

ELŻBIETA ROSIAK, MATEUSZ GEMBA, ALEKSANDRA WESOŁOWSKA

WPLYW PROCESU ZAMRAŻANIA I ROZMRAŻANIA NA BEZPIECZEŃSTWO MIKROBIOLOGICZNE MLEKA KOBIECEGO

Streszczenie

Mleko kobiece uznawane jest za „złoty standard” żywienia dla noworodków ze względu na unikatowe właściwości odżywcze i immunologiczne oraz źródło mikroflory stanowiącej podstawę do kształtowania mikrobiomu człowieka. Działalność Banków Mleka przyczynia się do racjonalizacji dostępności mleka kobiecego. Metodą utrwalania mleka w celu jego przechowywania jest zamrażanie. W pracy podjęto próbę oceny jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego nieutrwalonego oraz mleka poddanego zamrażaniu i rozmrażaniu z zastosowaniem metody w nawiewie powietrza o temp. 37 °C. Analizy wykonano w kierunku: ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych (OLD), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w przypadku ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych 30 % próbek mleka kobiecego przed zamrożeniem przekraczało maksymalną akceptowaną liczbę drobnoustrojów, natomiast w przypadku mleka rozmrożonego było to 5 % prób. Liczba *Staphylococcus aureus* została przekroczona w 10 % próbek mleka przed zamrożeniem i w 5 % próbek mleka rozmrożonego. Stwierdzono, że proces zamrażania i prawidłowo przeprowadzony proces rozmrażania mogą stanowić istotny element kształtowania jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego. W próbkach mleka kobiecego poddanych analizie nie wykryto bakterii patogennych: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Cronobacter sakazakii*. Bakterie *E. coli* również były nieobecne, co świadczy o dobrym stanie higieny i przestrzeganiu instrukcji higieny postępowania z mlekiem.

Słowa kluczowe: mleko kobiece, utrwalanie żywności, jakość mikrobiologiczna, zamrażanie, rozmrażanie

Wprowadzenie

Mleko kobiece zawiera niezbędne dla organizmu noworodka składniki odżywcze oraz czynniki przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe. Ponadto drobnoustroje występu-

Dr inż. E. Rosiak, mgr inż. M. Gemba, Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności, Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa, dr hab. n. o zdr. A. Wesółowska, Uniwersytecka Pracownia Badań nad Mlekiem Kobiecym i Laktacją przy Regionalnym Banku Mleka w Szpitalu im. Św. Rodziny w Warszawie, Zakład Biologii Medycznej, Wydz. Nauk o Zdrowiu, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Litewska 14/16, 00-575 Warszawa. Kontakt: elzbieta_rosiak@sggw.edu.pl

jące w mleku kobiecym stanowią podstawę kształtującego się mikrobiomu noworodka [14, 25]. Bakterie uznawane za naturalną mikroflorę mleka kobiecego zostały zaklasyfikowane do setek operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTUs Operational Taxonomic Units). W mleku każdej kobiety zidentyfikowano dziewięć OTUs stanowiących rdzeń mikroflory mleka matki i jednocześnie połowę mikroflory obserwowanej w próbie. Dziewięć rodzajów taksonomicznych bakterii występujących w mleku kobiecym to: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobiaceae* [7, 11, 20]. Ponadto wymienia się następujące rodzaje i gatunki bakterii wykazujące działanie probiotyczne: *Lactobacillus* (*L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bifidus*), *Bifidobacterium* (*B. bifidum*), *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. faecalis*) [22, 24, 38]. Wśród wymienionych rodzajów i gatunków bakterii znajdują się również szczepy patogenne, które nie zagrażają zdrowiu zdrowych niemowląt urodzonych w terminie [21].

W wyniku zakażeń bakteryjnych matki, zaniedbań higienicznych i manipulacyjnych w mleku mogą wystąpić bakterie patogenne, które stanowią przyczynę występowania ciężkich postaci sepsy wśród wcześniaków, noworodków i niemowląt [4, 22, 39]. Skażenie mleka kobiecego bakteriami może być także spowodowane zanieczyszczeniami środowiskowymi, jak: kontakt mleka z niesterylnymi powierzchniami (plastikowe butelki do przechowywania mleka, smoczki, części laktatora), niewłaściwy sposób odciągania mleka, nieodpowiedni transport, składowanie lub przechowywanie mleka, zanieczyszczenia krzyżowe oraz nieprzestrzeganie procedur dezynfekcji sprzętu mającego kontakt z mlekiem [4, 10, 17, 29]. Z mleka kobiecego izolowano następujące patogeny: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* spp., *Streptococcus* grupa B, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli* [6, 12, 23, 37 38].

