

Zanieczyszczenie mikrobiologiczne materiałów i środowiska
zagospodarowania poubojowych odpadów drobiowych
z uwzględnieniem wrażliwości wybranych szczepów bakterii
na antybiotyki

Microbial contamination of materials and environment of the post-
slaughter poultry waste management taking into account the
sensitivity of selected bacteria strains to antibiotics

Rozprawa doktorska

Sanaa Mahdi Oraibi

Promotor – Prof. dr hab. inż. Krystyna Cybulska

Pracę wykonano w Zakładzie Chemii, Mikrobiologii
i Biotechnologii Środowiska

Szczecin 2018

ABSTRACT

The aim of the study was to examine the biodiversity of microorganisms associated with the poultry industry waste and their characteristics, both in terms of the infection size - particularly sanitary - and species composition, as well as elements of metabolic and drug resistance potential.

Studies on the size and composition of bioaerosol in the air were carried out from March 2015 to January 2016 in materials related to the management and composting of post-slaughter poultry waste. They were all located in the area of the selected plant. Measurements were taken at four research dates in various weather conditions throughout the year. The following measuring points have been selected: chemical preliminary purification and pre-treatment, liquid waste pool, platform for the preparation of materials for composting, storage site for biological sludge and composting plant. The sedimentation method was used to determine the size and composition of the air bioaerosol, and the amount of microorganisms was expressed as the number of cells capable of development in 1 m^3 ($\text{cfu}\cdot\text{m}^{-3}$) (PN-89/Z-04111/02; PN-89/Z-04111/03). Measurements of the following specimens were made: total number of mesophilic bacteria, *Pseudomonas* sp., *Clostridium* sp., *Escherichia coli* bacteria, mold, yeast, actinomycetes.

Number of bacteria from *Enterobacteriaceae* genus and pathogenic fungi in waste materials from the poultry industry at various stages of their development was determined by the method of dilutions inoculating into appropriate media. These were: post-slaughter feathers from various types of poultry (hen, duck, goose and turkey), centrifuge sludge, sediment from liquid waste pools and post-poultry compost. These materials originated from three poultry slaughterhouses located in Western Poland. Samples were collected in 2015 and 2016 at various intervals.

Study of the influence of essential oils: lemon, cedar, pine and thyme, and grapefruit seed extract (Citrosept) on the fungus *Fusarium solani* (Mart) Sacc. was made using the culture method, applying media containing a number of concentrations of individual oils. For each of them, the index of growth rate and fungistatic activity as well as morphological changes of the fungus were determined.

Evaluation of 44 *Escherichia coli* strains sensitivity to antibiotics and sulfonamides was carried out by the Kirby-Bauer diffusion method (Bauer *et al.* 1966) on Mueller-Hinton agar (MHA) medium.

As a result of the tests, air contamination with *Escherichia coli* bacteria was found in the area of post-slaughter waste. It occurred in about 65% of observations in an amount of 20 to 3047 $\text{cells}\cdot\text{m}^{-3}$ of air. The largest contamination was observed in the air of chemical pre-treatment plant. Presence of numerous bacteria was found, the amount of which was dependent on the type of research point and date. The amount of bacterial contamination ranged from 576 to 41942 $\text{cells}\cdot\text{m}^{-3}$ air. Studied locations can be arranged in the following sequence in terms of increasing contamination: the smallest in the centrifuge waste storage, medium at the pool with liquid waste, on the landfill of waste prepared for composting and composting facility, and the largest in the chemical pre-treatment building. For all the microorganisms studied, with the exception of actinomycetes, chemical pre-treatment object can be distinguished as a separate group differing in the characteristics of contamination from the others. For actinomycetes, such a group was a pool with liquid waste.

Significant air contamination with mold fungi occurred in all observations, dates and measurement points of the examined poultry waste processing facilities. It ranged from 52 to even 15728 $\text{cfu}\cdot\text{m}^{-3}$ air. Yeast was found in half of the measurements taken at all points in the

amount from 0 to 629 cfu·m⁻³ air. The researched locations can be arranged in the following way in terms of increasing fungal contamination: landfill site for waste prepared for composting, landfill site for waste from centrifuge and composting plant, liquid waste pool, chemical pre-treatment plant.

