

APARATURA BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Zanieczyszczenie grzybami mikroskopowymi pomieszczeń gospodarczych na terenie Wielkopolski w 2010 roku

KINGA STUPER-SZABLEWSKA¹, TOMASZ SZABLEWSKI², ANNA OSTROWSKA¹, ANNA MATYSIAK¹, JULIUSZ PERKOWSKI¹

UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ¹Wydział Technologii Drewna, Katedra Chemii, ²Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Katedra Zarządzania Jakością Żywności

Słowa kluczowe : alergię, ergosterol, grzybnice, grzyby mikroskopowe, pył osiadły

STRESZCZENIE

Celem badań było oznaczenie jakościowe (obserwacja preparatów mikroskopowych) i ilościowe (oznaczenie stężenia ergosterolu oraz liczby JTK) pleśni. Analizowano 76 prób pyłów pochodzących z obór, chlewni i kurników pobranych z indywidualnych gospodarstw rolnych na terenie Wielkopolski w czerwcu 2010 r. Najwyższy poziom zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi stwierdzono w próbach pyłów pochodzących z kurnika (ERG: 651,16 mg/kg, log JTK/g: 8,4), natomiast najniższy w pyłach z chlewni (ERG: 170,25 mg/kg, log JTK/g: 1,3). Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowany poziom zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi pomieszczeń gospodarczych, a ich podwyższona zawartość w pyłe może wpływać istotnie na zdrowie pracowników oraz zwierząt gospodarskich.

Contamination of microscopic fungi livestock buildings in Wielkopolska in 2010

Keywords: microscopic fungi, ergosterol, the dust settled, fungal infections, allergies

ABSTRACT

Among the microorganisms present in the dust coming from the agricultural environment are important fungi. Aim of this study was to determine the quality (observation microscope slides) and quantitative (determination of the concentration of ergosterol (ERG) and the number of CFU/g) mold. We analyzed 76 samples of dust from the barn, piggery and poultry collected from individual farms in Wielkopolska in June 2010. The highest level of impurities was found microscopic fungi in samples derived from the house dust (ERG: 651.16 mg/kg, log CFU/g: 8.4), and lowest in the dust of the pig (ERG: 170.25 mg/kg, log CFU/g: 1.3). The results indicate the different levels of microscopic fungi contamination utility rooms, and their increased content of dust can significantly affect the health of workers and livestock.

1. WSTĘP

Grzyby mikroskopowe są jednymi z wielu mikroorganizmów powszechnie występujących w środowisku rolniczym. Ich obecność stanowi zagrożenie zarówno dla zwierząt jak i ludzi, ponieważ uwalniają one w swoim szlaku metabolicznym drugorzędowe, wtórne metabolity zwane mikotoksynami [1]. W pomieszczeniach gospodarskich panuje specyficzny mikroklimat sprzyjający rozwojowi mikoflory: wysoka wilgotność względna powietrza, podwyższona temperatura, brak cyrkulacji powietrza oraz podłoże będące dobrą pożywką do rozwoju grzybów pleśniowych, jakim jest zarówno pasza, ściółka jak i duża powierzchnia ścienna. Pleśnie są zaliczane do mikroorganizmów chorobotwórczych o działaniu głównie alergizującym, powodują również szereg grzybic, a ich wtórne metabolity wywołują choroby zwane mikotoksykozami. Pracownicy zatrudnieni w sektorze rolniczym są narażeni na ich chorobotwórcze działanie. Kliniczna manifestacja alergii na grzyby pleśniowe obejmuje objawy od strony układu oddechowego, narządu wzroku, skóry oraz układu pokarmowego. Drobnoustroje najczęściej przenoszone są w postaci bioaerozoli, czyli układów zawierających fazę rozpraszającą (powietrze) i fazę rozproszoną w postaci drobnych cząstek cieczy, kurzu pochodzenia roślinnego, zwierzęcego i mineralnego oraz zarodniki i konidialne grzybów, a także bakterie i ich przetrwalniki [2]. Przedmiotowa literatura podaje, że pył zarówno aerogeny jak i osiadły jest przyczyną szeregu chorób zawodowych, a od jego składu zależy rodzaj wywołanej choroby [1, 3]. Ocena zanieczyszczenia powietrza szkodliwymi czynnikami biologicznymi jest problemem bardzo aktualnym i istotnym z uwagi właśnie na zdrowie ludzi. Wspólnota Europejska wydała Dyrektywę 2000/54/WE, która dotyczy ochrony pracowników przed ryzykiem związanym z narażeniem na czynniki biologiczne w miejscu pracy. Wobec zagrożeń związanych z występowaniem szkodliwych czynników biologicznych w pomieszczeniach konieczna jest regularna jakościowa i ilościowa kontrola poziomu mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza.

