

## Microbiological analysis of indoor and outdoor air on a pig farm in Slavonia

### Mikrobiološka analiza unutarnjeg i vanjskog zraka farme svinja u Slavoniji

Kristijan AUGUSTIN<sup>1,2</sup>, Irina TANUWIDJAJA<sup>1</sup>, Ivančica KOVAČEK<sup>2</sup>, Ivona MAJIĆ<sup>2</sup>, Zoran LUKOVIĆ<sup>3</sup>, Mirna MRKONJIĆ FUKA<sup>1</sup> (✉)

<sup>1</sup> University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Department of Microbiology, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> Andrija Štampar Teaching Institute of Public Health, Division of Food and Consumer Goods Microbiology, Mirogojska cesta 16, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science and Technology, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Croatia

✉ Corresponding author: [mfuka@agr.hr](mailto:mfuka@agr.hr)

Received: January 7, 2021; accepted: February 20, 2021

#### ABSTRACT

Due to a large concentration of animals living in a relatively small area, air on pig farms can be contaminated by microorganisms which can have an adverse effect on animal and human health. To determine the microbiological air quality on a pig farm in Slavonia, as well as the differences in the microbiological air quality at different distances from the farm, air was sampled at five locations at the farm (nursery room, finishing rooms 1 and 2, service room, gestation room) and four locations at a distance of 1.5, 5, 10 and 15 m from the farm in July 2019. At each location, temperature and relative humidity were measured and air for microbiological analysis was collected in quadruplicates (n=36) by impaction method. The total aerobic mesophilic bacteria (AMB), as well as yeast and mould counts were determined on blood agar and Sabouraud dextrose agar, respectively, and expressed as CFU/m<sup>3</sup>. The AMB counts in all five farm locations, as well as the yeast and mould counts in nursery and finishing room 1 exceeded the reference values of 1.05x10<sup>3</sup> CFU/m<sup>3</sup> for AMB and 4.1x10<sup>2</sup> CFU/m<sup>3</sup> for yeasts and moulds. Overall, the AMB load was significantly higher (P<0.01) in indoor when compared to the outdoor air, which was not the case with yeasts and moulds (P>0.05). In addition, the abundance of airborne AMB and yeasts and moulds decreased as the distance from the farm increased.

**Keywords:** pig farm, air quality, bioaerosols, aerobic mesophilic bacteria, yeasts and moulds

#### SAŽETAK

Zbog velike koncentracije životinja u relativno malom prostoru, zrak na farmama svinja može biti kontaminiran mikroorganizmima koji mogu štetno utjecati na zdravlje životinja i ljudi. Kako bi se odredila mikrobiološka kvaliteta zraka unutar farme svinja u Slavoniji te mikrobiološka kvaliteta vanjskog zraka s porastom udaljenosti od farme, prikupljeni su uzorci zraka na pet lokacija unutar farme (uzgajalište, toviliste 1, toviliste 2, pripustilište i čekalište) te na četiri lokacije udaljene 1,5, 5, 10 i 15 m od farme tijekom srpnja 2019. Na svakoj lokaciji izmjerene su temperatura i relativna vlažnost te su uzeti uzorci zraka metodom impakcije u četiri ponavljanja (n=36). Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (AMB) određen je na krvnom agaru, dok je ukupan broj kvasaca i plijesni određen na Sabouraud dekstroznom agaru. Dobivene vrijednosti izražene su kao CFU/m<sup>3</sup>. Broj AMB u zraku na svih pet lokacija unutar farme te broj kvasaca i plijesni u uzgajalištu i tovilistu 1 bili su viši od dozvoljenih referentnih vrijednosti od 1,05x10<sup>3</sup> CFU/m<sup>3</sup> za AMB i 4,1x10<sup>2</sup> CFU/m<sup>3</sup> za kvasce i plijesni. Broj AMB u zraku nastambi bio je značajno veći (P<0,01) u odnosu na zrak izvan farme, dok za kvasce

i plijesni nije utvrđena značajna razlika ( $P>0,05$ ) u broju. Nadalje, broj AMB te kvasaca i plijesni u zraku smanjivao se s povećanjem udaljenosti od zgrade farme.

