

APARATURA

BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

Zanieczyszczenie grzybami mikroskopowymi różnych rodzajów ściółki stosowanej w kurnikach

KINGA STUPER-SZABLEWSKA¹, TOMASZ SZABLEWSKI², RENATA CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA², ANNA OSTROWSKA¹, ANNA MATYSIAK¹, JULIUSZ PERKOWSKI¹

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W POZNANIU, KATEDRA CHEMII¹,
KATEDRA ZARZĄDZANIA JAKOŚCIĄ ŻYWNOCI²**

Słowa kluczowe: ergosterol, grzyby mikroskopowe, kurnik, ściółka

STRESZCZENIE

Analizowano pod względem ilościowym i jakościowym poziom zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi 5 rodzajów ściółek pochodzących z kurników (kury nioski, stada 250-300 kur) zlokalizowanych na terenie Polski północno-zachodniej, zebranych latem 2013 r. w szczycie nieśności kur rasy Ross.

Wśród badanych ściółek najbardziej zanieczyszczona okazała się ściółka z siewki słomistej mieszanej, natomiast ściółki z trocin oraz wióry drzewne były najmniej zanieczyszczone grzybami mikroskopowymi. Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, że rodzaj materiału, z którego przygotowana jest ściółka, jest bardzo ważny nie tylko ze względu na zapewnienie dobrostanu ptakom, ale również ich bezpieczeństwa zdrowotnego związanego z narażeniem na choroby o etiologii grzybowej.

Contamination of different kind of litter by microscopic fungi from hen house

Keywords: ergosterol, litter, microscopic fungi, poultry house

ABSTRACT

Analyzed in terms of quantitative and qualitative level of contamination by microscopic fungi 5 types of litter collected from poultry houses (laying hens, flocks of hens 250-300) located on north-west Poland in the summer of 2013 at the peak of laying hens breed Ross.

Among the respondents, the most contaminated litter mulch proved to be chopped straw, and littered with sawdust and wood chips were the least contaminated by microscopic fungi. Based on the tests performed, it was found that the type of material from which the litter is prepared is very important not only because of the welfare of the birds, but also their health safety arising from exposure to the fungal disease etiology.

1. WSTĘP

Produkcja drobiarska jest obecnie najintensywniej rozwijającą się gałęzią produkcji zwierzęcej w Polsce [1]. Ptaki utrzymuje się zasadniczo w dwóch głównych przemysłowych systemach chowu, a mianowicie klatkowym oraz podłogowym. Oprócz tego wyróżnia się także chów ekologiczny oraz chów wolnowybiegowy [2]. Chów podłogowy obejmuje szereg technologii, w których ptaki mogą swobodnie przemieszczać się po powierzchni kurnika, niezależnie od tego, czy przebywają na ściółce, czy na rusztach. Utrzymanie na ściółce realizowane jest z wykorzystaniem ściółki słomistej (ze słomy pszennej, słomy żytniej, siewki słomistej mieszanej), wiórów drzewnych lub ich trocin.

Ujemną cechą tego systemu utrzymywania ptaków jest kontakt drobiu z zanieczyszczoną ściółką i odchodami, co związane jest bezpośrednio z zagrożeniem mikrobiologicznym oraz występowaniem chorób m.in. o etiologii bakteryjnej i grzybowej. Otrzymany materiał przeznaczony na ściółkę powinien być suchy, czysty, wolny od zanieczyszczeń mechanicznych i mikrobiologicznych, o znikomym zapachu oraz o dobrych właściwościach higroskopijnych [3].

W przypadku korzystnych warunków lokalnych jako ściółki stosowane są wióry z drzew liściastych, głównie z lipy, oraz wióry mieszane. Ściółka z wiórów drzewnych jest czysta, o jasnej barwie, wolna od kurzu. Odpowiednie przygotowanie ściółki polegające na odsianiu, odpyleniu i poddaniu procesowi suszenia w wysokiej temperaturze powoduje, że jest ona jednocześnie produktem czystym wizualnie oraz pozbawionym grzybów mikroskopowych (pleśni) oraz bakterii. Dodatkowo wióry drzewne bardzo dobrze neutralizują zapach amoniaku, a ponadto nie wymagają częstych dościeleń. Obornik zawierający wióry drzewne posiada bardzo małą objętość w stosunku do słomy. Przekompostowany obornik może być stosowany jako pełnowartościowy nawóz [4]. Duże zainteresowanie ściółką z wiórów drzewnych oraz znaczny popyt na nią spowodowały, że często hodowcy zmuszeni są korzystać z nieatestowanych źródeł. Wówczas wióry mogą być zanieczyszczone zarówno pod względem chemicznym (środki owadobójcze lub konserwujące), jak i mikrobiologicznym. W obydwu przypadkach zanieczyszczenia te mogą wykazywać negatywny wpływ zarówno na ptaki, jak i personel zatrudnio-

ny na fermie. Ściółka przygotowana w niewłaściwy sposób może być także źródłem pyłu respirabilnego, zwłaszcza w warunkach wysokiej temperatury i niskiej wilgotności w kurniku [5].