Zasoby mleka kobiecego zgromadzone w Bankach Mleka Kobiecego podlegają procedurze postępowania zapewniającej bezpieczeństwo produktu. Po odebraniu mleka od dawczyni, przed procesem pasteryzacji, a także po procesie pasteryzacji mleko jest przechowywane w postaci zamrożonej w temp. $-18 \div -20$ °C. Następnie podlega rozmrażaniu, które powinno trwać możliwie krótko. Do rozmrażania żywności stosuje się m.in. temperaturę, wysokie ciśnienie hydrostatyczne, mikrofały, ultradźwięki, a w przypadku niektórych produktów – rozmrażanie immersyjne w solance [36]. Mleko kobiece rozmrażane jest w łaźni wodnej, w nawiewie ciepłego powietrza o temp. 37 °C lub w temperaturze chłodniczej. Mleka niepasteryzowanego po rozmrożeniu nie należy ponownie zamrażać, chyba że porcja mleka uległa rozmrożeniu w mniej niż połowie objętości (np. w czasie transportu do szpitala). Wówczas próbki należy traktować jak nierozmrożone i można je zamrozić. Mleko kobiece rozmrożone należy przechowywać w temp. 4 °C i zużyć w ciągu 24 h od całkowitego rozmrożenia. Mleko

rozmrózone podgrzane do temp. $25 \div 37$ °C należy zużyć maksymalnie w ciągu 4 h lub zutilizować [3]. Mleko pasteryzowane po rozmrożeniu należy wymieszać, a przed podaniem dziecku można podgrzać do temp. 37 ± 2 °C [3, 15].

Celem pracy była ocena jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego nieutrwalonego i mleka poddanego zamrożeniu, a następnie rozmrożeniu w nawiewie powietrza o temp. 37 °C.

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiło 20 próbek niepulowanego mleka kobiecego o objętości 20 ml każda (P1 - P20), pozyskanego od pięciu dawczyń Banku Mleka Kobiecego w Warszawie. Po ocenie jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego próbki zamrażano i przechowywano w temp. -20 °C przez 3 tygodnie. Następnie próbki rozmrażano w nawiewie powietrza o temp. 37 °C w ciągu do 30 min z kilkakrotnym mieszaniem. Za moment rozmrożenia uznawano brak obecności kryształów lodu.

Analizę mikrobiologiczną wykonywano w kierunku ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych – OLD [30], *Escherichia coli* [31], *Staphylococcus aureus* [32], *Cronobacter sakazakii* [33], *Listeria monocytogenes* [34], *Salmonella* spp. [35].

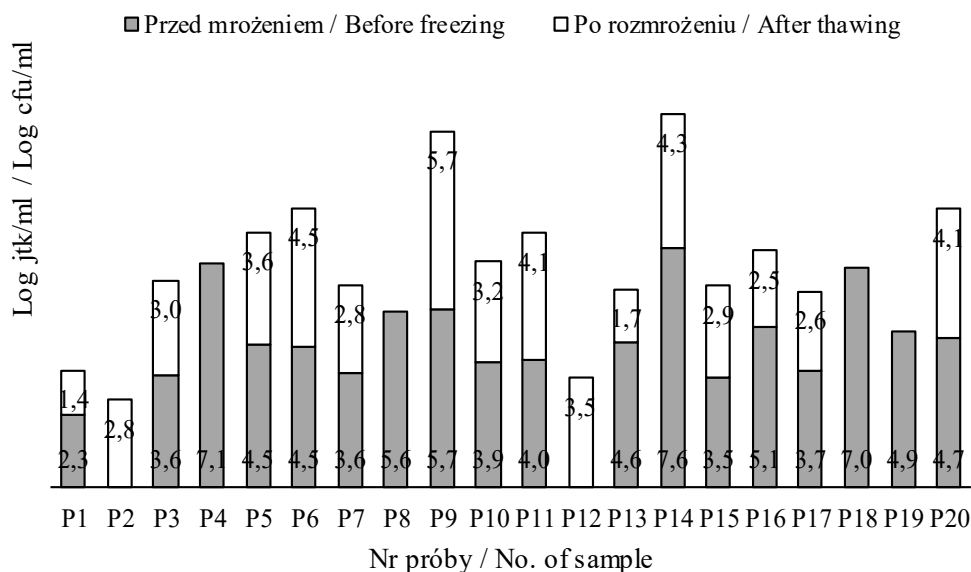
Analizę w kierunku ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych, *E. coli* i *C. sakazakii* wykonywano techniką posiewu wgłębnego z użyciem odpowiednio: agaru odżywczego AT 2 % (Biokar Diagnostics, Polska), agaru chromogenego TBX (LabM-Neogen Lmd, USA), agaru Rapid Sakazakii (LabM-Neogen Lmd, USA). Płytki inkubowano 24 - 48 h w temp. $30 \div 37$ °C. W przypadku oznaczenia *C. sakazakii*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* próby przednamnażano odpowiednio na: bulionie selektywnym *C. sakazakii* (LabM-Neogen Lmd, USA); bulionie ½ Frazer oraz Frazer – z suplementem X211 (LabM-Neogen Lmd, USA); BWP (LabM-Neogen Lmd, USA) i Rapaport-Vasiliadis (Oxoid, Polska) w temp. $30 \div 37$ °C/24 h. W przypadku *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* spp. wykonywano posiew powierzchniowy odpowiednio na pożywce Barid Parkera (LabM-Neogen Lmd, USA) z suplementem RPF (Bio-Rad, Polska), *Listeria chromogenic* Agar z suplementem X10; X72 (LabM-Neogen Lmd, USA) i Palcam (LabM-Neogen Lmd, USA) oraz XLD i BGA (LabM-Neogen Lmd, USA). Płytki inkubowano w temp. 37 °C przez 24 - 48 h. Po inkubacji zliczano typowe kolonie. Identyfikację bakterii *C. sakazakii* przeprowadzano z użyciem testów API 32E (Biomerieux, Polska).