**Ključne riječi:** farma svinja, kvaliteta zraka, bioaerosoli, aerobne mezofilne bakterije, kvasci i plijesni

## DETAILED ABSTRACT

Due to a large concentration of animals living in a relatively small area, air on pig farms can be contaminated by microorganisms which can have an adverse effect on the health of pigs and farmworkers. There is also a possibility of spreading bioaerosol from the farm to the surrounding area which can become a problem for the surrounding populace. To ascertain the microbiological air quality on a pig farm in Slavonia, as well as the differences in the microbiological air quality when moving away from the farm, five samples were taken at the pig farm (nursery room, finishing room 1, finishing room 2, service room, gestation room) and four samples were taken 1.5, 5, 10 and 15 m away from the farm in July 2019. The sampling was done by impaction, using the SAS SUPER 90 in four replications ( $n=36$ ). At the same time, the FLUKE 975V AirMeter device was used to measure the air temperature and relative humidity. Air samples were analyzed on a blood agar for the cultivation of aerobic mesophilic bacteria (AMB), as well as on Sabouraud dextrose agar for mould and yeast cultivation. The AMB count at all five farm locations was over the reference value of  $1.05 \times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup>. By moving away from the farm, a drop in the AMB count was noted. The overall AMB count in indoor air was significantly higher ( $P<0.01$ ) than in outdoor air. The yeast and mould counts at two farm locations (nursing room and finishing room 1) also did not meet the criteria prescribed by the standard and exceeded the reference value of  $4.1 \times 10^2$  CFU/m<sup>3</sup>. Just like AMB, a drop in the yeast and mold counts was noted when moving away from the farm. However, there were no significant differences ( $P>0.05$ ) in their number when comparing indoor and outdoor air. Given the increased AMB counts detected on pig farm in Slavonia and the probable emission of bacteria from the farm into the environment, it is necessary to systematically carry out microbiological air control on livestock farms in Croatia and to adopt the Ordinance on microbiological air quality criteria on livestock farms. Future research on microbiological air quality should also focus on the analysis of individual groups of microorganisms such as *Staphylococcus aureus* and the use of next-generation sequencing methods to detect more precisely microorganisms present in the bioaerosol. Such research is essential for forming standard procedures and regulations for the control of microbiological air quality on livestock farms in Croatia and evaluation of the impact of air quality on animal and human health

## UVOD

Povećana potražnja za hranom i zahtjevi potrošača utjecali su na intenziviranje stočarske proizvodnje za koju je karakterističan uzgoj velikog broja životinja u relativno malom prostoru. Ukoliko je takav uzgoj praćen neodgovarajućim prozračivanjem i higijenom prostora, stvaraju se optimalni uvjeti za razvoj različitih vrsta mikroorganizama. Mikroklima takvih prostora može biti opasna za životinje i radnike te predstavljati kritične točke odakle se mikroorganizmi, njihove spore ili hife te nusprodukti metabolizma poput endotoksina i mikotoksina, mogu širiti u obliku bioaerosola unutar farme, ali i negativno utjecati na kvalitetu zraka oko farme (Stetzenbach, 2009; Gladding i sur., 2020). Izlaganje bioaerosolima koji sadrže mikroorganizme i njihove nusprodukte može rezultirati poremećajima

dišnog sustava, infekcijama te pojavom hipersenzitivnog pneumonitisa (Yassin i Almouqatea, 2010). Osim što se prozračivanjem mikroorganizmi i ostala onečišćenja iz farme emitiraju u okoliš, što rezultira kontaminacijom vanjskog zraka (Cambra-López i sur., 2010), slučaj može biti i obrnut. Primjerice, Yassin i Almouqatea (2010) utvrdili su da je koncentracija bakterija i plijesni u vanjskom zraku veća nego u unutarnjem, što može uzrokovati imisiju onečišćenja u unutarnji prostor.

Na brojnost i raznolikost mikrobiote unutarnjeg zraka stočnih farmi utječu mnogi čimbenici poput broja životinja i ljudi, starosti objekta, načina grijanja i prozračivanja te mikroklimatskih uvjeta poput temperature i relativne vlažnosti zraka, koncentracije plinova i prašine te osvjetljenja (Karwowska, 2005). Brojna istraživanja su pokazala da je fekalna ekskrecija životinja glavni izvor

mikroorganizama u zraku stočnih farmi (Dungan, 2010; Schaeffer i sur., 2017; Tang i sur., 2020). Mikroorganizmi vrlo lako prelaze iz osušenih fekalnih čestica u aerosol strujanjem zraka ili zbog aktivnosti životinja. Ipak, postoji određeno latentno razdoblje od trenutka ekskrecije mikroorganizama do prelaska u bioaerosol (Zhao i sur., 2014). Budući da voda povezuje čestice u fekalijama i onemogućuje njihovu emisiju u zrak, mikroorganizmi iz osušenih fekalija s niskim sadržajem vode brže prelaze u bioaerosole od mikroorganizama iz svježih fekalija. Duan i sur. (2009) su otkrili sličnost između bakterija *E. coli* izdvojenih iz fecesa svinja i onih prisutnih u zraku farmi, a iste sojeve detektirali su i izvan farme u smjeru puhanja vjetra.