Celem prowadzonych badań było określenie pod względem ilościowym oraz jakościowym grzybów mikroskopowych w pyłach osiadłych pochodzących z pomieszczeń gospodarskich, zebranych z indywidualnych gospodarstw rolnych znajdujących

się na terenie Wielkopolski w czerwcu 2010 r. Analizowano 76 prób pyłów osiadłych zebranych metodą grawimetryczną, pochodzących z obór, kurników oraz chlewni. W celu ilościowego oznaczenia ogólnej biomasy grzybowej zastosowano chemiczną metodę analizy swoistego markera grzybowego jakim jest ergosterol (ERG) oraz klasyczną metodę mikrobiologiczną oznaczania liczby JTK. Oznaczono również na podstawie morfologii kolonii i preparatów mikroskopowych izolowane rodzaje grzybów mikroskopowych.

2. MATERIAŁ I METODY

Materiał badany stanowiło 76 prób pyłów osiadłych zebranych z obór (n=25), chlewni (n=19) oraz kurników, w których w systemie przyzagrodowym utrzymywane były kury nioski (n=32), z indywidualnych gospodarstw rolnych zlokalizowanych na terenie Wielkopolski w czerwcu 2010 r.

2.1 Metoda poboru prób

Próby pyłu osiadłego pobrano postępując się metodą grawimetryczną – swobodnego opadu (Polska Norma PN-Z-04008-7:2002), polegającą na ekspozycji znanej powierzchni, na którą w sposób bierny, siłą grawitacji, opada pył. Z uwagi na specyfikę prowadzonych badań, powierzchnię swobodnego opadu można było pominąć, natomiast większe znaczenie miała masa osiadłego pyłu. Ekspozycja trwała 7 dni. Masa zebranego pyłu wynosiła ok. 2 g. Próby pobierano z 5 miejsc w jednym pomieszczeniu inwentarskim i uśredniano. Jedna z prób pobierana była z centrum pomieszczenia, a pozostałe z miejsc rozlokowanych na planie czworokąta.

2.2 Analiza zawartości ergosterolu (ERG)

Masa próby do analizy wynosiła 0,1 g. Próby umieszczano w zakręcanych probówkach do kultur o pojemności 17 ml, w których przeprowadzono ekstrakcję ergosterolu z jednoczesnym zmydleniem. Procesy te zachodziły pod wpływem promieniowania mikrofalowego. W tym celu do probówek dodawano 2 ml metanolu oraz 1 ml 0,5-molowego roztworu wodorotlenku sodu. Szczelnie zamknięte próbówki dla bezpieczeństwa umieszczono w plastikowych butelkach, które z kolei umieszczono w kuchence mikrofalowej (Whirlpool model AVM 401/1/WH, 2450 MHz, 900 W). Próby zostały poddane wpływowi promieniowa-

