

# APARATURA

## BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

### Profil organicznych związków lotnych różnych rodzajów ściółek pochodzących z kurników zlokalizowanych w Polsce

*KINGA STUPER-SZABLEWSKA<sup>1</sup>, MACIEJ BUŚKO<sup>1</sup>, TOMASZ SZABLEWSKI<sup>2</sup>, ANNA OSTROWSKA<sup>1</sup>, ANNA MATYSIAK<sup>1</sup>, SEBASTIAN NOWACZEWSKI<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>KATEDRA CHEMII, UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU,

<sup>2</sup>KATEDRA ZARZĄDZANIA JAKOŚCIĄ ŻYWNOŚCI, WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIU, UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU,

<sup>3</sup>ZAKŁAD DROBIARSTWA, WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ I NAUK O ZWIERZĘTACH, UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU

**Słowa kluczowe:** zanieczyszczenie środowiska, ściółka, związki lotne

#### STRESZCZENIE

Przedstawiono wyniki analizy profilu związków lotnych za pomocą GC/MS trzech rodzajów ściółek pochodzących z kurników w których utrzymywane są kury nioski. Zidentyfikowano 115 związków lotnych, 46 należało do grupy metabolitów grzybów mikroskopowych. Wśród nich dominowały aldehydy i ketony – średnio od 0,5222 (RU) dla słomy pszennej do 2,7536 (RU) dla siewki słomiastej, oraz węglowodory – średnio od 0,1825 (RU) dla siewki słomiastej do 1,0918 (RU) dla słomy żytniej. Przeprowadzona analiza dyskryminacyjna wykazała, że największe znaczenie podczas rozdziału populacji grup analizowanych prób ściółek na podstawie profilu związków lotnych mają następujące związki: 2-metylobutanal, 1-heptanol, naftalen oraz trichodien.

# Profiles of organic volatile compounds in different types of litters in laying houses in Poland

**Keywords:** environmental pollution, litter, livestock, volatile compounds

## ABSTRACT

The paper presents results of analyses of the volatile compound profile provided by GC/MS for three types of litters from laying houses (poultry houses for layer hens). Among 115 identified volatile compounds 46 were found to be metabolites of microscopic fungi, predominantly aldehydes and ketones accounting on average for 0.52 (RU – peak area/area of internal standard – tridecane) for wheat straw up to 2.75 (RU) for chopped chaff, as well as hydrocarbons ranging from 0.18 (RU) for chopped chaff up to 1.09 (RU) for rye straw. Discriminant analysis showed the greatest role of 2-methylbutanal, 1-heptanol, naphthalene and trichodiene in the population distribution of groups of analyzed litter samples based on their profiles of volatile compounds.

## 1. WSTĘP

Uciążliwość zapachowa obiektów inwentarskich wiąże się z wydzielaniem do atmosfery podczas chowu zwierząt wielu różnych substancji, głównie kwasów organicznych, amoniaku i fenoli, które pobudzając komórki nabłonka węchowego powodują nieprzyjemne wrażenia węchowe [1]. W przypadku oddziaływania wielu substancji zapachowych, tak jak to ma miejsce w powietrzu usuwanym z budynków inwentarskich, może występować synergizm, maskowanie lub neutralizacja bodźców zapachowych [2].

Wśród budynków inwentarskich kurniki charakteryzują się wysokim stopniem emisji odorów do atmosfery otoczenia. W środowisku kurnika wskazano na szereg elementów mających istotny wpływ na ilość i jakość tworzonych odorantów. Wśród nich ściółka stanowi istotny element determinujący profil tworzonych związków lotnych. W większości ferm stosowane są ściółki, głównie słomiaste. Materiał przeznaczany na ściółkę powinien być suchy, czysty, wolny od zanieczyszczeń mechanicznych i mikrobiologicznych, o znikomym zapachu oraz o dobrych właściwościach higroskopijnych [3]. Rozwijające się na ściółce grzyby mikroskopowe są jednymi z wielu mikroorganizmów powszechnie występujących w środowisku kurnika. Stosowanie antybiotyków oraz inne próby ograniczenia rozwoju bakterii spowodowały zachwianie równowagi mikrobiologicznej i doprowadziły w wielu przypadkach do silnej eks-