Mikroorganizmi u zraku farmi mogu potjecati i iz sluznice dišnih organa životinja, odakle dopijevaju disanjem, kašljanjem i kihanjem. Iako su Hermann i sur. (2008) detektirali bakterije *Mycoplasma hyopneumoniae* i *Bordetella bronchiseptica* te viruse na sluznici gornjeg dijela respiratornog trakta zaraženih svinja, u izdahnutom zraku detektirali su samo bakterije *Mycoplasma hyopneumoniae* i *Bordetella bronchiseptica*, što pokazuje da nisu svi mikroorganizmi sluznice gornjeg respiratornog trakta podložni aerosolizaciji te da ona predstavlja manje značajan izvor bioaerosola od fekalija.

Osim životinja, njihova hrana, naročito žitarice, može biti supstrat i prijenosnik mikroorganizama. Krmiva sadrže raznoliku mikrobiotu podrijetlom iz različitih izvora okoliša poput tla, prašine, vode i kukaca (Maciorowski i sur., 2007) koja tijekom hranjenja dopijeva u stajski zrak. Izbor hrane može jako utjecati na pojavu bioaerosola na farmama. Uporabom tekuće ili mokre hrane smanjuje se rizik od oboljenja dišnog sustava svinja zbog smanjenja prašine, a samim time i koncentracije mikroorganizama u zraku koji potječu iz suhe hrane (Uremović i Uremović, 1997; Brooks i sur., 2001).

Kako rastu, svinjama se mijenja fiziologija, a time i nutritivne i mikroklimatske potrebe, pa se mijenja i način njihova držanja, njege i higijene. Farme se stoga dijele u više zatvorenih i odvojenih proizvodnih cjelina koje mogu biti smještene u posebnim nastambama ili u zajedničkoj

nastambi gdje su međusobno prostorno odvojene (Uremović i Uremović, 1997). Spomenute cjeline uključuju pripustilište u koje se smještaju krmače nakon odbijanja prasadi te nazimice koje su pokazale znakove estrusa, čekalište za suprasne krmače i nazimice, prasilište za krmače i sisajuću prasad, uzgajalište za prasad iz prasilišta nakon odbijanja od krmače te tovilistište za tov svinja do 100 kg.

S obzirom na to da tov svinja počinje ulazom prasadi tjelesne mase 20-30 kg (u prosjeku 25 kg), prostor u tovilistištu se, često iz ekonomskih razloga, dijeli na dio za predtov svinja od 25-60 kg (tovilistište 1) i prostor za tov svinja iznad 60 kg (tovilistište 2) (Uremović i Uremović, 1997). Svaki od tih prostora može imati specifične mikroklimatske uvjete i biti različito opterećen mikroorganizmima u zraku (Kim i Ko, 2019).

Budući da na farmama s velikim brojem životinja u malom prostoru raste i rizik od kontaminacije zraka mikroorganizmima (Baykov i Stoyanov, 1999; Smit i Heederik, 2017; Gladding i sur., 2020), potrebno je kontinuirano pratiti njegovu kvalitetu i primijeniti prikladne mjere ukoliko se posumnja na kontaminaciju. U Republici Hrvatskoj trenutno ne postoji standardna regulativa koja propisuje dozvoljen broj mikroorganizama u zraku stočnih farmi što predstavlja vrlo velik problem u mikrobiološkoj kontroli kvalitete zraka. Prema Pavić i sur. (2001), prije uvođenja Pravilnika o dobroj proizvođačkoj praksi (NN 71/1999), u Hrvatskoj nisu postojali standardi ili propisi o mikrobiološkoj kvaliteti zraka. S obzirom na to da se spomenuti Pravilnik odnosi isključivo na regulative mikrobioloških kriterija u proizvodnji lijekova i drugih medicinskih pripravaka, i dalje postoji potreba za izradom kriterija mikrobiološke kvalitete zraka u drugim djelatnostima. Budući da u Hrvatskoj ne postoji standardna regulativa za dozvoljen broj mikroorganizama u zraku pojedinih grana djelatnosti, za interpretiranje rezultata najčešće se koriste strani standardi.

Cilj ovog rada je odrediti mikrobiološku kvalitetu zraka unutar farme svinja u Slavoniji te vanjskog zraka na različitim udaljenostima od farme. Na temelju rezultata istraživanja bit će utvrđeno zasićenje zraka stočne

farme u Slavoniji mikroorganizmima te određen njegov potencijalni utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. Također, bit će uspoređene pojedine lokacije unutar farme i detektirani prostori unutar farme koji predstavljaju najveći mikrobiološki rizik. Istraživanje će doprinijeti izradi standardne regulative, tj. Pravilnika za dozvoljen broj mikroorganizama u zraku stočnih farmi koji još uvijek ne postoji u Republici Hrvatskoj.