Rozwijające się na ściółce grzyby mikroskopowe są jednymi z wielu mikroorganizmów powszechnie występujących w środowisku kurnika. Z uwagi na intensywne stosowanie w ostatnim czasie środków bakteriobójczych [6] równowaga mikrobiologiczna w kurnikach ulega zachwianiu. W związku z tym gatunki mikroorganizmów [7], które do tej pory stanowiły niszę ekologiczną, ulegają ekspansji. Grzyby mikroskopowe stanowiące zazwyczaj ok. 15% [8, 9] wszystkich mikroorganizmów zidentyfikowanych w ściółce coraz częściej stają się gatunkami dominującymi, a ich udział w ogólnej mikroflorze wynosi nawet 35% [8, 10, 11]. Ich obecność stanowi zagrożenie zarówno dla zwierząt, jak i ludzi. Panujący w kurniku specyficzny mikroklimat sprzyja rozwojowi mikoflory; należą do niego: wysoka wilgotność względna powietrza, podwyższona temperatura, brak odpowiedniej cyrkulacji powietrza oraz bogate podłoże odżywcze 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 szereg grzybic, a ich wtórne metabolity wywołują choroby zwane mikotoksykozami [12]. Pracownicy zatrudnieni w sektorze rolniczym są narażeni na ich chorobotwórcze działanie. Kliniczna manifestacja alergii na grzyby pleśniowe obejmuje objawy ze strony układu oddechowego, narządu wzroku, skóry oraz układu pokarmowego. Drobnoustroje najczęściej przenoszone są w postaci bioareozoli (układy zawierające fazę rozpraszającą jaką jest powietrze oraz fazę rozproszoną w postaci drobnych cząstek: cieczy, kurzu pochodzenia roślinnego, zwierzęcego i mineralnego, zarodników i konidiów grzybów oraz bakterii i ich przetrwalników) [13]. Wobec zagrożeń związanych z występowaniem szkodliwych czynników biologicznych w pomieszczeniach oraz możliwości wysokiego zapylenia konieczna jest regularna jakościowa i ilościowa kontrola poziomu zapylenia oraz zanieczyszczenia mikrobiologicznego środowiska kurnika [14]. W związku z powyższym w ramach niniejszej pracy podjęto badania mające na celu porównanie poziomu zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi różnych rodzajów ściółek zebranych w tych samych warunkach utrzymywania kur niosek.

2. MATERIAŁ I METODY

Analizie mikrobiologicznej i chemicznej poddane zostało sumarycznie 60 prób pięciu rodzajów ściółki stosowanej w kurnikach znajdujących się na terenie Polski północno-zachodniej, w których utrzymywane są kury nioski w chowie fermowym półintensywnym (250-300 kur). Analizowano następujące rodzaje ściótek: sieczkę słomiastą (sieczka ze słomy mieszanej pochodzącej z pszenżyta i pszenicy) (n=15), słomę żytnią (n=12), słomę pszenną (n=15), trociny (n=10) oraz wióry drzewne z drzew liściastych (n=8). Próby pobierano wewnątrz kurników zawsze z tego samego miejsca zlokalizowanego w centrum pomieszczenia w miesiącach letnich 2013 roku w szczycie nieśności kur. Przeprowadzona została analiza: stężenia ergosterolu (ERG) jako wskaźnika poziomu zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi za pomocą HPLC oraz analiza mikrobiologiczna polegająca na oznaczeniu liczby jednostek tworzących kolonie grzybów mikroskopowych (JTK), jak również ich identyfikacja na podstawie morfologii kolonii oraz morfologii aparatów rozmnażania rodzajów grzybów mikroskopowych.