nia mikrofalowego o mocy 350 W dwukrotnie przez okres 20 sekund. Po schłodzeniu (około 15 minut) próbki poddano neutralizacji za pomocą 1-molowego wodnego roztworu kwasu solnego. Po dodaniu 2 ml metanolu ekstrahowano ergosterol za pomocą 12 ml pentanu 3 x 4 ml. Uzyskane ekstrakty pentanowe na bieżąco przenoszono do fiolki o pojemności 8 ml, po czym odparowano do sucha w strumieniu azotu. Przed rozpoczęciem analizy próby rozpuszczano w 1 ml metanolu. Analizę przeprowadzono za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczonego (Waters SDS 501) z detektorem absorbcyjometrycznym (Waters 486 Tunable Absorbance Detector). Rozdział chromatograficzny odbywał się na kolumnie Nova Pack C18 150 x 3,9 mm, jako fazę wymywiającą stosowano mieszaninę metanol: acetonitryl 90:10 (v/v). Pomiar stężenia ergosterolu następował przy użyciu wzorca zewnętrznego przy długości fali $\lambda=282$ nm. Identyfikacja związku odbywała się na podstawie porównania czasu retencji badanego pliku z czasem retencji standardu oraz poprzez dodanie do badanej próbki określonej ilości standardu i powtórny analizę. Odzysk ERG wynosił 97%, natomiast poziom wykrywalności 0,01 mg/kg [4].

2.3 Analiza ilościowa i jakościowa grzybów mikroskopowych

Ocenę liczby grzybów mikroskopowych w przeliczeniu na 1 g pyłu wykonano standardową metodą płytkową zgodnie z procedurą PN-ISO 21527-2: 2009. *Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni. Część 2: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody niższej lub równej 0,95*. 10 g rozdrobnionego materiału badanego (w trzech powtórzeniach) zawieszano w 90 ml wody peptonowej (BTL, Łódź) i homogenizowano. Z otrzymanej zawiesiny wyjściowej przygotowano kolejne rozcieńczenia dziesiętne i posiewano na jałowe płytki Petriego (9 cm) w dwóch powtórzeniach. Następnie posiane płytki zalano pożywką agarową z różem bengalskim i chloramfenikolem (BTL, Łódź). Posiane płytki inkubowano w temp. 25°C przez 5-7 dni. Wyniki podawano zgodnie z cytowaną wyżej normą, biorąc pod uwagę te płytki, na których liczba kolonii była niższa od 150, a wyższa od 15, z dwóch rozcieńczeń następujących bezpośrednio po sobie. Uzyskane uśrednione wyniki wyrażono w jtk/g. Wyrosłe kolonie analizowano również jakościowo na podstawie

morfologii kolonii i preparatów mikroskopowych, stosując odpowiednie klucze oznaczeń [5-7].

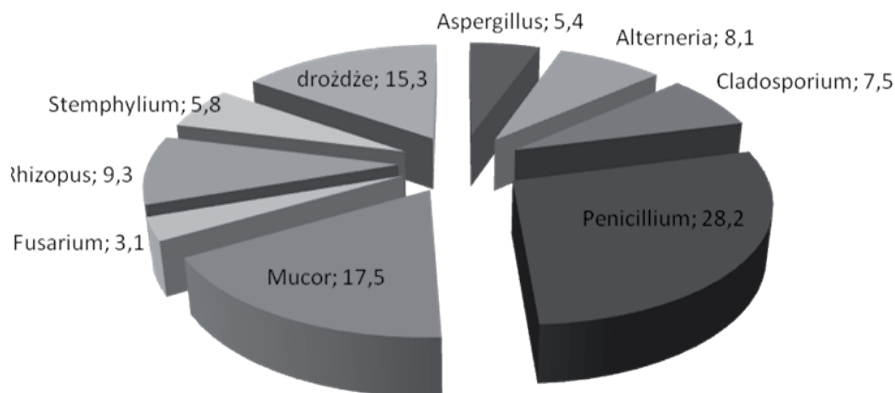
3. WYNIKI I DISKUSJA

Skład mikoflory powietrza zależy od warunków higienicznych panujących w pomieszczeniu gospodarczym oraz jakości paszy i ściółki zadawanej zwierzętom. W celu uzyskania właściwej czystości powietrza w odniesieniu do czynników biologicznych, a w szczególności grzybów mikroskopowych, należy zapewnić prawidłowe funkcjonowanie i konserwację systemów wentylacyjnych pomieszczeń gospodarskich, a w przypadku braku systemów wentylacyjnych trzeba zadbać o odpowiednie wietrzenie pomieszczenia.