## MATERIJALI I METODE

### Opis farme

Uzorci zraka prikupljeni su na farmi svinja u Slavoniji (Tovarnik) u srpnju 2019. godine. Farma je intenzivnog i zatvorenog načina uzgoja u kojemu je svaka proizvodna cjelina odvojena zidovima. Prozračivanje je mehaničkog tipa. U vrijeme uzorkovanja na farmi je bilo 1200 hibridnih svinja, od kojih 200 krmača, dobivenih prema uzgojnom programu tvrtke Choice Genetics. Broj životinja u svakoj proizvodnoj cjelini bio je kako slijedi: uzgajalište (n=385), tovalište 1 (n=340), tovalište 2 (n=280), pripustilište (n=58) i čekalište (n=90). Pod u cijeloj farmi bio je betonski rešetkasti, osim u uzgajalištu (plastificirano željezo s perforacijama), bez uporabe stelje.

### Uzorkovanje vanjskog i unutarnjeg zraka

Zrak je uzorkovan u razni biozone životinja na pet spomenutih lokacija unutar farme (uzgajalište, tovalište 1, tovalište 2, pripustilište i čekalište) te na 1,5 m visine na četiri lokacije udaljene 1,5, 5, 10 i 15 m od farme. Za uzorkovanje unutarnjeg i vanjskog zraka korišten je uređaj SAS Super 90 (International PBI, Milano, Italija). Mjereni volumen zraka (100-200 L) je usisan pri protoku 90 L/min kroz uređaj koji je prethodno dezinficiran etanolom (75%), pri čemu se mikroorganizmi iz zraka zadržavaju na pločama s odgovarajućem hranjivim medijem. Za određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija (AMB) korišten je krvni agar (KA; Oxoid, Basingstoke, Ujedinjeno Kraljevstvo), a za određivanje ukupnog broja kvasaca i plijesni Sabouraud dekstrozni agar (SAB; Oxoid, Basingstoke, Ujedinjeno Kraljevstvo). Po lokaciji, prikupljene su četiri selektivne ploče za određivanje broja AMB (n=36) te četiri ploče za kvasce i plijesni (n=36).

Selektivne ploče (n=4) korištene za uzorkovanje, bile su postavljene dijametralno suprotno te međusobno udaljene oko 1,5 m. Uzorci su dostavljeni u Laboratorij za mikrobiološku analizu zraka Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar pri 4 °C te su odmah analizirani.

### Mjerenje temperature i vlage

Temperatura i relativna vlažnost zraka izmjerene su uređajem Fluke 975V AirMeter™ (Fluke Corporation, Everett, SAD) u nastambama (uzgajalište, tovalište 1, tovalište 2, pripustilište i čekalište) kao i izvan farme na udaljenosti od 1,5 m od zgrade, a prije i poslije svakog uzorkovanja zraka.

### Određivanje ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija te kvasaca i plijesni

Ukupan broj AMB određen je prema HRN EN 13098:2008 normi (Hrvatski zavod za norme, 2008), a ukupan broj kvasaca i plijesni prema ISO 16000-17:2011 standardu (Internacionalna organizacija za standardizaciju, 2011). Sve ploče su inkubirane pri 25±3°C tijekom dva dana za AMB i pet dana za kvasce i plijesni. Nakon inkubacije su izbrojane pojedinačne kolonije. Ukupan broj AMB te kvasaca i plijesni izračunat je prema formuli:

$$C_i = n_{CFU} / V_i$$

gdje je  $C_i$  koncentracija mikroorganizama,  $n_{CFU}$  ukupan broj CFU na svim pločama (n=4) i  $V_i$  ukupan volumen uzorka zraka [m<sup>3</sup>]. Broj AMB, kvasaca i plijesni je izražen kao CFU/m<sup>3</sup> zraka. Referentna vrijednost za obje skupine mikroorganizama (AMB i gljivice) određena je prema portugalskom standardu (Diario da Republica 235, 2013). Referentna vrijednost za AMB u unutarnjem zraku definirana je kao vrijednost AMB detektiranih na kontrolnoj lokaciji kojoj se pribroji vrijednost od 350 CFU/m<sup>3</sup> bakterija, dok broj kvasaca i plijesni u unutarnjem zraku mora biti niži od njihovog broja u vanjskom zraku kontrolnog uzorka. Prema portugalskom standardu (Diario da Republica 235, 2013) kontrolni uzorak dobiven je uzorkovanjem zraka na udaljenosti 1,5 m od zgrade farme.

### Statistička analiza

Za izračun srednjih vrijednosti i standardne devijacije te testiranje razlika između temperature i relativne vlažnosti zraka, ukupnog broja AMB, kvasaca i plijesni u unutarnjem i vanjskom zraku korišteno je R okruženje (R Development Core Team, 2008). Obzirom na to da navedeni parametri nisu odstupali od normalne distribucije, za utvrđivanje značajnih razlika korišten je t-test. Razlike su smatrane značajnima ako je  $P < 0,05$ .