pansji grzybów mikroskopowych trudnych do wyeliminowania. Grzyby mikroskopowe, stanowiące nawet do 35% całej populacji mikroorganizmów wchodzących w skład mikroflory ściółki, na drodze swojego metabolizmu produkują m.in. organiczne związki lotne (VOCs) [4]. Wśród nich istotną rolę odgrywa trichodien będący lotnym prekursorem tworzenia mikotoksyn z grupy trichotecenów [5]. Mikotoksyny to drugorzędowe metabolity wtórne wykazujące toksyczne działanie w stosunku do ludzi, zwierząt i roślin. Jedną z najlepszych metod analizy profilu związków lotnych jest wyodrębnianie ich z atmosfery za pomocą ekstrakcji do fazy stacjonarnej za pomocą mikrowłókna węglowego, a następnie analiza jakościowa i ilościowa za pomocą GC/MS lub elektronicznego nosa. Zastosowanie tej metody w przemyśle często związane jest z badaniem zafałszowań produktów rolno-spożywczych [6].

Celem niniejszych badań było oznaczenie profili organicznych związków lotnych ze szczególnym uwzględnieniem związków będących metabolitami grzybów mikroskopowych pochodzących z różnych rodzajów ściółek słomiastych stosowanych w kurnikach, w których utrzymywane są kury nioski. Badania te mają doprowadzić do ustalenia profilu związków lotnych ściółki zanieczyszczonej grzybami mikroskopowymi i w przyszłości mogą znaleźć zastosowanie do oceny czystości mikrobiologicznej oraz jakości ściółki stosowanej na fermach drobiu.

## 2. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 2.1 Materiał

Materiał badany stanowiły próby 3 rodzajów ściółek: siewki słomianej (n=150), słomy żytniej (n=110) i słomy pszennej (n=150) pochodzące z kurników fermowych (obsada: 250-300 kur) zlokalizowanych na terenie Polski północno-zachodniej.

### 2.2 Metodyka badań

Metabolity lotne były wyodrębniane ze ściółki metodą mikroekstrakcji do fazy stałej, którą w tym przypadku stanowiła warstwa polidimetylosiloksanu (PDMS) o grubości 100 µm związana na włóknie nośnikowym [5]. W tym celu próbkę rozdrobioną ściółki (8 g) umieszczono w buteleczkach o pojemności 20 cm<sup>3</sup>, zamkniętych szczelnie kapslem z membraną, po czym przez membranę wprowadzone zostało włókno PDMS i w temperaturze 50°C przez 30 min wykonywano ekstrakcję związków lotnych z fazy nadpowierzchniowej próbki ziarna. Analiza związków lotnych wykonana została za pomocą chromatografu gazowego (Hewlett Packard 6890) wyposażonego w detektor mas (Hewlett Packard 5972 A) oraz kolumnę HP-5MS (30,0 m, 0,25 µm). W celu identyfikacji związków lotnych analiza przeprowadzona została w zakresie mas spektrometru 50 – 250 m/z. Widma masowe pików uzyskanych w trakcie rozdzielania porównano z widmami mas zawartymi w bibliotece NIST02 oraz Wiley 7N lub standardów chemicznych.