Choroby spowodowane szkodliwym działaniem grzybów mikroskopowych występujących w atmosferze pomieszczeń gospodarskich są opisane w przedmiotowej literaturze [8]. Mechanizm alergizującego działania pleśni nie jest jednak do tej pory dokładnie poznany. Zależy on od szeregu czynników, głównie od preferencji osobniczych oraz koegzystowania różnych gatunków grzybów ogólnie określanych jako oddziaływanie synergistyczne. Dutkiewicz w szeregu prac poświęconych badaniu składu mikrobiologicznego pyłów opisał liczbę poszczególnych grup mikroorganizmów w pyłach pochodzących z różnych środowisk pracy [1]. Stwierdził mianowicie, że w skład wszystkich rodzajów pyłów wchodzi bakterie Gram-ujemne, bakterie Gram-dodatnie, promieniowce oraz grzyby mikroskopowe. Wśród tej ostatniej grupy mikroorganizmów najczęściej izolowane z tego rodzaju prób są grzyby z rodzaju: *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. candidus*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *A. niger*), *Penicillium*, *Eurotium*, *Trichoderma*, *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus* oraz drożdże *Candida* spp., *Rodothorulla* spp., *Endomyco-sis* spp.

Podczas realizacji niniejszej pracy oznaczono stężenie ERG w 76 pyłach osiadłych pochodzących z obór, chlewni oraz kurników. Spośród przeanalizowanych prób pyłów wyizolowano następujące rodzaje grzybów, które występowały we wszystkich badanych środowiskach: *Aspergillus*, *Penicillium* oraz *Rhizopus*. Dodatkowo w pyłe pochodzącym z obór zidentyfikowano grzyby z rodzaju *Cladosporium* i *Fusarium*, natomiast w przypadku pyłu pochodzącego z kurnika zidentyfikowano również grzyby z rodzaju *Fusarium*, a także *Mucor* oraz *Stemphylium*. Pył po-

chodzący z chlewni obok grzybów z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Rodothorulla* w swoim składzie zawierał również grzyby z rodzaju *Rhizopus* oraz drożdże (Rys. 1). Wśród badanych prób pyłów największy udział procentowy we wszystkich oznaczonych rodzajach grzybów miały grzyby z rodzaju *Penicillium*, *Mucor* i drożdże (Rys. 2). Najmniejszy udział w populacji oznaczonych mikroorganizmów miały grzyby z rodzaju *Fusarium*. Pod względem różnorodności występujących gatunków grzybów mikroskopowych kurnik jest najbogatszym miejscem. Lavoie i in. 2006 wskazali na ponad 20 rodzajów grzybów mikroskopowych występujących w różnych kurnikach [9]. Pasanen i in. 1999 na podstawie badań pyłów aerogenych pochodzących z chlewni i obór stwierdzili, że mikoflora grzybowa chlewni jest bardziej zróżnicowana pod względem jakościowym niż mikoflora obory [10]. Zidentyfikowali oni w chlewni następujące rodzaje grzybów: *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Drechslera*, natomiast w oborze zidentyfikowano głównie: *Penicillium* i *Fusarium*. Eduard 2009 w próbach pyłów osiadłych pochodzących z obory oznaczył