### REZULTATI I DISKUSIJA

Prema Uremović i Uremović (1997) temperatura i relativna vlažnost zraka su najvažniji čimbenici mikroklimе koji utječu na rast, kvalitetu proizvoda i rezultate razmnožavanja svinja. Istovremeno, značajno utječu i na razvoj pojedinih skupina mikroorganizama (Held i sur., 2005; Hwang i Yoon, 2017).

Temperatura u nastambi može jako varirati i kretati se od kritičnih do optimalnih. Raspon zone optimalne temperature varira ovisno o dobi i tjelesnoj masi svinja, intenzitetu hranidbe i načinu držanja (Uremović i Uremović, 1997) dok se optimalne vrijednosti relativne vlažnosti zraka kreću između 65-70% za odrasle svinje i 50-60% za prasad.

Temperatura zraka na farmi u ovom istraživanju kretala se između 22,5-25,3°C i neznatno je varirala za razliku od relativne vlažnosti zraka (Tablica 1). Temperatura vanjskog zraka je bila značajno niža ( $P < 0,01$ ) od srednje vrijednosti temperature izmjerene u farmi. Najniže vrijednosti temperature zabilježene su u tovilištu 2 (22,5°C), a najviše u tovilištu 1 (25,3°C) gdje prelaze zonu komfora životinja od šestog tjedna uzgoja prema Uremović i Uremović (1997).

Najviša vrijednost relativne vlažnosti zraka je izmjerena u uzgajalištu (73,4%), a najniža u čekalištu (65,2%). Utvrđene vrijednosti relativne vlažnosti zraka nešto su više od optimalnih vrijednosti za prasad te u rasponu koji je optimalan za odrasle svinje. Nije bilo značajne razlike između relativne vlažnosti vanjskog zraka i unutar objekata na farmi ( $P > 0,05$ ).

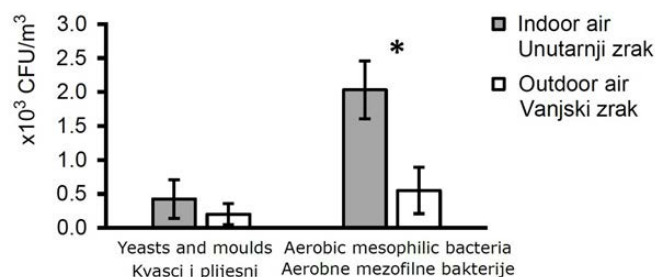
**Table 1.** Temperature and relative humidity of indoor and outdoor air at a pig farm. The values are shown as the arithmetic mean  $\pm$  standard deviations.

**Tablica 1.** Temperatura i relativna vlažnost unutarnjeg i vanjskog zraka na svinjogojskoj farmi. Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija

| Location                        | Temperature      | Relative humidity            |
|---------------------------------|------------------|------------------------------|
| Lokacija                        | Temperatura [°C] | Relativna vlažnost zraka [%] |
| Nursery room<br>Uzgajalište     | 24,2 $\pm$ 0,00  | 73,4 $\pm$ 0,00              |
| Finishing room 1<br>Tovilište 1 | 25,3 $\pm$ 0,00  | 71,7 $\pm$ 0,00              |
| Finishing room 2<br>Tovilište 2 | 22,5 $\pm$ 0,00  | 67,6 $\pm$ 0,00              |
| Service room<br>Pripustilište   | 23,4 $\pm$ 0,00  | 67,7 $\pm$ 0,00              |
| Gestation room<br>Čekalište     | 23,5 $\pm$ 0,00  | 65,2 $\pm$ 0,00              |
| Outdoor air<br>Vanjski zrak     | 20,1 $\pm$ 0,01  | 70,7 $\pm$ 0,00              |

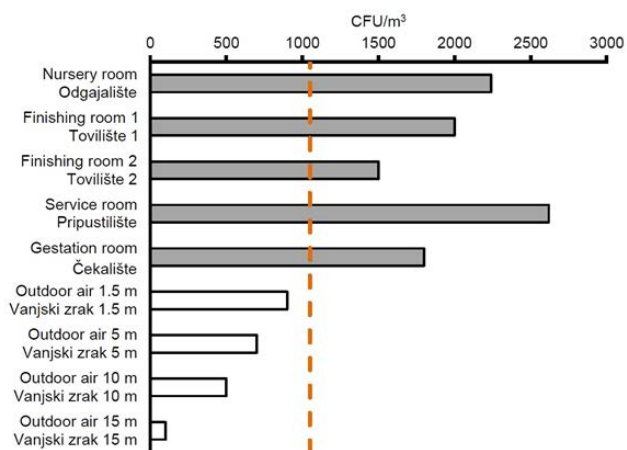
Od bioaerosola u ovom istraživanju prevladavaju bakterije, čiji je prosječan broj u zraku farme iznosio (2,03 $\pm$ 0,4) $\times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup>, dok je prosječan broj kvasaca i plijesni bio gotovo deset puta niži i iznosio (4,23 $\pm$ 2,8) $\times 10^2$  CFU/m<sup>3</sup> (Slika 1).