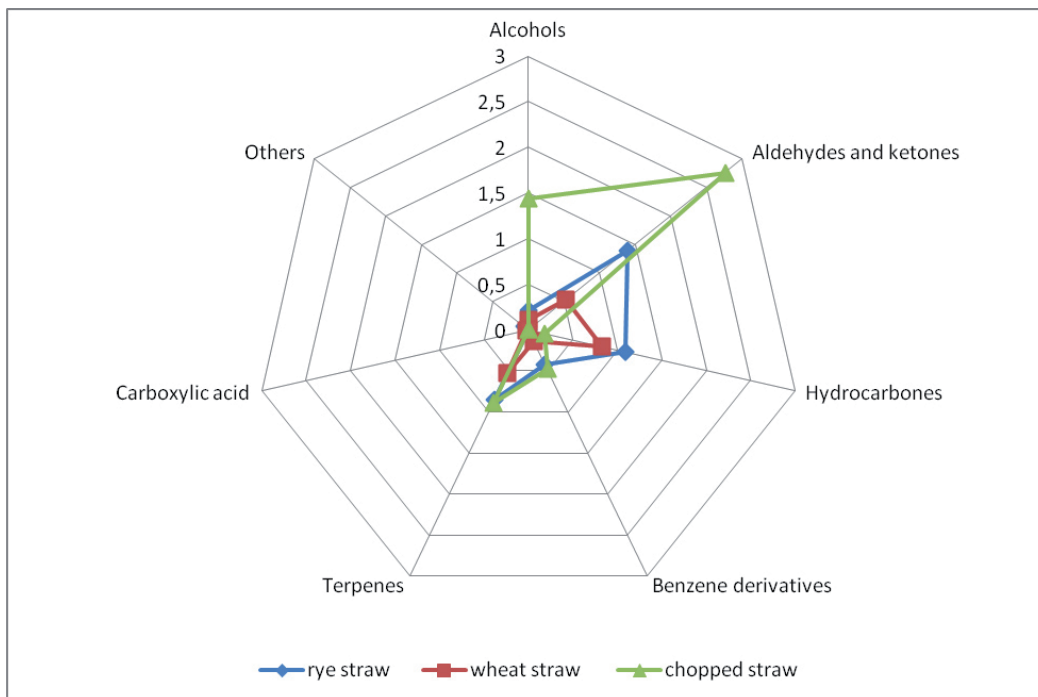
Uzyskane wyniki poddane zostały analizie statystycznej w programie STATISTICA v 8.0. Analizę profilu związków lotnych wykonano w trzech powtórzeniach dla każdej próby. Wyniki przedstawione na wykresach stanowią wartości średnie, a obliczone odchylenia standardowe ( $\pm$ SD) zaznaczono w postaci słupków błędów. Ocenę istotności różnic przeprowadzono metodą analizy wariancji. Do określenia jednorodności wariancji stosowano test Levene'a. Celem oszacowania statystycznie istotnych różnic pomiędzy średnimi zastosowano test Tukey'a. Przeprowadzono również krokową analizę dyskryminacyjną (SLDA) w celu rozdziału grup analizowanych populacji. Dodatkowo zastosowano również macierz klasyfikacji oraz wielowymiarowe testy istotności.

## 3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

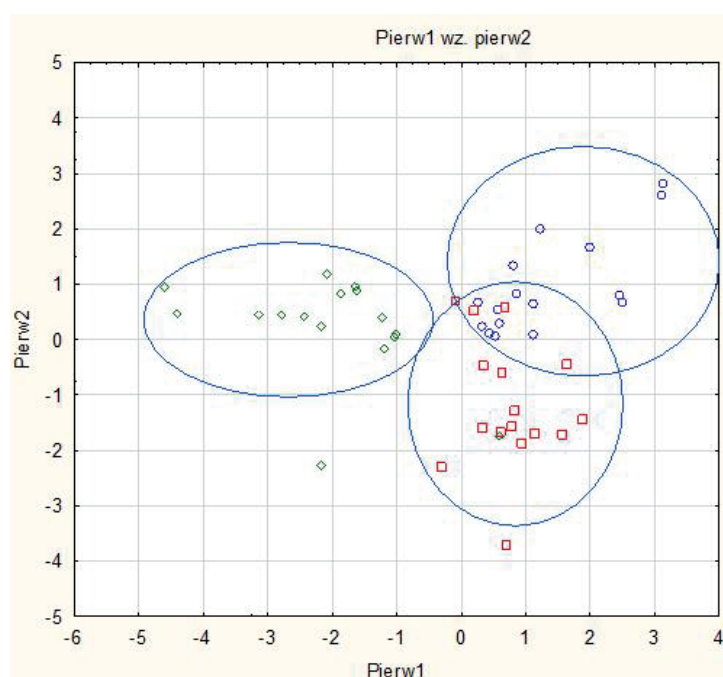
Analiza jakościowa organicznych związków lotnych pozwoliła zidentyfikować 115 związków, z czego 46 należy do grupy metabolitów grzybów mikroskopowych (Tab. 1). Związki odorotwórcze podzielić możemy na kilka najważniejszych grup. Należą do nich lotne kwasy organiczne (o łańcuchach prostych i rozgałęzionych), związki aromatyczne (indole, fenole), związki zawierające azot (amoniak, lotne aminy) oraz związki zawierające siarkę (siarkowodor oraz merkaptany) [7]. Wśród wszystkich zidentyfikowanych w ramach niniejszej pracy związków lotnych będących metabolitami grzybów mikroskopowych dominowały aldehydy i ketony – średnio od 0,5222 (RU) dla słomy pszennej do 2,7536 (RU) dla siewki słomianej, oraz węglowodory – średnio od 0,1825 (RU) dla siewki słomianej do 1,0918 (RU) dla słomy żytniej (Tab. 1). Profile analizowanych ściółek różniły się istotnie, zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym oznaczonych związków (Rys. 1). Wśród badanych ściółek siewka słomiana charakteryzowała się największą różnorodnością zidentyfikowanych związków oraz zawierała ich najwyższe stężenia. W celu oceny, czy zastosowana metoda analityczna pozwoli na podstawie oznaczonych profili związków lotnych rozdzielić analizowane populacje ściółek zastosowano krokową analizę dyskryminacyjną (SLDA). Uzyskano istotny na poziomie ufności  $p=0,001$  rozdział ściółek: siewka słomiana 100%, słoma żytnia 79% i słoma pszena 65% (Rys. 2). Analiza funkcji dyskryminacyjnej wykazała, że wśród 46 związków wprowadzonych do modelu statystycznego SLDA 2-metylobutanal (Lambda Wilks'a: 0,3151, F usunięcia: 34,3364), 1-heptanol (Lambda Wilks'a: 0,1352, F usunięcia: 3,8860), naftalen (Lambda Wilks'a: 0,1406, F usunięcia: 4,8011) oraz trichodien (Lambda Wilks'a: 0,1368, F usunięcia: 4,1572) cechują się największą siłą dyskryminacyjną, a przez to odgrywają istotną rolę w różnicowaniu poszczególnych ściółek w zależności od ich stopnia zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi. Jednym z istotnych oznaczonych związków jest trichodien, będący lotnym prekursorem tworzenia jednej z najczęściej występujących w klimacie Europy Środkowej miktotoksyn, a mianowicie deoksynivalenolu (DON), należącego do grupy trichotecenów (Rys. 3). Profil związków lotnych tworzonych przez grzyby mikroskopowe zależy od rodzaju podłoża, w tym przypadku rodzaju ściółki.