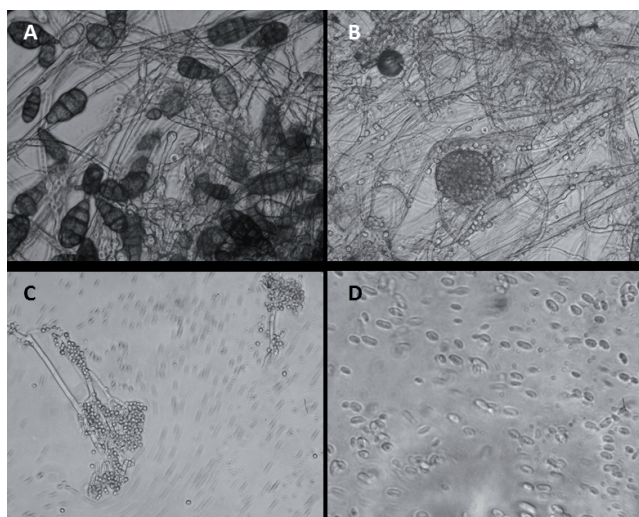


Rysunek 2 Procentowy udział oznaczonych rodzajów grzybów we wszystkich próbach pyłów

Figure 2 Percentage of designated types of fungi in all dust samples

obok w/w grzybów również: *Trichothecium* oraz *Thamnidium* [2].

Obok składu jakościowego mikoflory ważną ze względów zdrowotnych jest również ilość ogólnej mikoflory grzybowej w pyłe. Duża zawartość grzybnicy oraz zarodników w pyłe aerogennej zwiększa prawdopodobieństwo infekcji oraz wystąpienia objawów alergicznych nawet wśród osób nie podatnych na działanie alergenów [3]. W związku z powyższym próby pyłów poddano analizie ilościowej. Określenia ogólnej zawartości mikoflory dokonano na podstawie oznaczenia stężenia ergosterolu (ERG). Zawartość tego metabolitu w próbach była bardzo zróżnicowana (Tab. 1). Zakres stężenia ERG dla badanych prób wynosił od 142,08 mg/kg do 710,64 mg/kg. Najwyższe średnie stężenie zaobserwowano dla próby pyłu z kurnika i wynosiło ono 651,16 mg/kg, natomiast najniższe w pyłach z chlewni wynoszące 170,25 mg/kg. W przedmiotowej literaturze brak danych na temat zawartości ERG w pyłe pochodzącym z pomieszczeń gospodarskich. Znajdujemy natomiast informacje dotyczące stężenia tego metabolitu w pyłe pochodzącym z mieszkań. Tangni i in. 2006 podaje wyniki stężenia ERG w próbach pyłów pochodzących z pomieszczeń mieszkalnych znajdujące się w zakresie od 20 mg/kg do 165 mg/kg [11]. Sz wajkowska i in. 2010 analizowali próby pyłów pochodzących z laboratoriów zajmujących się analizą zbóż [12]. Zakres występujących stężeń ergosterolu dla wszystkich prób wynosił od 0,48 mg/kg do 212,36 mg/kg. Wśród danych dotyczących zawartości ERG w pyłach nie znajdujemy informacji, które mogłyby wskazywać jakie stężenie występujące w pyłe może stanowić zagrożenie dla ludzi narażonych na ich ekspozycję. Z jednej strony informacje na temat bezpiecznej



Rysunek 1 Zdjęcia aparatów rozmnażania grzybów mikroskopowych wyizolowanych z pyłów pochodzących z kurnika: A – *Alternaria*, B – *Mucor*, C – *Penicillium*, D – drożdże (powiększenie x 400)

Figure 1 Photos of reproduction apparatus of microscopic fungi isolated from the dust coming from the poultry house: A – *Alternaria*, B – *Mucor*, C – *Penicillium*, D – yeast (magnification x 400)

Tabela 1 Średnia i zakres zawartości ERG (mg/kg) oraz liczba grzybów w pyłach osiadłych zebranych w pomieszczeniach gospodarczych na terenie Wielkopolski
Table 1 Mean and range of content of ERG (mg/kg) and the number of fungi in settled dust collected from livestock buildings in the Wielkopolska