Testowanie różnic statystycznych pomiędzy grupami przeprowadzono w programie Statistica wersja 13.3 z wykorzystaniem testu t przy $p = 0.05$.

Wyniki i dyskusja

Stan mikrobiologiczny mleka przed zamrożeniem

W żadnej z analizowanych próbek nie wykryto bakterii patogennych *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* spp., podobnie jak w badaniach, które przeprowadzili wcześniej Gribble i Hausman [12]. W przypadku próbek P2 i P12 nie oznaczono OLD, w pozostałych 18 zanieczyszczenie mleka kobiecego przed zamrożeniem wahało się od log 2,3 jtk/ml (P1) do log 7,59 jtk/ml (P14) – rys. 1. W przypadku 30 % próbek stwierdzono przekroczenie przyjętych w procedurach Banków Mleka Kobięcego w Polsce oraz Wielkiej Brytanii [24, 38] kryteriów zanieczyszczenia mikrobiologicznego na poziomie $< 10^5$ jtk/ml (tab. 1). Podczas identyfikacji mikroflory komensalnej, oznaczanej w postaci ogólnej liczby drobnoustrojów, wykazano jako dominujące rodzaje *Staphylococcus* spp. i *Streptococcus* spp. w mleku przed zamrożeniem i po rozmrożeniu. Gatunki *Streptococcus cristatus*, *S. mitis*., *S. peroris*, *S. parasanguis* i *S. salivarius* były obecne w mleku przed zamrożeniem oraz po zamrażalniczym przechowywaniu w temp. -20 °C przez 6 tygodni. W tym samym doświadczeniu w mleku przed zamrożeniem i po nim zaobserwowano także obecność jednego przedstawiciela bakterii



Rys. 1. Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych w mleku kobiecym przed zamrożeniem i po rozmrożeniu

Fig. 1. Total count of mesophilic aerobic microorganisms in breast milk before freezing and after thawing

Źródło / Source: opracowanie własne / the authors' own study

Tabela 1. Kryteria mikrobiologiczne nieutrwalonego mleka kobiecego przyjmowanego do Banku Mleka
 Table 1. Microbiological criteria for raw breast milk to be accepted into Human Milk Bank

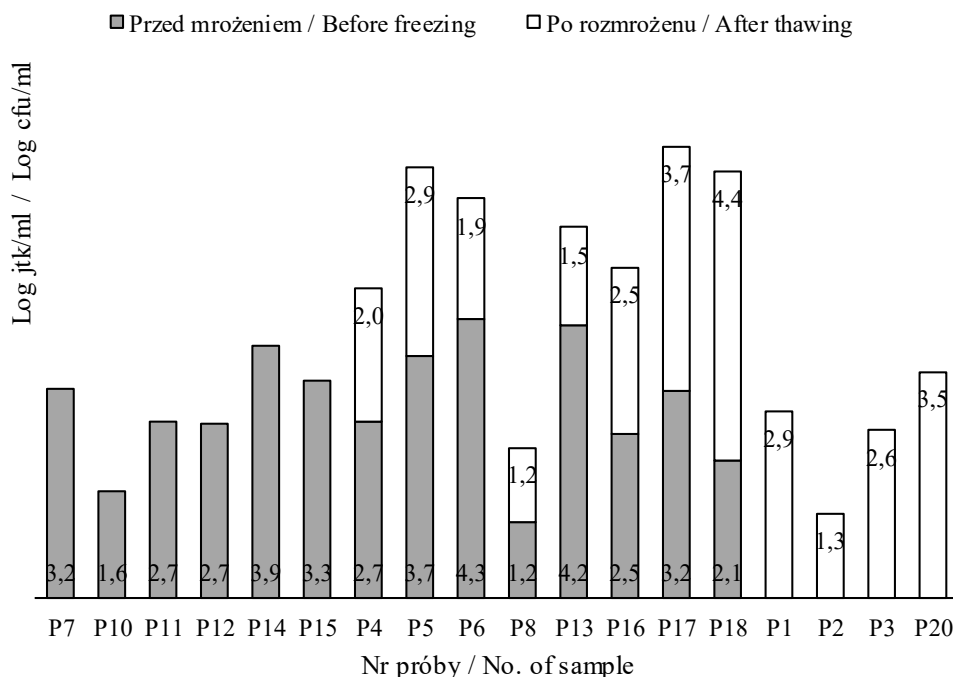
Kryterium oceny Assessment criterion	Maksymalna dopuszczalna liczba bakterii w surowym mleku [jtk/ml] Maximum acceptable count of bacteria in raw milk [CFU/ml]
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych Total count of mesophilic aerobic microorganisms	< 10 ⁵
Liczba gronkowców koagulazododatnich Count of coagulase positive staphylococci	< 10 ⁴
Liczba bakterii z grupy coli Count of coliform bacteria	< 10 ³

Źródło / Source: [24]

kwasy mlekowego – *Lactobacillus gasseri* [26]. Identyfikacja i badania mikroflory komensalnej i probiotycznej mleka kobiecego umożliwiły wykazanie potencjalnego jej wykorzystania w zapobieganiu stanom zapalnym powodowanym przez *S. aureus*. Mechanizm tego oddziaływania polega na współzawodnictwie mikroflory komensalnej z patogenem o składniki odżywcze, miejsca wiązania do komórek gospodarza oraz produkcję kwasu, nadtlenu wodoru czy bakteriocyn [14, 25].

