobacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pasteurella* spp., wirus wirusowej biegunki bydła (BVD) oraz wirus białaczki bydła (BLV; 20).

Alternatywną, bardziej ekonomiczną od pasteryzacji metodą może być termizacja. Polega ona na podgrzaniu mleka do temp. 57–68°C przez 15–30 sekund. W przypadku gronkowców koagulazo-ujemnych (CNS) wzrost temperatury mleka do 60°C przez 30 s redukuje liczbę CFU (jednostek tworzących kolonie) o 3,3 cykle logarytmiczne. Proces ten powodował inaktywację *Staph. aureus* w 78% próbek, a w 22% próbek liczba CFU była zredukowana o 1 log w porównaniu z próbkami niepoddanyymi termizacji. Termizacja mleka pochodzącego od krów ze *S. aureus mastitis* przez 1 min w temp. 60°C zmniejsza ryzyko zachorowania cieląt. Należy jednak zaznaczyć, że metoda ta jest nieskuteczna w przypadku obecności *Mycobacterium paratuberculosis* i *Mycoplasma* spp. (21).

W praktyce wykorzystywana jest także metoda acydyfikacji, polegająca na zakwaszaniu mleka odpadowego. Wykazano, że dodanie do litra mleka 30 ml 85% roztworu wodnego kwasu mrówkowego było porównywalne z pasteryzacją w prewencji biegunek u cieląt (22). Wymagane pH mleka dla zahamowania wzrostu drobnoustrojów to 4–4,5. Zakwaszenie takie można osiągnąć, dodając 30 ml 9,8% kwasu mrówkowego do 1 l mleka lub 40–45 ml tego kwasu do 1 litra siary. W celu obniżenia pH mleka stosowany jest też kwas cytrynowy. Należy przy tym podkreślić, że zakwaszenie pozwala na magazynowanie mleka w temperaturze otoczenia (23).

Pasteryzacja i termizacja nie eliminują jednak pozostałości leków antybiotycznych obecnych w mleku. Antybiotyki cechują się bowiem różną termostabilnością. Wykazano, że ogrzewanie mleka zawierającego pozostałości antybiotyków przez 20 min w temperaturze 120°C powoduje degradację 47% obecnej amoksycyliny, 84% ampicyliny, 53% kloksacyliny i 61% penicyliny (24). Największą termowrażliwością cechują się antybiotyki beta-laktamowe, mniej podatne na działanie temperatury są odpowiednio tetracyklina, kolistyna, linkomycyna, sulfonamidy (25). Antybiotyki beta-laktamowe w mleku są skutecznie degradowane przez inkubację z odpowiednimi do stosowanego antybiotyku beta-laktamazami – penicylinazą lub cefalosporynazą (26, 18).

Konsekwencją wykorzystywania mleka odpadowego jest jednak nie tylko możliwość selekcji szczepów opornych, czy też zakażenia cieląt przez patogeny obecne w mleku. Karmienie mlekiem odpadowym skutkuje bowiem także wyższą ekspresją genów związanych z występowaniem zaburzeń metabolicznych w późniejszym wieku (23).

Pojenie mlekiem odpadowym cieliczek wiąże się z kolei ze wzrostem ryzyka wystąpienia u nich *mastitis*, kiedy będą jałówkami. Obsysanie, wylizywanie się nawzajem przez cielęta karmione mlekiem tzw. *mastitowym* może prowadzić do zasiedlenia skóry strzyków

i wymienia przez patogeny chorobotwórcze, takie jak *Streptococcus agalactiae* i *Staphylococcus aureus* obecne w mleku. Patogeny te mogą przetrwać aż do pierwszego wycielenia i być przyczyną *mastitis* u jałówek lub pierwiastek w okresie okołoporodowym.

Niskie stężenia antybiotyków obecne w mleku karencyjnym, oprócz presji selekcyjnej patogenów, mogą też indukować zmiany w morfologii i fizjologii komórek bakteryjnych, co utrudnia ich diagnostykę.

Wykorzystywanie mleka odpadowego w gospodarstwie może mieć uzasadnienie ekonomiczne, niesie jednak za sobą liczne zagrożenia, które powinny być brane pod uwagę w bilansie zysków i strat. Biorąc pod uwagę fakt, że pozostałości penicyliny i aminoglikozydów w sianie nie wpływają na zmianę mikroflory jelit cieląt, wydaje się, że w profilaktyce i terapii w zaszuszeniu preferowane powinny być właśnie te antybiotyki.