Pomieszczenie inwentarskie	Stężenie ERG (mg/kg)		Liczba grzybów (log jtk/g)	
	Zakres	Średnia	Zakres	Średnia
Kurnik (n=23)	457,55 – 710,64	651,16 ^c	6,9 – 9,1	8,4 ^c
Obora (n=12)	142,08 – 392,69	284,33 ^b	1,2 – 2,8	2,6 ^b
Chlewnia (n=11)	148,27 – 201,44	170,25 ^a	1,2 – 2,3	1,3 ^a

granicy stężenia tego metabolitu podają Maupeit i in. 1993 [13]. Przyjęli oni dla materiału roślinnego jakim są ziarniaki zbóż wartość 3 mg/kg jako bezpieczną dla konsumenta. Z drugiej strony Pasanen i in. podają, że w czystej kulturze grzybowej (w zależności od rodzaju i gatunku grzyba wartości stężenia ERG są nieco inne) średnie stężenie ERG wynosi ok. 1850 mg/kg [10].

4. PODSUMOWANIE

Wysokie stężenie ergosterolu w badanych pyłach pochodzących z różnych pomieszczeń gospodarskich wskazuje na liczne zagrożenia związane z możliwością wystąpienia chorób zawodowych. Dotyczy to głównie pracowników sektora rolniczego. Na racjonalne zagrożenia wskazuje zidentyfikowanie w analizowanym materiale różnych toksyno- i alergenotwórczych grzybów mikroskopowych. Wyznaczona duża ilość mikroflory potwierdza w pełni te obserwacje.

LITERATURA

- [1] Dutkiewicz J., Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 4, 11-16, 1997.
- [2] Eduard W., Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit. Rev. Toxicol.*, 39, 799-864, 2009.
- [3] Pałczyński C., Pleśnie jako alergen zawodowy. *Alergia*, 4, 28-32, 2007.
- [4] Perkowski J., Buśko M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Sz wajkowska-Michałek L., Concentration of ergosterol in small – grained naturalny contaminated and inoculated cereals. *Biologia*, 63(4), 542-547, 2008.
- [5] Raper K. B., Thom C., *A Manual of the Penicillia*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD 1949.
- [6] Arx J. A., *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. Lubrecht & Cramer, Port Jervis, NY 1970.
- [7] Domsch K. H., Gams W., Anderson T. H., *Compendium of Soil Fungi*. Academy Press, New York, NY 1980.
- [8] Krysińska-Traczyk E., Perkowski J., Kostecki M., Dutkiewicz J., Kiecana I., Grzyby pleśniowe i mykotoksyny jako potencjalne czynniki zagrożenia zawodowego rolników sprzątających zboże kombajnami. *Med. Pr.*, 54, 133-138, 2003.

- [9] Lavoie J., Dunkerley C. J., Kosatsky T., Dufresne A., Exposure to aerosolized bacteria and fungi among collectors of commercial, mixed residential, recyclable and compostable waste. *Sci. Total Environ.*, 15, 370(1), 23-28, 2006.
- [10] Pasanen A. L., Yli-Pietila K., Pasanen P., Kalliokoski P., Tarhanen J., Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1(65), 138-142, 1999.
- [11] Tangni E. K., Pussemier L., Ochratoxin A and citrinin loads in stored wheat grains: Impact of grain dust and possible prediction using ergosterol measurement. *Food Addit. Contam.*, 23, 181-189, 2006.
- [12] Szwajkowska-Michałek L., Stuper K., Łakomy P., Matysiak A., Perkowski J., Contents of microscopic fungi in dusts coming from cereal analysis laboratories, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 17, 101-106, 2010.
- [13] Maupetit P., Gatel F., Cahagnier B., Botorel G., Charlier M., Collet B., Dauvillier P., Laffiteau J., Roux G., Quantitative estimation of fungal infestation of feedstuffs by determining ergosterol content 44Th Annual meeting of EAAP Aarhus, Denmark, 16-19 August, Commission of animal nutrition 1993.