W sześciu próbkach mleka kobiecego (30 %) przed procesem zamrażania (P5, P6, P9 - P11 i P19) stwierdzono obecność bakterii innych niż *E. coli*, uznanych za coliform.

Obecność *S. aureus* stwierdzono w 14 próbkach przed zamrożeniem na poziomie od log 1,15 jtk/ml (P8) do log 4,25 jtk/ml (P6) – rys. 2. W próbce P13. obserwowano przekroczenie poziomu zanieczyszczenia < 10⁴ jtk/ml przyjętego w procedurze postępowania z mlekiem w Banku Mleka (tab. 1). Inni autorzy również obserwowali obecność bakterii z rodzaju *Staphylococcus* spp. w mleku przed zamrożeniem i po nim, które stanowiły odpowiednio: 30,1 i 30,8 % całkowitej liczby drobnoustrojów. Gatunkiem dominującym był *S. epidermidis*, natomiast *S. homini*, *S. warneri* i *S. pasteurii* wymieniane są jako występujące sporadycznie [26]. Heikkilä i Saris [14] wyizolowali stafylokoki w 39 na 40 próbek badanego mleka, a dominującym gatunkiem był również *S. epidermidis*. [14]. W 7 próbkach były to jedyne oznaczone bakterie. Identyfikacja z zastosowaniem techniki PCR umożliwiła wykrycie obecności *S. aureus* w 62 (86,2 %) z 72 badanych próbek mleka kobiecego. Spośród 62 izolatów *S. aureus* 30 (48,3 %) miało przynajmniej jeden gen kodujący produkcję enterotoksyn. W pozostałych 10 próbkach oznaczono *Staphylococcus lugdunensis*. W badaniach własnych w 6 próbkach (42,85 %) mleka rozmrożonego, tj. P7, P10, P11, P12, P14 i P15 nie stwierdzono *S. aureus*, co może świadczyć o hamującym wpływie procesu mrożenia i/lub mikroflory komensalnej mleka kobiecego na namnażanie tych bakterii [14].

Rys. 2. Liczba *Staphylococcus aureus* w mleku kobiecym przed zamrożeniem i po rozmrożeniuFig. 2. Count of *Staphylococcus aureus* in breast milk before freezing and after thawing

Źródło / Source: opracowanie własne / the authors' own study

W 8 próbkach: P4, P7 - P10, P13, P15 i P19 mleka kobiecego przed procesem zamrażania oznaczono drobnoustroje wykazujące na pożywce Rapid Sakazakii wzrost typowy dla *C. sakazakii*. Oznaczona liczba bakterii wyniosła od log 1,82 jtk/ml do log 3,70 jtk/ml. W badaniach identyfikacji testami biochemicznymi [33] nie potwierdzono przynależności kolonii bakteryjnych do rodzaju *Cronobacter* spp. Bowen i wsp. [4] oraz McMullan i wsp. [23] opisali przypadki izolowania *C. sakazakii* z próbek mleka kobiecego oraz z powierzchni sprzętu mającego kontakt z mlekiem kobiecym. Najczęściej jednak mleko kobiece jest czynnikiem transferu patogenu ze środowiska do organizmu dziecka. Bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. zalicza się do patogenów odpowiedzialnych za występowanie rzadkich, ale zagrażających życiu chorób: zapalenia opon mózgowych, bakteriemii, kilku form martwiczego zapalenia jelit [2]. Najbardziej narażone na zakażenia wywołane przez bakterie z rodzaju *Cronobacter* spp. są noworodki poniżej 28. dnia życia, noworodki urodzone przedwcześnie, niemowlęta o małej masie urodzeniowej (poniżej 2,5 kg) oraz niemowlęta z upośledzeniem odporności [8, 19]. W USA częstość występowania infekcji wywołanych przez *Cronobacter* spp. wynosi 1 na 100 tysięcy niemowląt, ale ryzyko zakażenia wzrasta do 9,4 w przypadku