Piśmiennictwo

- Pikkemaat M.G., Yassin H., van der Fels-Klerx H.J., Berendsen B.J.: Antibiotic residues and resistance in the environment. RIKILT Wageningen UR (University & Research centre), RIKILT report 2016.009.
- Maynou G., Bach A., Terre M.: Feeding of waste milk to Holstein calves affects antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Pasteurella multocida* isolated from fecal and nasal swabs. *J. Dairy Sci.* 2017, **100**, 2682–2694.
- Pereira R., Siler J., Bicalho R., Warnick L.: In vivo selection of resistant *e. coli* after ingestion of milk with added drug residues. *PLoS One* 2014, **9**, e115223. doi: 10.1371/journal.pone.0115223.
- de Verdier K., Nyman A., Greko Ch., Bengtsson B.: Antimicrobial resistance and virulence factors in *Escherichia coli* from Swedish dairy calves. *Acta Vet. Scand.* 2012, **54**, doi.org/10.1186/1751-0147-54-2.
- Maynou G., Migura-Garcia L., Chester-Jones H., Ziegler D., Bach A., Terre M.: Effects of feeding pasteurized waste milk to dairy calves on phenotypes and genotypes of antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates before and after weaning. *J. Dairy Sci.* 2017, **100**, 7967–7979.
- Duse A., Persson Waller K., Emanuelson U., Ericsson Unnerstad H., Persson Y., Bengtsson B.: Risk factors for antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* from preweaned dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2015, **98**, 500–516.
- Duse A., Persson Waller K., Emanuelson U., Ericsson Unnerstad H., Persson Y., Bengtsson B.: Farming practices in Sweden related to feeding milk and colostrum from cows treated with antimicrobials to dairy calves. *Acta Vet. Scand.* 2013, **55**, 49–58.
- Brunton L., Duncan D., Coldham N., Snow L., Jones J.: A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *Vet. Rec.* 2012, **171**, 296–301.
- Gonggrijp M., Scherpenzeel C., Kappert C., Heuvelink A., Holstege M., Nijenhuis E., Tijs S., Keurentjes J., Lam T., Velthuis A.: *Resistentieontwikkeling bij jonge kalveren* (in Dutch). Report 2015. Research number OND1358612.
- Aust V., Knappstein K., Kunz H.J., Kaspar H., Wallmann J., Kasse M.: Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 2013, **97**, 1091–1093.
- Brunton L., Reeves H., Snow L., Jones J.: A longitudinal field trial assessing the impact of feeding waste milk containing antibiotic residues on the prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* in calves. *Prevent. Vet. Med.* 2014, **117**, 403–412.
- Wojnicz D.: Wpływ stężeń podprogowych antybiotyków na zdolności adhezyjne bakterii. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2007, **16**, 141–148.
- Kaplan J.B., Izano E.A., Gopal P., Karwacki M.T., Kim S., Bose J.L., Bayles K.W., Horswill A.R.: Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *mBio* 2012, **3**, e00198–e00212.
- Kohanski M., Dwyer D., Hayete B., Lawrence C., Collins J.: A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 2007, **130**, 797–810.
- Marshall B., Ochieng D., Levy S.: Commensals: under-appreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe* 2009, **4**, 231–238.
- Garder J.L., Mooman T.B., Soupir M.L.: Transport and persistence of tylosin-resistant enterococci, genes, and tylosin in soil and drainage water from fields receiving swine manure. *J. Environ. Qual.* 2014, **43**, 1484–1493.

17. Long J., Renzette N., Centore R., Sandler S.: Differential requirements of two recA mutants for constitutive SOS expression in Escherichia coli K-12. *PLoS One* 2008, **3**, e4100.
18. Horton R., Randall L., Bailey-Horne V., Heinrich K., Sharman M., Brunton L., La Ragione R., Jones J.: Degradation of cefquinome in spiked milk as a model for bioremediation of dairy farm waste milk containing cephalosporin residues. *J. Applied Microbiol.* 2015, **118**, 901–910.
19. McMartin S., Godden S., Metzger L., Feirtag J., Bey R., Stabel J., Goyal S., Fetrow J., Wells S., Chester-Jones H.: Heat treatment of bovine colostrum. I: effects of temperature on viscosity and immunoglobulin G level. *J. Dairy Sci.* 2006, **89**, 2110–2118.
20. BAMN (Bovine Alliance on Management and Nutrition). Feeding pasteurized milk to dairy calves. 2008, https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/bamn/BAMN08_FeedPastMilk.
21. Abb-Schwedler K., Maeschli A., Boss R., Graber H., Adrian Steiner A., Klocke P.: Feeding mastitis milk to organic dairy calves: effect on health and performance during suckling and on udder health at first calving. *BMC Vet. Res.* 2014, **10**, 267–278.
22. Zou Y., Wang Y., Deng Y., Cao Z., Shengli Li S., Wang J.: Effects of feeding untreated, pasteurized and acidified waste milk and bunk tank milk on the performance, serum metabolic profiles, immunity, and intestinal development in Holstein calves. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2017, **8**, 53.
23. Deng Y.F., Wang Y.J., Zou Y., Azarfar A., Wei X.L., Ji S.K., Zhang J., Wu Z.H., Wang S.X., Dong S.Z., Xu Y., Shao D.F., Xiao J.X., Yang K.L., Cao Z.J., Li S.L.: Influence of dairy by-product waste milk on the microbiomes of different gastrointestinal tract components in pre-weaned dairy calves. *Scientific Reports*, **7**, 42689, DOI: 10.1038/srep42689.
24. Roca M., Villegas L., Kortabitarte M.L., Althaus R.L., Molina M.P.: Effect of heat treatments on stability of beta-lactams in milk. *J. Dairy Sci.* 2011, **94**, 1155–1164.
25. Roca M., Althaus R., Molina M.: Thermodynamic analysis of the thermal stability of sulphonamides in milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry detection. *Food Chem.* 2013, **136**, 376–383.
26. Korycka-Dahl M., Richardson T., Bradley R.: Use of microbial beta-lactamase to destroy penicillin added to milk. *J. Dairy Sci.* 1985, **68**, 1910–1916.