Contamination of feathers after poultry slaughter with bacteria of *Enterobacteriaceae* family is significant and falls within the limits of 10⁵ - 10¹² NPL·1g DM. The largest contamination occurred in April - May and partly also in January - November. Due to the type of feathers examined, they can be lined up (in the order of decreasing contamination) as follows: duck, chicken, turkey, geese. There were significant differences from the largest bacterial colonization in the case of slaughterhouse 1 (B) and then in descending order, slaughterhouses 3 (D) and 2 (P).

Fungal contamination was found in all tested materials, all slaughterhouses and all measurement dates. There were no unambiguous regularities of its changes during the year. It grew in the order: goose, chicken, duck, and turkey feathers. For other materials, respectively: compost, sediment, sludge from the centrifuge. The highest fungal contamination of tested materials was found in the slaughterhouse 1 (B), smaller in 2 (P) and the smallest level of contamination was recorded in the slaughterhouse 3 (D).

Thyme oil at concentrations of 0.2-2% completely inhibited development of the tested *Fusarium solani* strain. On the other hand, Citrosept at concentrations of 20-30% and lemon oil (1.45%) inhibited development of mycelium. No fungistatic effect of cedar and pine oil was found. Tested essential oils and Citrosept affected the morphological characteristics of *F. solani* strain; in the presence of forest oils, the aerial mycelium was clearly lower, and in the presence of Citrosept - higher than in the control.

The strains of *Escherichia coli* isolated in this work in almost 60% showed the resistance to tested antibiotics, whereas cases of sensitivity were found only in about 25%. The origin of strains had some influence on their reaction - isolated from the sludge, they showed greater number of resistance cases and less sensitivity to antibiotics tested.



24.04.2018

STRESZCZENIE

Celem pracy było zbadanie bioróżnorodności drobnoustrojów związanych z odpadami z przemysłu drobiarskiego oraz ich charakterystyka, zarówno pod względem wielkości zakażenia - szczególnie sanitarnego - oraz składu gatunkowego, jak też elementów potencjału metabolicznego i lekoodporności.

Badania liczebności i składu bioaerozolu w powietrzu przeprowadzono w okresie od marca 2015 roku do stycznia 2016 roku w materiałach związanych z zagospodarowaniem i kompostowaniem poubojowych odpadów drobiarskich. Wszystkie one były zlokalizowane na terenie wybranego zakładu. Pomiary wykonano w czterech terminach badawczych w różnych warunkach pogodowych w ciągu roku. Wybrano następujące punkty pomiarowe: podczyszczalnia chemiczna i wstępna obróbka, basen odpadów ciekłych, platforma przygotowań materiałów do kompostowania, składowisko osadów biologicznych oraz kompostownia. Do określania liczebności i składu bioaerozolu powietrza zastosowano metodę sedymentacyjną a ilość drobnoustrojów wyrażono jako liczbę komórek zdolnych do rozwoju w 1 m^3 ($\text{jtk}\cdot\text{m}^{-3}$) (PN-89/Z-04111/02; PN-89/Z-04111/03). Wykonano oznaczenia: ogólnej liczebności bakterii mezofilnych, bakterii *Pseudomonas sp.*, *Clostridium sp.*, *Escherichia coli*, pleśni, drożdży oraz promieniowców.

Metodą posiewu rozcieńczeń na odpowiednie pożywki wykonano oznaczenia liczebności bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae* i grzybów patogennych w materiałach odpadowych z przemysłu drobiarskiego na różnym etapie ich zagospodarowania. Były to: pióra po uboju z różnych gatunków drobiu (kurze, kaczki, gęsie i indyjskie), osad z wirówki, szlam z basenów odpadów ciekłych oraz kompost podrobiowy. Materiały te pochodziły z trzech ubojni drobiu zlokalizowanych na terenie Polski Zachodniej. Próbkę pobierano w latach 2015 i 2016 w różnych odstępach czasu.

Wpływ olejków eterycznych: cytrynowego, cedrowego, sosnowego i tymiankowego oraz ekstraktu z pestek grejpfruta (Citrosept) na grzyba *Fusarium solani* (Mart) Sacc. wykonano metodą hodowlaną, stosując pożywki zawierające szereg stężeń poszczególnych olejków. Dla każdego z nich określano indeks tempa wzrostu i aktywność fungistatyczną oraz powodowane zmiany morfologiczne grzyba.