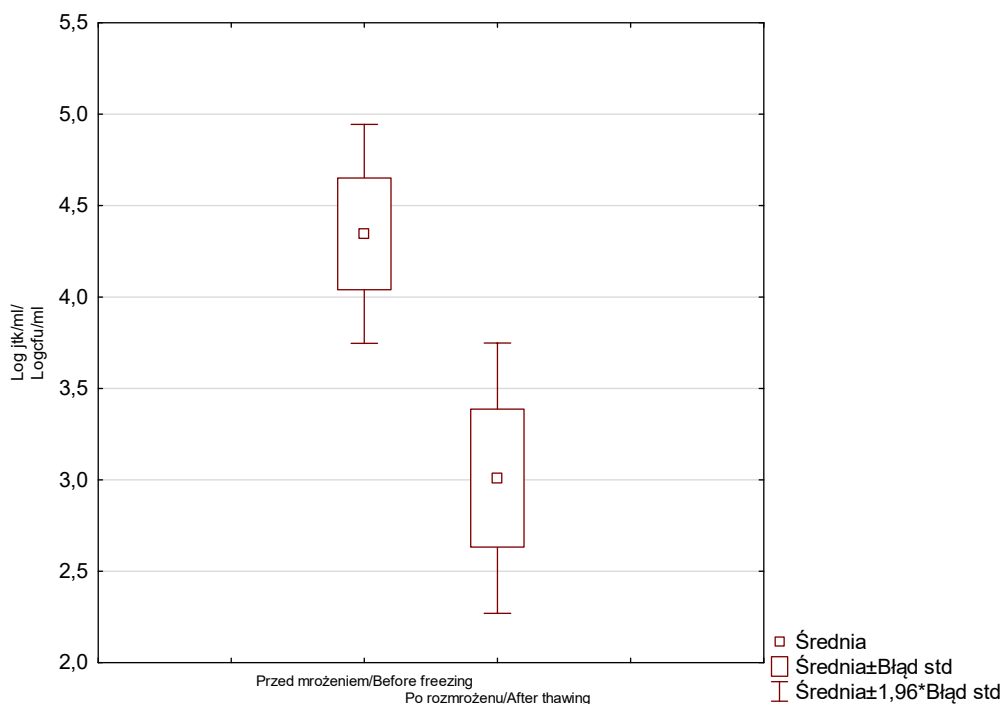
niemowląt z małą masą urodzeniową [16]. Wskaźnik śmiertelności niemowląt z noworodkowym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych szacuje się na ok. 40 ÷ 80 % [5, 9]. W 94 % przypadków u niemowląt, które przeżyły ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych wywołane zakażeniem *C. sakazakii*, choroba ta pozostawiała nieodwracalne powikłania neurologiczne, m.in. wodogłowie, zaburzenia słuchu i wzroku oraz niedowład kończyn [5].

Stan mikrobiologiczny mleka po rozmrożeniu

W żadnej z analizowanych próbek mleka po rozmrożeniu nie wykazano obecności bakterii patogennych *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* spp. W 4 próbach mleka rozmrożonego: P4, P8, P18, P19 nie oznaczono OLD. W przypadku pozostałych próbek mleka rozmrożonego (80 %) stwierdzono statystycznie istotną redukcję liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych przed procesem mrożenia i po nim ($p < 0,01$) (rys. 1 i 3). Zaobserwowana tendencja redukcji ogólnej liczby drobnoustrojów może być wynikiem zakłócenia warunków niezbędnych do prawidłowego metabolizmu drobnoustrojów przez zamrażanie wolnej wody zawartej w produkcie. Zmniejszenie liczby drobnoustrojów w temperaturze poniżej 0 °C stopni jest procesem powolnym i zależy m.in. od wartości temperatury. Zamrażanie mleka kobycego prowadzi się w temp. -18 ÷ -20 °C i nie gwarantuje to zaniku całej populacji drobnoustrojów [13]. Marin i wsp. [26] nie stwierdzili statystycznie istotnych różnic pod względem ogólnej liczby drobnoustrojów pomiędzy próbkami mleka przed zamrożeniem i po przechowywaniu zamrażalniczym [26]. Novak i wsp. [28] analizowali 30 próbek rozmrożonego mleka kobycego. Otrzymane przez autorów wyniki były znacznie wyższe niż otrzymane w badaniach własnych. Wartość ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych wynosiła od 10^4 jtk/ml do 10^8 jtk/ml. W 7 próbkach mleka rozmrożonego (35,0 %): P1 - P3, P5, P8, P9, P11 w analizie na pożywce z tryptonem, żółcią i X-β-D glukuronidem stwierdzono obecność drobnoustrojów niewykazujących typowego dla *E. coli* wzrostu. Zanieczyszczenie mleka tą grupą drobnoustrojów wynosiło od log 1,78 do log 3,59 jtk/ml. Obecność *E. coli* oraz bakterii z grupy coli może świadczyć o nieprawidłowej higienie postępowania z mlekiem kobyceym. Analogiczne wyniki uzyskali Novak i Almeida [27]. Pałeczki z grupy coli wyizolowali oni z 31,2 % próbek mleka kobycego, a oznaczona liczba bakterii wynosiła $3 \times 10^0 \div 1,1 \times 10^4$.

Bakterie *S. aureus* oznaczono w 12 próbkach mleka rozmrożonego na poziomie od log 1,15 jtk/ml (P8) do log 4,43 jtk/ml (P18). W przypadku próbek mleka P4 - P6, P8, P13, P16 - P18 liczba bakterii *S. aureus* w próbkach rozmrożonych nie różniła się statystycznie istotnie ($p = 0,453$) od liczby tych bakterii w próbkach przed zamrożeniem (rys. 4). Były to wyniki podobne do tych, które uzyskali Marin i wsp. [26] w przypadku wszystkich oznaczanych grup drobnoustrojów w próbkach przed zamrożeniem i przechowywanych przez sześć tygodni. Novak i wsp. [28] oznaczyli liczbę *S.*

aureus w 9 z 30 przeanalizowanych próbek, a zanieczyszczenie wynosiło od 10^3 jtk/ml ÷ 10^6 jtk/ml. Wśród zdrowej populacji nosicielstwo *S. aureus* nie jest rzadkie i, jak podają Adamek-Guzik i wsp. [1], dotyczy 18 ÷ 40 % osób. W 4 próbkach (P1 - P3, P20) oznaczono *S. aureus* tylko w mleku rozmrożonym.