**Tabela 1** Porównanie uśrednionych profili związków lotnych produkowanych przez grzyby mikroskopowe na trzech rodzajach ściółki. Zawartość poszczególnych związków została wyrażona w RU (powierzchnia piku/powierzchnię standardu wewnętrznego – tridekan)

No.	Związek chemiczny	Rodzaj ściółki		
		Słoma żytnia	Słoma pszenna	Sieczka słomiasta
1	metanol			1,12
2	etanol		0,01	
3	propanol			0,52
4	1-dekanol	0,14		
5	1-heptanol	0,17	0,08	1,49
6	1-heksanol			0,06
7	1-octen-3-ol		0,01	
8	2-etyl-1-heksanol	0,18	0,08	0,75
9	2-fenoksyetanol			0,05
10	aceton	0,25	0,07	0,15
11	butanon		0,02	0,28
12	pentanon	0,01	0,04	0,04
13	metylpentan-2-on	0,05		
14	(E)-6,10-dimetyl-5,9-undekadien-2-on,	0,46	0,26	0,54
15	heptanal			0,29
16	nonanal		0,04	0,01
17	1,3,5-trimetylobenzen	0,02		
18	1-etyl-2-metylobenzen	0,01	0,01	
19	2-metylonaftalen	0,03		
20	benzen		0,03	
21	toluen			0,03
22	1,2,4-trimetylobenzen	0,04		
23	cyklaheksane	0,03		0,02
24	1-metylo-4-prop-1-en-2-yn-cycloheksen			0,01
25	2-metyl-1-propen	0,03	0,06	0,06
26	cyclopentan	0,16	0,16	0,35
27	tridecan		0,02	0,23
28	indan		0,01	
29	propylobenzen	0,16	0,15	0,07
30	p-ksylen	0,89	0,17	0,04
31	styren	0,03	0,02	
32	dodecan	0,57	0,30	0,07
33	eicosan	0,13		
34	pentadecan	0,10	0,06	0,03
35	tetradecan		0,02	
36	triacontan		0,01	
37	undecan	0,16	0,27	0,19
38	3-caren	0,33	0,35	0,04
39	cymen		0,01	
40	lilial		0,01	
41	limonen	0,02	0,02	
42	5-butyldihydro-2(3H)-furanon	0,08	0,05	0,02
43	dietyloftalen		0,02	
44	dichlorometan	0,01	0,02	
45	trichlorometan	0,01	0,02	
46	chloroetan	0,03	0,02	