Koncentracija svih mikroorganizama bila je veća u blizini farme i smanjivala se s porastom udaljenosti od same zgrade (Slike 1 i 2).



**Figure 1.** The average total counts of yeasts, moulds, and aerobic mesophilic bacteria in indoor and outdoor air at a pig farm. The values are shown as the arithmetic mean  $\pm$  standard deviations. Asterisks indicates significant difference ( $P < 0,01$ )

**Slika 1.** Ukupan broj kvasaca, plijesni i AMB u unutarnjem i vanjskom zraku svinjogojske farme. Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Zvezdica označava značajnu razliku ( $P < 0,01$ )



**Figure 2.** The total counts of aerobic mesophilic bacteria (arithmetic mean) in indoor and outdoor air at a pig farm. Locations, where the bacteria counts exceed the reference value, are marked grey, while those in white are within the reference value. Orange dashed line represents the reference value of  $1,05 \times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup>

**Slika 2.** Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (aritmetička sredina) u unutarnjem i vanjskom zraku svinjogojske farme. Lokacije gdje broj bakterija prelazi referentnu vrijednost su označene sivo, dok su lokacije unutar referentne vrijednosti označeno bijelo. Narančasta isprekidana linija predstavlja referentnu vrijednost od  $1,05 \times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup>

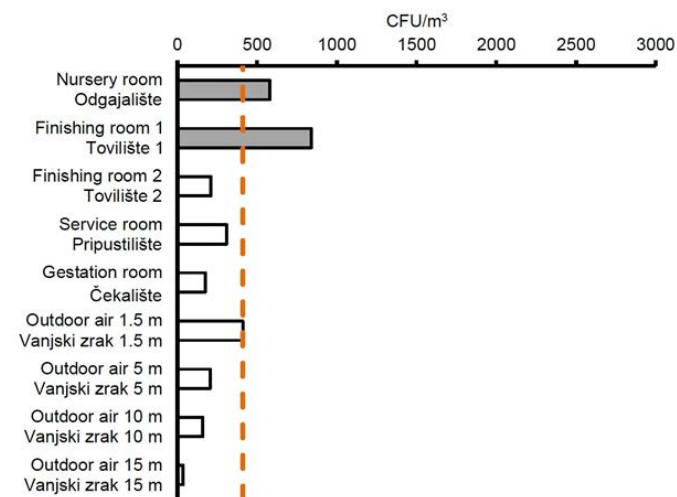
Iako je najveći broj AMB utvrđen u pripustilištu ( $2,62 \times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup>), a najmanji u zraku tovilišta 2 ( $1,5 \times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup>), razlike u broju AMB između nastambi nisu statistički značajne ( $P > 0,05$ ).

Na svih pet lokacija unutar farme ukupan broj AMB u zraku prelazio je izračunatu referentnu dozvoljenu vrijednost definiranu portugalskim standardom Diario da Republica 235 (2013) od  $1,05 \times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup> te, također, vrijednost od  $10^3$  CFU/m<sup>3</sup> koliko iznose predložene smjernice za koncentraciju bioaerosola koje su predložili Drew i sur. (2009).

U vanjskom zraku povećanjem udaljenosti od farme evidentno je smanjenje broja AMB kojih je bilo najviše na 1,5 m od farme ( $9 \times 10^2$  CFU/m<sup>3</sup>), a najmanje na udaljenosti od 15 m od farme ( $1 \times 10^2$  CFU/m<sup>3</sup>) (Slika 2).

Sličan trend smanjivanja broja s povećanjem udaljenosti od farme je uočen i kod kvasaca i plijesni, dok je njihov povećan broj bio detektiran samo na dvije lokacije unutar farme (Slika 3). Prema korištenom standardu (Diario da Republica 235, 2013), izračunata referentna vrijednost za kvasce i plijesni iznosi  $4,1 \times 10^2$

CFU/m<sup>3</sup> i ta je vrijednost premašena u uzgajalištu u kojem je detektirano  $5,8 \times 10^2$  CFU/m<sup>3</sup> te tovilištu 1 u kojem je detektirano  $8,4 \times 10^2$  CFU/m<sup>3</sup> kvasaca i plijesni, što se može povezati s prekomjernom vlagom zraka utvrđenoj u vrijeme uzorkovanja u ovim nastambama (Tablica 1). Na ostalim lokacijama unutar farme kao i u vanjskom zraku broj kvasaca i plijesni je bio niži od referentne vrijednosti.