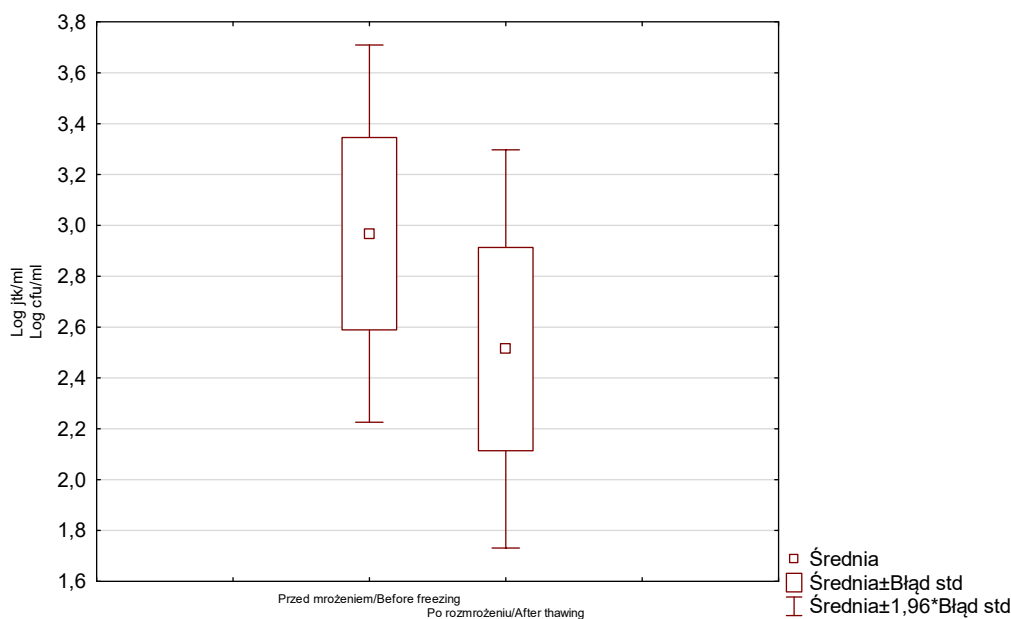
Rys. 3. Statystyki opisowe ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych mezofilnych oznaczonych w mleku kobiecym przed zamrożeniem i po rozmrożeniu

Fig. 3. Descriptive statistics of total count of mesophilic aerobic microorganisms determined in breast milk before freezing and after thawing

Źródło / Source: opracowanie własne / the authors' own study

W próbkach mleka rozmrożonego P1, P6, P11, P12, P16 - P18 nie stwierdzono obecności bakterii wykazujących wzrost na pożywce Rapid Sakazakii. W pozostałych 13 próbkach stwierdzano wzrost mikroflory mleka na wymienionej pożywce przed zamrożeniem lub po procesie rozmrażania. Komercyjne zestawy testów biochemicznych ID32E i API 20E nie pozwalają na wiarygodną identyfikację izolatów *Cronobacter* na poziomie rodzaju i gatunku. Metoda dostarcza fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych wyników. Około 80 % szczepów *Cronobacter* zostało poprawnie zidentyfikowanych na poziomie rodzaju z wykorzystaniem bieżących wersji baz danych ID 32E i API 20E odpowiednio v. 4.0 i v. 5.0., natomiast identyfikacja na poziomie gatunku

z wykorzystaniem zestawu ID 32E dała poprawne wyniki w 50 %. W przypadku kart Vitek GN wszystkie gatunki *Cronobacter* zostały zidentyfikowane jako *C. sakazakii*, do grupy tej zaliczono także przedstawicieli rodzaju *Franconibacter* [18, 40].



Rys. 4. Statystyki opisowe liczby *Staphylococcus aureus* oznaczonych w mleku kobiecym przed zamrożeniem i po rozmrożeniu

Fig. 4. Descriptive statistics of count of *Staphylococcus aureus* determined in breast milk before freezing and after thawing

Źródło / Source: opracowanie własne / the authors' own study

Wnioski

1. W mleku kobiecym poddanym analizie nie oznaczono bakterii patogennych *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Cronobacter sakazakii*.
2. Po procesach zamrażania i rozmrażania mleka kobiecego metodą owiewową zaobserwowano istotną redukcję ogólnej liczby drobnoustrojów w porównaniu z mlekiem neutralnym. Liczba próbek przekraczających górną granicę tolerancji zanieczyszczenia OLD – 10^5 jtk/ml zmniejszyła się z 30 do 5 %.
3. Procesy zamrażania i rozmrażania mleka nie wpłynęły na liczbę bakterii *S. aureus*. Nie oznaczono bakterii *E. coli* w mleku kobiecym przed zamrożeniem i po rozmrożeniu, natomiast bakterie z grupy coli oznaczono odpowiednio w 30 i 35 % próbek.

4. Proces zamrażania i prawidłowo przeprowadzony proces rozmrażania mogą stanowić istotny czynnik kształtowania jakości mikrobiologicznej mleka kobiecego.