2.1 Analiza zawartości ergosterolu (ERG)

W przeprowadzonych badaniach w celu oznaczenia ilościowego mikoflory stosowano głównie zmodyfikowaną metodę oznaczania ERG opisaną szczegółowo w pracy Perkowskiego i in. [15, 16], polegającą na uwolnieniu tego metabolitu z badanego materiału biologicznego za pomocą saponifikacji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym z jednoczesną ekstrakcją. Analizę ERG prowadzono za pomocą HPLC z detektorem absorpcyjnym. Pomiar stężenia ERG następował przy długości fali $\lambda = 282$ nm przy użyciu wzorca zewnętrznego. Identyfikacja związku odbywała się na podstawie porównania czasu retencji badanego piku z czasem retencji standardu oraz poprzez dodanie do badanej próbki określonej ilości standardu i powtórny analizę. Odzysk ERG wynosił 97%, natomiast poziom wykrywalności 0,02 mg/kg.

2.2 Analiza ilościowa i jakościowa grzybów mikroskopowych

Liczbę oraz skład gatunkowy grzybów pleśniowych określono metodą rozcieńczeń płytkowych: 1 g każdej próby zawieszono w 9 ml wody peptonowej. Otrzymano rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-10} ,

0,1 ml z każdego rozcieńczenia wysiano na 3 płytki z podłożem (Róż Bengalski z chloramfenikolem). Próby inkubowano w temperaturze 25°C przez 72 godziny. Po inkubacji policzono wyrosłe kolonie i na tej podstawie obliczono liczbę grzybów w 1 g próby, wyrażając je w jednostkach JTK/g badanej próby. Izolowane szczepy grzybów oznaczono na podstawie morfologii kolonii i preparatów mikroskopowych.

3. WYNIKI I DISKUSJA

Ściółka stosowana w kurnikach powinna cechować się niskim poziomem zanieczyszczenia mikrobiologicznego ze względu na bezpieczeństwo zdrowotne zarówno kur, jak i pracowników kurników [17]. W związku z powyższym w niniejszych badaniach skupiono się na ocenie poziomu zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi i drożdżami różnych rodzajów ściółki pochodzącej z kurników. Na podstawie budowy aparatów rozmnażania oraz morfologii kolonii zidentyfikowano 12 rodzajów grzybów. Wszystkie występowały w ściółce z sieczki słomiastej (Rys. 1). Ściółki z trocin oraz wióry drzewne cechowały się najmniej zróżnicowaną mikoflorą. We wszystkich rodzajach badanej ściółki stwierdzono obecność grzybów z rodzaju *Aspergillus*, *Penicilium* oraz *Stemphylium*. Pod względem poziomu zanieczyszczenia grzybami mikroskopowymi stwierdzono, że sieczka słomiasta charakteryzuje się najwyższym poziomem liczby JTK/g (28,49 log JTK/g), jak również stężeniem ERG (605,74 mg/kg), natomiast najniższe zanieczyszczenie stwierdzono dla ściółki z wiórów drzewnych (liczby JTK/g: 3,1 log JTK/g oraz ERG: 98,22 mg/kg) (Tab. 1). Na podstawie uzyskanych wyników mikrobiologicznych oraz chemicznych stwierdzono istotne różnice między badanymi ściółkami. Analiza korelacji wykazała, że liczba JTK oraz stężenie ERG w ramach badanej populacji prób są ze sobą skorelowane w sposób wysoce istotny, a współczynnik determinacji wynosi 0,8615 (Rys. 1).

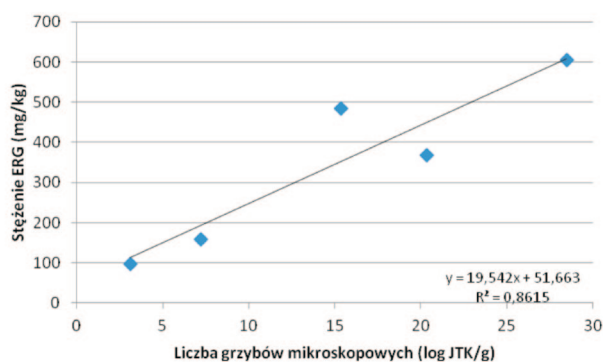
Prowadzone do tej pory badania ściótek skupione były na wpływie ich jakości na wydajność odchowu zwierząt oraz ich produktywność. W grupach kurcząt utrzymywanych na ściółce z wiórów drzewnych stwierdzono tendencję do nieco wyższych przyrostów masy ciała przy nieznanym polepszeniu wykorzystania paszy i mniejszej śmiertelności w porównaniu z kurczętami utrzymywanymi na ściółce ze słomy mieszanej [18,