**Figure 3.** The total counts of yeasts and moulds (arithmetic mean) in indoor and outdoor air at a pig farm. Locations, where yeast and mould counts exceed the reference value, are marked grey, while those within the reference value are marked white. Orange dashed line represents predicted reference value of  $4,1 \times 10^2$  CFU/m<sup>3</sup>

**Slika 3.** Ukupan broj kvasaca i plijesni (aritmetička sredina) u unutarnjem i vanjskom zraku svinjogojske farme. Lokacije gdje broj kvasaca i plijesni prelazi referentnu vrijednost označene su sivo, dok su mjerne lokacije gdje je broj kvasaca i plijesni unutar referentnih vrijednosti označene bijelo. Narančasta isprekidana linija predstavlja izračunatu referentnu vrijednost od  $4,1 \times 10^2$  CFU/m<sup>3</sup>

Značajne razlike između ukupnog broja mikroorganizama u unutarnjem i vanjskom zraku nisu utvrđene za kvasce i plijesni ( $P > 0,05$ ), dok je ukupan broj AMB bio značajno veći unutar farme ( $P < 0,01$ ) (Slika 1).

Rezultati mikrobioloških analiza dobiveni u ovom istraživanju djelomično su u skladu s istraživanjima ostalih autora. Iako su u ovom radu zabilježene vrijednosti ukupnog broja AMB iznad referentnih vrijednosti, one su i dalje niže nego u većini istraživanja gdje se broj AMB kreće u rasponu od  $10^4$  do  $10^6$  CFU/m<sup>3</sup> (Chang i sur., 2001; Hađina i sur., 2004; Karwowska, 2005; Kim i sur., 2008; Ostović i sur., 2009; Popescu i sur., 2014).

Analizom mikrobiološke kvalitete unutarnjeg i vanjskog zraka dviju svinjogojskih farmi tijekom hladnog (siječanj-veljača) i toplog razdoblja godine (svibanj-lipanj) Popescu i sur. (2014) su na obje farme utvrdili evidentno veći broj AMB tijekom hladnog razdoblja. Manji broj mikroorganizama u toplom razdoblju autori pripisuju jačem prozračivanju u cilju snižavanja temperature prostora, što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja, ali ujedno ističu da jače prozračivanje može uzrokovati veću emisiju mikroorganizama u okoliš. Nadalje, iako stelja pozitivno utječe na dobrobit životinja, sadržaj bioaerosola u zraku veći je u nastambi sa steljom nego u onoj bez stelje (Zhao i sur., 2014), što također može biti razlog nižim vrijednostima broja AMB zabilježenih u našem istraživanju budući da su životinje na farmi svinja u Slavoniji uzgajane bez stelje.

Na mikrobiološku kvalitetu zraka na stočnim farmama mogu utjecati brojni drugi čimbenici. Tako Popescu i sur. (2014) navode neispravne sustave za prozračivanje, visok sadržaj vlage krmiva, nepravilnu higijenu i neprikladne klimatske uvjete kao uzroke kontaminacije zraka u nastambama za svinje te ističu da učinkovito prozračivanje omogućuje održavanje razine kontaminacije zraka ispod kritičnih vrijednosti koje mogu biti prijetnja zdravlju ljudi i životinja, ali istovremeno mogu značajno utjecati na kvalitetu zraka oko farme. Kim i Ko (2019), s druge strane, su utvrdili da je broj mikroorganizama u zraku najveći ljeti, potom u proljeće, zimu i jesen, a kao mogući razlog navode povišenu temperaturu u ljetnom razdoblju koja je optimalna za razmnožavanje bakterija. Također, isti autori (Kim i Ko, 2019) su tijekom sva četiri godišnja doba na istraživanim farmama svinja u Koreji, detektirali najveću koncentraciju zrakom prenosivih bakterija u tovilištu, nakon kojih slijedi uzgajalište i konačno čekalište. Primijećeno pripisuju razlikama u fazi rasta i aktivnosti svinja. Svinje su najveće i najaktivnije u fazi tova, dok je u čekalištu zbog načina držanja u pojedinačnim odjeljcima gravidnim svinjama onemogućeno kretanje. Navedeno može utjecati na stvaranje i podizanje aerosola te se najviše koncentracije očekuju u tovilištu gdje je aktivnost svinja najveća. Iako je u ovom istraživanju najveći broj

kvasaca i plijesni zabilježen u tovilištu i uzgajalištu kao i u radu Kim i Ko (2019), najveći broj AMB je zabilježen u pripustilištu. Međutim, razlike u broju AMB između nastambi u ovom istraživanju nisu bile statistički značajne.