Literatura

- [1] Adamek-Guzik T., Guzik T., Czerniawska-Mysik G., Pryjma J.: Znaczenie obniżonej odporności na infekcje w patogenezie atopowego zapalenia skóry – Rola *Staphylococcus aureus*. *Alerg. Astma Immun.*, 2001, 6, 169-179.
- [2] Akineden O., Heinrich V., Grossb M., Usleber E.: Reassessment of *Cronobacter* spp. originally isolated as *Enterobacter sakazakii* from infant food. *Food Microbiol.*, 2017, 65, 44-50.
- [3] Bernatowicz-Łojko U., Wesółowska A: Zasady postępowania z mlekiem matki dla jej biologicznego dziecka przebywającego w szpitalu oraz ze sprzętem laktacyjnym – rekomendacje. *Bank Mleka Kobiecego*, Warszawa 2014.
- [4] Bowen A., Wiesenfeld H.C., Kloesz J.L., Pasculle A.W., Nowalk A.J., Brink L., Elliot E., Martin H., Tarr C.L.: Notes from the Field: *Cronobacter sakazakii* infection associated with feeding extrinsically contaminated expressed human milk to a premature infant – Pennsylvania 2016. *MMWR*, 2017, 66, 761-762.
- [5] Dancer G.I., Mah J.H., Rhee M.S., Hwang I.G., Kang D.H.: Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.*, 2009, 107, 1606-1614.
- [6] Eja M.E., Asikong B.E., Udo S.M., Mboto C.I., Arikpo G.E.: Microbiological and biochemical assessment of the surface area of breast nipples and breast milk of lactating women in Calabar, Southeastern Nigeria. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health*, 2006, 37, 215-221.
- [7] Fernández L., Langa S., Martín V., Maldonado A., Jiménez E., Martín R., Rodríguez J.M.: The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.*, 2013, 69, 1-10.
- [8] Friedemann M.: Epidemiology of invasive neonatal *Cronobacter* (*Enterobacter sakazakii*) infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2009, 28, 1297-1304.
- [9] Gemba M., Rosiak E., Kołożyn-Krajewska D.: *Cronobacter* spp. Poważne zagrożenie w żywności dla niemowląt. *Postępy Mikrobiologii*, 2020, 53 (1), 137-149.
- [10] Giovannini M., Verduci E., Ghisleni D., Salvatici E., Riva E., Agostoni C.: *Enterobacter sakazakii*: An emerging problem in paediatric nutrition. *Int. Med. J. Resarch*, 2008, 35, 394-399.
- [11] Gomez-Gallego C., Garcia-Mantrana I., Salmien S.: The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Semin. Fetal Neonatal Med.*, 2016, 21, 400-405.
- [12] Gribble K.D., Hausman B.L.: Milk sharing and formula feeding: Infant feeding risks in comparative perspective? *Australas. Med. J.*, 2012, 5(5), 275-283.
- [13] Gruda Z., Postolski J.: Zamrażanie żywności. WNT, Warszawa 1985.
- [14] Heikkilä M.P., Saris P.E.J.: Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J. Appl. Microbiol.*, 2003, 95, 471-478.
- [15] Helwich E., Wilińska M., Borszewska-Kornacka M.K., Królak-Olejnik B., Nehring-Gugulska M., Bernatowicz-Łojko U., Zawitkowski P., Nowicka K., Pawlus B., Kostuch M., Baszczeska J.: Program wczesnej stymulacji laktacji dla ośrodków neonatologicznych i położniczych III poziomu referencyjnego. *Stand. Med., Pediatr.*, 2014, 11, 9-16.
- [16] Hu L., Grim C.J., Franco A.A., Jarvis K.G., Sathyamoorthy V., Kothary M.H., Tall B.D.: Analysis of the cellulose synthase operon genes, *bcsA*, *bcsB*, and *bcsC* in *Cronobacter* species: Prevalence among species and their roles in biofilm formation and cell-cell aggregation. *Food Microbiol.*, 2015, 52, 97-105.