19]. W podsumowaniu badań stwierdzono, że przy wykorzystaniu wiórów drzewnych jako ściółki brojlery uzyskiwały lepsze wyniki wychowu i cechowała je niższa śmiertelność, co w porównaniu do innych grup ptaków miało wpływ na istotnie wyższy wskaźnik efektywności ekonomicznej wychowu. Pietruszkiewicz [17] analizując różnego rodzaju ściółki pochodzące z kurników, w których były utrzymywane nioski (pobierane w szczycie nieśności), stwierdziła, że w ściółce z trocin występuje niewielka ilość grzybów mikroskopowych (4,78 log JTK/g), podczas gdy w ściółce ze słomy jest ich ponad 10-krotnie więcej. Witkowska i in. [9] analizowali ściółki z wiórów drzewnych oraz siewkę słomianą pochodzące z kurników, w których utrzymywane były brojlery. W próbach pobieranych w IV tygodniu odchowu stwierdzono istotne różnice w profilu grzybów mikroskopowych. Na ściółce z wiórów drzewnych dominowały gatunki *Penicilium*, *Aspergillus*, natomiast w przypadku ściółki z siewki słomianej dominowały *Fusarium*, *Penicilium Trichosporon* oraz drożdże. Sowiak i in. [3] wskazują, że wśród przebadanych rodzajów ściółek składających się z różnych rodzajów słomy (żytnia, pszenżytnia, pszena) dominowały głównie *Acremonium* oraz *Aspergillus fumigatus* i *Candida tropicalis* [20]. Uzyskane wyniki własne oraz dane innych autorów wskazują, że główną drogą zakażenia kurnika jest zakażenie poziome, czyli związane z wprowadzeniem mikroorganizmów poprzez skażoną ściółkę, paszę itd. Niniejsze wyniki analiz chemicznych i mikrobiologicznych wskazują na mniejsze za-

nieczyszczenie mikrobiologiczne ściółki z wiórów drzewnych oraz trocin. Może to być związane z występowaniem przeciwdrobnoustrojowych związków produkowanych przez drewno, należących do flawonoidów, terpenów, saponin czy alkaloidów [9]. Za właściwości przeciwgrzybiczne odpowiadają: α – piren, borneol, kamfen, kamfora, (1*R*)-*cis*-4,6,6-trimetylbicyclo [3.1.1] hept-3-en-2-on (werbenon) [21].

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że rodzajem ściółki o najmniejszym zanieczyszczeniu grzybami mikroskopowymi jest ściółka z wiórów drzewnych.

W kurniku celowe jest więc stosowanie różnego rodzaju ściółek wykonanych z surowców drzewnych, należy jednak zadbać o to, aby wykorzystywany materiał pochodził z bezpiecznego źródła i był odpowiednio przygotowany [5, 22].