Ocenę wrażliwość 44 szczepów *Escherichia coli* na antybiotyki i sulfonamidy przeprowadzono metodą dyfuzyjno-krażkową Kirby-Bauera (Bauer et al. 1966) na podłożu Mueller-Hinton agar (MHA).

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono skażenie powietrza bakteriami *Escherichia coli* na terenie zagospodarowania odpadów poubojowych z drobiu. Występowało ono w około 65% obserwacji w ilości od 20 do 3047 komórek $\cdot\text{m}^{-3}$ powietrza. Największe zanieczyszczeniu obserwowano w powietrzu podczyszczalni chemicznej. Stwierdzono obecność licznych bakterii których ilość zależna była od rodzaju punktu badawczego i terminu. Wielkość skażenia bakteriami wynosiła od 576 do 41942 $\text{jtk}\cdot\text{m}^{-3}$ powietrza. Badane lokalizacje można uszeregować następująco pod względem rosnącego skażenia: najmniejsze na składowisku odpadów z wirówki, średnie przy basenie z odpadami ciekłymi, na składowisku odpadów przygotowanych do kompostowania, kompostowni a największe w budynku podczyszczalni chemicznej. Dla wszystkich badanych mikroorganizmów za wyjątkiem promieniowców, można wyróżnić podczyszczalnię chemiczną jako odrębną grupę, różniącą się charakterystyką skażenia od pozostałych. Dla promieniowców taką grupą był basen z odpadami ciekłymi.

Istotne skażenie powietrza grzybami pleśniowymi występowało we wszystkich obserwacjach, terminach i punktach pomiarowych badanych obiektów przetwarzania

odpadów drobiowych. Wynosiło ono od 52 do nawet 15728 jtk·m⁻³ powietrza. Drożdże stwierdzono w połowie wykonanych pomiarów we wszystkich punktach w ilości od 0 do 629 jtk·m⁻³ powietrza. Badane lokalizacje można uszeregować następująco pod względem rosnącego skażenia grzybami: składowisko odpadów przygotowanych do kompostowania, składowisko odpadów z wirówki i kompostowni, basen z odpadami ciekłymi, podczyszczalnia chemiczna.

Zanieczyszczenie piór po uboju drobiu bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* jest znaczne i mieści się w granicach 10⁵ – 10¹² NPL·1g s.m. Największe zakażenie wystąpiło w okresie kwiecień – maj a częściowo także styczeń – listopad. Ze względu na rodzaj badanych piór można je uszeregować (w kolejności malejącego zakażenia): kaczki, kurze, indycze, gęsie. Stwierdzono znaczne różnice od największego zasiedlenia bakteriami w przypadku ubojni 1(B) a następnie w kolejności malejącej ubojni 3 (D) i 2(P).

Zakażenie grzybami stwierdzono na wszystkich badanych materiałach, we wszystkich ubojniach i terminach pomiarów. Nie wystąpiły jednoznaczne prawidłowości do jego zmian w ciągu roku. Rosło ono w kolejności: pióra gęsie, pióra kurze, pióra kaczki pióra indycze. Dla pozostałych materiałów odpowiednio: kompost, szlam, osad z wirówki. Największe zakażenie grzybami badanych materiałów stwierdzono w ubojni nr 1 (B), mniejsze w 2 (P) a najmniejszy poziom zakażenia wystąpił w ubojni 3 (D).

Olejek tymiankowy w stężeniach 0,2-2% całkowicie hamował rozwój testowanego szczepu *Fusarium solani*. Natomiast Citrosept w stężeniach 20-30% oraz olejek cytrynowy 1,45% spowalniały rozwój grzybnia. Nie stwierdzono fungistatycznego działania olejku cedrowego i sosnowego. Badane olejki eteryczne i Citrosept wpływały na cechy morfologiczne szczepu *F.solani*; w obecności olejków leśnych grzybnia powietrzna była wyraźnie niższa, a w obecności Citroseptu wyższa niż w kontroli.

Wyizolowane w niniejszej pracy szczepy *Escherichia coli* w prawie 60% wykazywały odporność na badane antybiotyki, podczas gdy przypadki wrażliwości stwierdzono jedynie około 25%. Pochodzenie szczepów miało pewien wpływ na ich reakcję – wyizolowane ze szlamu wykazywały większą ilość przypadków odporności i mniejszą wrażliwość na badane antybiotyki.

24.04.2018