- [17] Jackson E., Flores J., Fernandez-Escartin E., Forstye S.: Reevaluation of a suspected *Cronobacter sakazakii* outbreak in Mexico. *J. Food Prot.*, 2015, 78, 1191-1196.
- [18] Jackson E.E., Forsythe S.J.: Comparative study of *Cronobacter* identification according the phenotyping methods. *BMC Microbiol.*, 2016, 16, #146.
- [19] Jaradat Z.W., Mousa W.A., Elbetiha A., al Nabulsi A., Tall B.D.: *Cronobacter* spp. – opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *J. Med. Microbiol.*, 2014, 63, 1023-1037.
- [20] Jiménez E., de Andrés J., Manrique M., Pareja-Tobes P., Tobes R., Martinez-Blanch J.F., Codoñer F.M., Ramón D., Fernández L., Rodríguez J.M.: Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. *J. Hum. Lact.*, 2015, 31 (3), 406-415.
- [21] Keim S.A., Hogan J.S., McNamara K.A., Gudimelta V., Dillon C.E., Kwiek J.J., Geraghty S.R.: Microbiological contamination of human milk purchased via the internet. *Pediatrics*, 2013, 132, 1227-1235.
- [22] Kornacka M.K.: Flora bakteryjna pokarmu naturalnego. *Pediatr. Pol.*, 2007, 12, 905-909.
- [23] McMullan R., Menon V., Beukers A.G., Jensen S.O., van Hal S.J., Davis R.: *Cronobacter sakazakii* infection from expressed breast milk, Australia. *Emerg. Infect. Dis.*, 2018, 24, 393-394.
- [24] Malinowska-Pañczyk E.: Jakość mikrobiologiczna mleka kobiecego z banku mleka. W: Banki Mleka w Polsce. Funkcjonowanie w podmiotach leczniczych – idea i praktyka. Red. A. Wesółowska. Fundacja Bank Mleka Kobiecego, Warszawa 2017, ss. 146-148.
- [25] Martín M.L., Olivares M., Boza J., Jiménez J., Fernández L., Xaus J., Rodríguez J.M.: The commensal microflora of human milk new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*, 2004, 15, 121-127.
- [26] Marín M., Arroyo R., Jiménez E., Gómmez A., Fernández L., Rodríguez J.M.: Cold storage of human milk: Effect on its bacterial composition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2009, 49, 343-348.
- [27] Novak F.R., Almeida J.A.G.: Alternative test for detection of coliforms bacteria in manually expressed human milk. *J. Pediatr.*, 2002, 78, 193-196.
- [28] Novak R.F., Junquera A.R., Dias M. de S.P.C., Almeida J.A.G.: Sensorial analysis of expressed human milk and its microbial load. *J. Ped.*, 2008, 84 (2), 181-184.
- [29] Peters M.D., McArthur A., Munn Z.: Safe of expressed breast milk: A systematic review. *Women and Brith.*, 2016, 29, 473-481.
- [30] PN-EN ISO 4833-2:2013-12. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 2: Oznaczanie liczby metodą posiewu powierzchniowego w temperaturze 30 stopni C.
- [31] PN-ISO 16649-2:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 2: Metoda płytkowa w temperaturze 44 stopni C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo beta-D-glukuronidu.
- [32] PN-EN ISO 6888-2:2001/A1:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków). Część 2: Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej z plazmą króliczą i fibrynogenem.
- [33] PN-EN-ISO 22964:2017-06. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania *Cronobacter* spp.
- [34] PN-EN ISO 11290-1:2017-07. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* i innych *Listeria* spp. Część 1: Metoda wykrywania.
- [35] PN-EN ISO 6579-1:2017-04. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda wykrywania, oznaczania liczby i serotypowania *Salmonella*. Część 1: Wykrywanie *Salmonella* spp.
- [36] Postolski J.: Badania nad zastosowaniem wysokich ciśnień w procesach zamrażania i rozmrażania żywności. *Chłodnictwo*, 2000, 35, 38-43.

- [37] Serafini A.B., Andre M.C., Rodrigues M., Kipnis A., Carvalho C., Campos R.M., Monteiro E., Martins F., Jube T.: Microbiological quality of human milk from a Brazilian milk bank. *Revista de Saúde Pública*, 2003, 37 (6), 775-779.
- [38] Serra V.V., Teves S., de Volder A.L., Ossorio F., Aguilar N., Armadans M.: Comparison of the risk of microbiological contamination between samples of breast milk obtained at home and at healthcare facility. *Arch. Argent. Pediatr.*, 2013, 111 (2), 115-119.
- [39] Shetty A., Barnes R., Adappa R., Doherty C.: Quality control of expressed breast milk. *J. Hosp. Infect.*, 2006, 62, 253-254.
- [40] Wang Q., Forsythe S.J., Zhao X.J., Wang Z.W., Li D., Ma D., Cao J.Y., Zeng J.: Species identification and molecular characterization of *Cronobacter* spp. isolated from food imported over nine years into Beijing, China. *Food Microbiol.*, 2019, 82, 11-19.

EFFECT OF FREEZING AND THAWING PROCESS ON MICROBIOLOGICAL SAFETY OF HUMAN MILK

S u m m a r y

Human milk is recognised as a "gold standard" of nutrition for all newborns owing to its unique nutritional and immunological properties and because it is a source of microflora, which is a basis for shaping the human microbiome. Activities of the Human Milk Banks contribute to the rationalisation of breast milk availability. Freezing is a method to preserve milk for keeping it stored. The research study attempts to assess the microbiological quality of unprocessed human milk and frozen and thawed milk using a method of air supply at 37 °C. Analyses were performed to determine the following: total count of mesophilic aerobic microorganisms (TPC – Total Plate Count), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. Based on the results obtained, it was found that in the case of the total count of mesophilic aerobic microorganisms 30 % of the samples of human milk before freezing exceeded the maximum acceptable count of microorganisms, while in the case of thawed milk the samples covered 5 %. The count of *Staphylococcus aureus* was exceeded in 10 % of milk samples prior to freezing and in 5 % of the thawed milk. It was found that the freezing process and the properly conducted thawing process might constitute an important element in shaping the microbiological quality of human milk. In the analysed samples of breast milk there were detected no pathogenic bacteria: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Cronobacter sakazakii*. *E. coli* bacteria were also absent, which proves a good state of hygiene and compliance with the instructions of hygienic milk handling.

Key words: human milk, food preservation, microbiological quality, freezing, thawing 