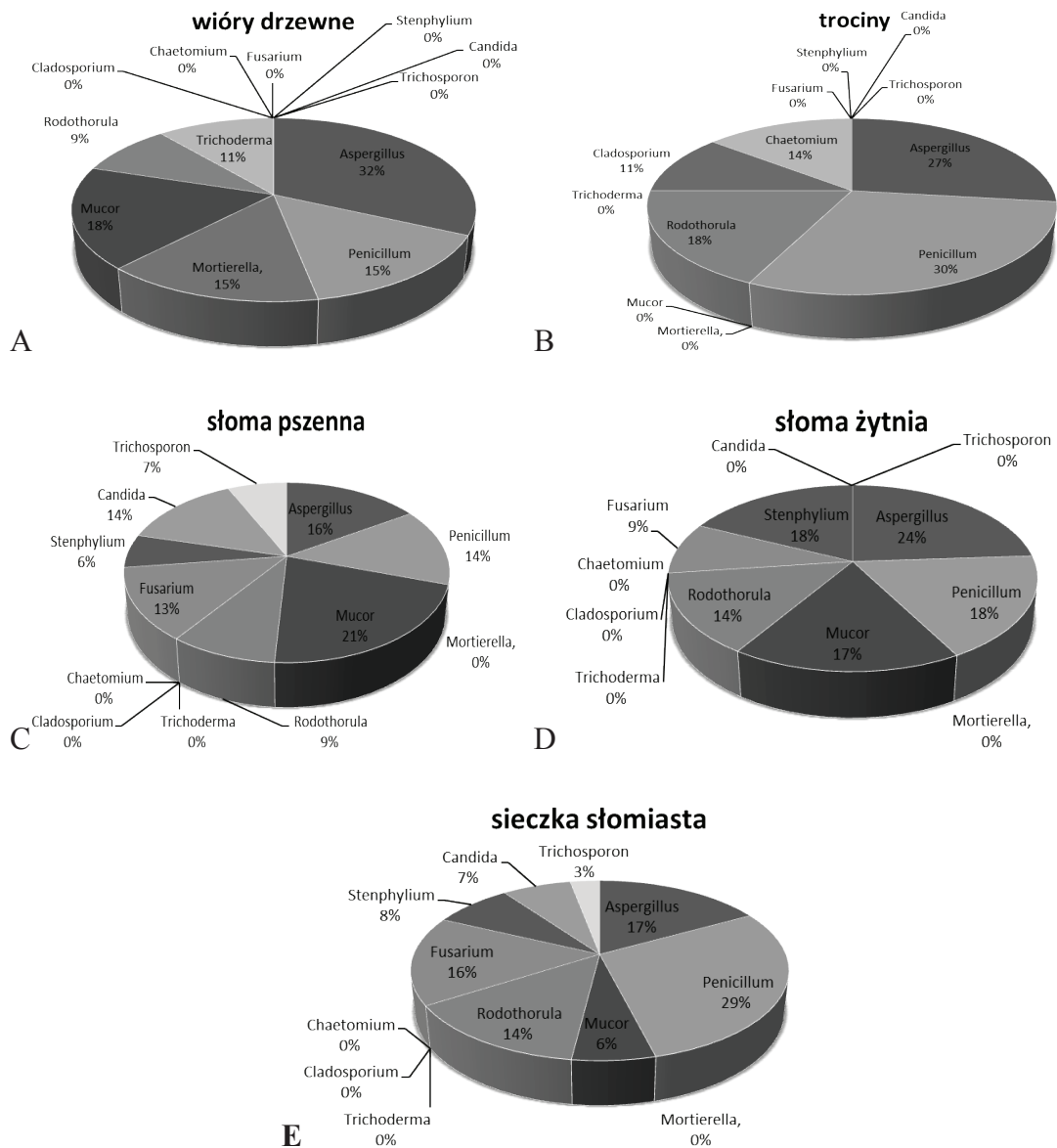
Rysunek 1 Punktowy diagram korelacji przedstawiający liniową dodatnią korelację między stężeniem ERG (mg/kg), a liczbą grzybów mikroskopowych (log JTK/g)

Figure 1 Scatter diagram showing the correlation positive linear correlation between the concentration of the ERG (mg/kg), and the number of microscopic fungi (log CFU/g)

Tabela 1 Zawartość ERG (mg/kg) oraz liczby JTK w różnych rodzajach ściółki (wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie na poziomie $p < 0,05$)

Table 1 Concentration of ERG (mg/kg) and count of colony forming units (CFU) in litter samples (the values in the columns marked with different letters are significantly different at $p < 0.05$)

Rodzaj ściółki Litter type	Liczba grzybów mikroskopowych (log JTK/g) Count of colony forming units (log CFU/g)		Stężenie ERG (mg/kg) Concentration of ERG (mg/kg)	
	Zakres Range	Średnia Mean	Zakres Range	Średnia Mean
	wióry drzewne	2,5 – 3,9	3,1 ^a	88,30 – 115,6
trocin	6,8 – 7,8	7,2 ^b	149,38 – 170,00	159,30 ^b
słoma pszena	13,6 – 18,2	15,3 ^c	451,39 – 518,09	483,70 ^c
słoma żytnia	18,7 – 21,4	20,3 ^d	341,69 – 388,92	367,22 ^c
siewka słomiana	27,1 – 29,5	28,4 ^e	569,20 – 651,29	605,74 ^d



Rysunek 2 Procentowy udział zidentyfikowanych rodzajów grzybów mikroskopowych w próbach różnych rodzajów ściótek
Figure 2 Percentage of identified types of microscopic fungi in samples of different types of litter

Badania finansowane z Grantu NCN: 2012/07/D/NZ9/00996.

LITERATURA

- [1] http://www.stat.gov.pl/cps/rde/xbcr/gus/RL_fizyczne_rozm_prod_zwierzecej_w_2012_notatka_inform.pdf.
- [2] Dobrzański Z., Dynowski Z., Jamroz D., Latała A., Mazurkiewicz M., Tronina S., Badania nad wykorzystaniem preparatu Humokarbowit w odchowie kurcząt brojlerów. Zesz. Nauk. AR Wroc. Zoot. ,39 (252), 41-48, 1994.
- [3] Sowiak M., Bródka K., Kozajda A., Buczyńska A., Szadkowska-Stańczyk I., Fungal aerosol in the process of poultry breeding – quantitative and qualitative analysis. Medycyna Pracy, 63(1), 1-10, 2012.
- [4] Kołacz R., Dobrzański Z., Higiena i dobrostan zwierząt gospodarskich. Wrocław: Wydaw. AR., 537, 2006.