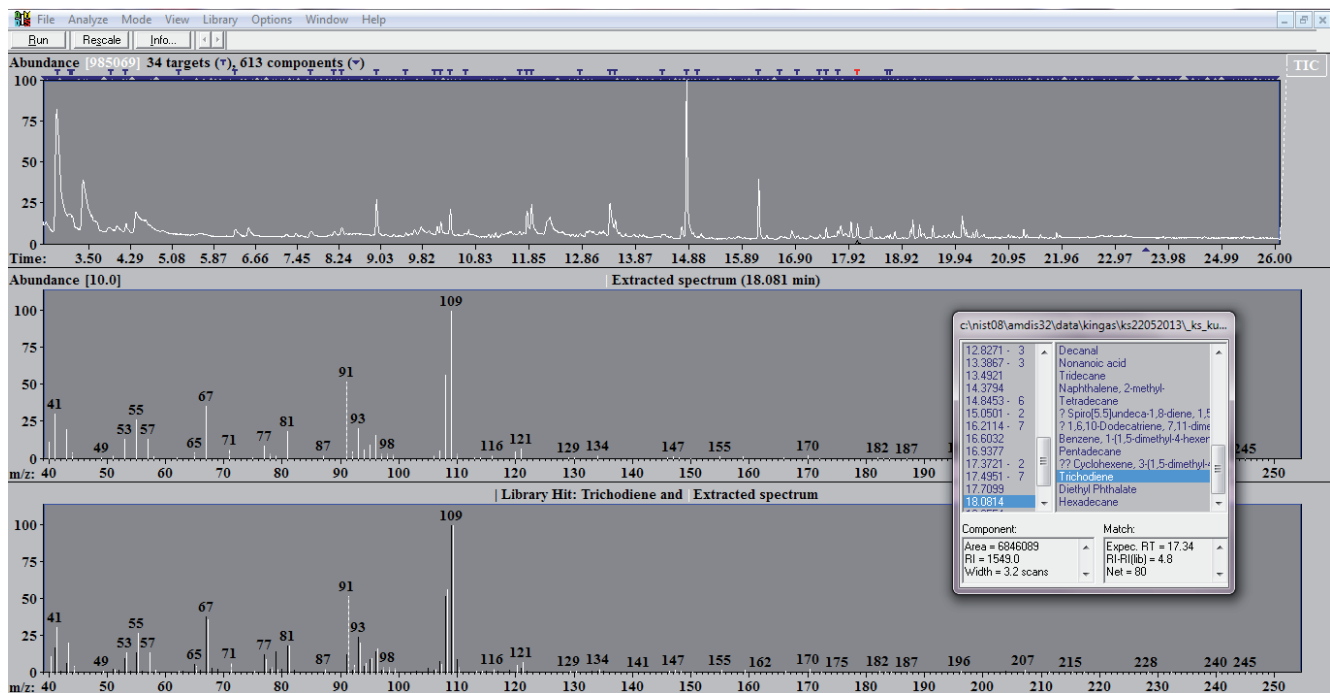


**Rysunek 1** Średnia zawartość związków lotnych (RU) z uwzględnieniem podziału na grupy związków chemicznych w próbach różnych rodzajów ściółek



◇ Sączka słoniasta    □ Słoma pszena    ○ Słoma żytnia

**Rysunek 2** Analiza funkcji dyskryminacyjnej profilu związków lotnych dla różnych rodzajów ściółek



**Rysunek 3** Przykładowy chromatogram związków lotnych zidentyfikowanych w ściółce z siewki słoniastej z wyszczególnieniem zidentyfikowanego trichodieniu

Profil związków lotnych jest charakterystyczny dla gatunku zboża, z którego słomy wykonana jest ściółka. Jest kompilacją związków lotnych będących ubocznymi metabolitami powstającymi w wyniku rozkładu składników pokarmowych znajdujących się w słomie na drodze metabolizmu mikroorganizmów ją zasiedlających oraz w wyniku procesów chemicznych zachodzących w roślinie [8]. Związek o największej sile dyskryminacyjnej to 2-metylobutanal. Jest to związek występujących w zbożach, produkowany na drodze utleniania tłuszczów przez mikroorganizmy podczas produkcji mikotoksyn. Drugi z nich, 1-heptanol, został zidentyfikowany jako produkt rozkładu kwasów tłuszczowych przez grzyby mikroskopowe. Naftalen i p-ksylen uznawane są również za związki powstające na drodze metabolizmu mikroorganizmów zasiedlających powierzchnię różnych części anatomicznych roślin zbożowych. Cymen natomiast jest związkiem produkowanym podczas przechowywania przez *C. flexuosus* *M. leucadendron* na drodze syntezy aflatoksyn. Oznaczony 2-metylnaftalen jest natomiast związkiem pochodzącym z zanieczyszczenia gleby oraz powietrza związkami powstałymi w wyniku spalania substancji ropopochodnych i bardzo często kumulowany w zbożach [9].

#### 4. PODSUMOWANIE

Uciążliwość związków odorotwórczych zależy od różnego rodzaju czynników, jak budowa łańcucha lub pierścienia węglowego, obecność wiązań nienasyconych, a także od obecności oraz rodzaju grup funkcyjnych i ich rozmieszczenia w cząsteczce. Związki o różnej budowie mogą więc charakteryzować się bardzo podobnym zapachem bądź odwrotnie. Analiza profili organicznych związków lotnych ze środowiska kurnika nie była do tej pory prowadzona w tak szczegółowy sposób. Na podstawie niniejszych badań stwierdzono, że rodzaj stosowanej ściółki może mieć istotny wpływ na poziom zanieczyszczenia środowiska kurnika grzybami mikroskopowymi, a także organicznymi związkami lotnymi produkowanymi na drodze ich metabolizmu. Obydwa elementy odgrywają istotną rolę w zachowaniu bezpieczeństwa zdrowotnego zarówno pracowników ferm, jak i zwierząt. Odory usunąć można na drodze różnego rodzaju zabiegów, takich jak np. zmiana właściwości fizykochemicznych odorów czy zastosowanie różnego rodzaju dodatków higienizacyjnych. Metody techniczne i zoohigieniczne mają za zadanie optymalizację mikroklimatu w pomieszczeniach inwentarskich oraz poprawę jakości ściółki [10-11].

Praca wykonana w ramach badań projektu NCN 2012/07/D/NZ9/00996.



## LITERATURA

- [1] Herbut E., Walczak J., Krawczyk T., Szewczyk A., Pająk T., Badania emisji odorantów z utrzymania zwierząt gospodarskich [Analyses of odorant emissions from livestock management facilities]. In: Współczesna problematyka odorów [Contemporary problems of odour management], WNT, Warszawa, 2010.
- [2] Kośmider J., Mazur-Chrzanowska B., Wyszyński B., Odory, PWN, Warszawa, 2002.
- [3] Pišteková V., Hovorka M., Večerek V., Straková E., Suchý P., The quality comparison of eggs laid by laying hens kept in battery cages and in a deep litter system. Czech J. Anim. Sci., 2006, 51, 318-325.
- [4] Sowiak M., Bródka K., Kozajda A., Buczyńska A., Szadkowska-Stańczyk I., Fungal aerosol in the process of poultry breeding quantitative and qualitative analysis. Med. Pracy, 2012, 63, 1-10.
- [5] Buśko M., Jeleń H., Góral T., Chmielewski J., Stuper K., Szwajkowska-Michałek L., Tyrakowska B., Perkowski J., Volatile metabolites in various cereal grain. Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess., 2010, 27, 1574-1581.
- [6] Morath S. U., Hung R., Bennett J. W., Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential, Fungal Biol. Rev., (2012), 26, 73-83.
- [7] Filipy J., Rumburg B., Mount G., Westberg H., Lamb B., Identification and quantification of volatile organic compounds from a dairy. Atmospheric Environ., 2008, 40, 1480-1494.
- [8] Brodhagen M., Keller N. P., Signaling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. Mol. Plant Pathol., 2006, 7(4), 85-301.
- [9] Perkowski J., Stuper K., Buśko M., Góral T., Kaczmarek A., Jeleń H., Differences in metabolomic profiles of the naturally contaminated grain of barley, oats and rye. J. of Cereal Sci., 2012, 56, 544-551.
- [10] Chen X., Schluesener H. J., Nanosilver: a nanoproduct in medical application. Toxicology Letters, 2008, 176, 1-12.
- [11] Abdi G., Salehi H., Khosh-Khui M., Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. Acta Phys. Plant., 2008, 30, 709-714.