- [5] Ohnson J. O., Wathes C. M., Concentrations and emission of ammonia in live-stock buildings in Northern Europe. *J. Agric. Eng. Res.* 70(1), 79-95, 1998.
- [6] Stuper-Szablewska K., Szablewski T., Ostrowska A., Matysiak A., Perkowski J., Zanieczyszczenie grzybami mikroskopowymi pomieszczeń gospodarczych na terenie Wielkopolski w 2010 roku, *ABiD* 2/2013, 161-165, 2013.
- [7] Dobrzański Z., Warunki termiczne w chowie drobiu. *Pol. Drob.*, 2, 7, 1992.
- [8] Bakutis B., Monstvilienė G., Januskeviciene G., Analyses of airborne contamination with bacteria, endotoxins and dust in livestock barns and poultry houses. *Acta Vet. Brno*, 73, 283-289, 2004.
- [9] Witkowska D., Chorąży Ł., Mituniewicz T., Makowski W., Zanieczyszczenia mikrobiologiczne ściółki i powietrza podczas odchowu kurcząt brojlerów. *Woda – Środowisko – Obszary wiejskie*, t. 10, z 2 (30), 2010, 201-210.
- [10] Budzińska K., Kluczek Sz., Kluczek J. P., Drobnoustroje powietrza podczas odchowu kurcząt brojlerów. *Zesz. Nauk. PTZ Prz. Hod.*, 36, 129-136, 1998.
- [11] Groot-Koerkamp P. W. G., Metz J. H. M., Uenk G. H., Philips V. R., Holden M. R., Sneath R. W., Short J. L., White R. P., Hartung J., Seedorf J., Schröder M., Linkert K. H., Pedersen S., Takai H., J Himathongkham S., Riemann H., Destruction of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in chicken manure by drying and/or gassing with ammonia. *FEMS Microbiol. Lett.*, 171(2), 179-182, 1999.
- [12] Dobrzański Z., Latała A., Kołacz R., Wpływ wielkości wentylacyjnej na kształtowanie chemicznych i biologicznych zanieczyszczeń powietrza w brojlerniach. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 13(1), 239-246, 1986.
- [13] Baykov B., Stoyanov M., Microbial air pollution caused by intensive broiler chicken breeding. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 29, 389-392, 1999.
- [14] http://images2.budorol.pl/images2/drob_standardy.pdf.
- [15] Perkowski J., Buśko M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Szwajkowska-Michałek L., Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia*, 63/4, 542-547, 2008.
- [16] Perkowski J., Wiwart M., Buśko M., Laskowska M., Berthiller F., Kandler W., Krska R., Fusarium toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from north-eastern Poland. *Food Add. & Contamin.*, 11 (24), 1292-1298, 2003.
- [17] Pepelinjak S., Klaric M. S., Seasonal variations of airborne fungi in continental and Mediterranean parts of Croatia. *Period. Biol.*, 107, 351-355. 2005.
- [18] Nowaczewski S., Szablewski T., Cegielska-Radziejewska T., Stuper-Szablewska K., Rudzińska M., Leśnierowski G., Kontecka H., Szulc K., Effect of housing system and eggshell colour on biochemical and microbiological characteristics of pheasant eggs. *European Poultry Science (Arch. Geflügelk.)*, 4(77), 226-233, 2013.
- [19] Sobczak J., Waligóra T., Podłoża w kurniku jako element dobrostanu. *IBMER.*, 2008.
- [20] Śliżewska K., Biernasiak J., Libudzicz Z., Probiotyki jako alternatywa dla antybiotyków. *Zeszyty Naukowe Politechniki Łódzkiej, Chemia Spożywcza i Biotechnologia*, 70, 79-91, 2006.
- [21] Maloney S. K., Heat storage, not sensible heat loss, increases in high temperature, high humidity conditions. *World's Poult. Sci. J.*, 54(4), 347-352, 1998.
- [22] Nahm K. H., Evaluation of the nitrogen content in poultry manure. *World's Poult. Sci. J.*, 59(1), 77-88, 2003.