Iako ne postoje jasni literaturni podaci o učinku AMB na zdravlje ljudi i životinja u slučaju prekoračenja referentnih vrijednosti (Drew, 2009), velik broj bakterija može imati negativan utjecaj na zdravlje svinja i radnika. Prema poljskom Pravilniku o mikrobiološkoj kvaliteti zraka (PN-89/Z-04111.02, 1989) vrijednosti AMB od  $1-3 \times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup> predstavljaju srednje onečišćenje, a iznad  $3 \times 10^3$  CFU/m<sup>3</sup> jako onečišćenje zraka s posljedičnim utjecajem na zdravlje ljudi i životinja. Prema tome, u ovom istraživanju, zrak u farmi svinja je srednje jako onečišćen AMB, što može ukazivati na neodgovarajuće prozračivanje i/ili higijenu prostora i potencijalni rizik za zdravlje životinja i ljudi. Osim ukupnog broja bakterija, vrlo važan indikator mikrobnog onečišćenja zraka su i *Staphylococcus* vrste, naročito *Staphylococcus aureus*, budući da najnovija istraživanja pokazuju da su kultivabilni stafilocoki dobar indikator emisije i mikrobiološke kvalitete zraka na farmama pilića i svinja (Gladding i sur., 2020). Pored zdravstvenih problema koje predstavlja patogen kao što je *Staphylococcus aureus*, poseban problem je visoka stopa antibiotske rezistencije ove vrste što može doprinijeti njenoj učestalosti i perzistenciji na samoj farmi, ali i okolišu oko farme.

Iako je u našem istraživanju broj kvasaca i plijesni bio iznad referentne vrijednosti samo na dvije lokacije na farmi ( $5,8 \times 10^2$  CFU/m<sup>3</sup> u uzgajalištu i  $8,4 \times 10^2$  CFU/m<sup>3</sup> u tovilištu 1), taj broj je ispod većine detektiranih vrijednosti u literaturi. Koncentracija kvasaca i plijesni zabilježenih u zraku u ostalim istraživanjima, u prosjeku iznosi između  $10^3$  do  $10^5$  CFU/m<sup>3</sup> (Hađina i sur., 2004; Ostović i sur., 2009; Popescu i sur., 2014). Prema poljskom Pravilniku o mikrobiološkoj kvaliteti zraka (PN-89/Z-04111.03, 1989) vrijednosti ispod  $10^3$  CFU/m<sup>3</sup> mikroskopskih gljiva predstavljaju u prosjeku čisti zrak bez opasnosti za ljudsko zdravlje.

## ZAKLJUČCI

Kvaliteta zraka u zatvorenom prostoru strogo je povezana sa zdravljem ljudi i životinja. S obzirom na povećan broj AMB detektiran na farmi svinja u Slavoniji te vjerojatnu emisiju bakterija s farme u okoliš, nužno je sustavno provoditi mikrobiološku kontrolu zraka na stočnim farmama u Republici Hrvatskoj te donijeti Pravilnik o kriterijima za mikrobiološku kvalitetu zraka na stočnim farmama. Buduća istraživanja mikrobiološke kvalitete zraka trebala bi također biti usmjerena na analize pojedinih skupina mikroorganizama poput vrste *Staphylococcus aureus* te korištenje metoda sekvenciranja sljedeće generacije kojima bi se preciznije detektirali mikroorganizmi prisutni u bioaerosolu. Tek temeljem budućih saznanja moći će se odrediti standardni postupci i regulative za kontrolu mikrobiološke kvalitete zraka na stočnim farmama te evaluirati utjecaj kvalitete zraka na zdravlje životinja i ljudi.

## POPIS LITERATURE

- Baykov, B., Stoyanov, M. (1999) Microbial air pollution caused by intensive broiler chicken breeding. *FEMS Microbiology Ecology*, 29 (4), 389-392.  
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00629.x>
- Brooks, P., Beal, J., Niven, S. (2001) Liquid feeding of pigs: potential for reducing environmental impact and for improving productivity and food safety. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, 13, 49-63. [Online] Available at: <http://livestocklibrary.com.au/bitstream/handle/1234/19960/49-PDF;jsessionid=319B11A5580DD315AFD37E27A71B795E?sequence=1> [Accessed 16 November 2020].
- Cambra-López, M., Aarnink, A.J.A., Zhao, Y., Calvet, S., Torres, A.G. (2010) Airborne particulate matter from livestock production systems: a review of an air pollution problem. *Environmental Pollution*, 158 (1), 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.011>
- Chang, C.W., Chung, H., Huang, C.F., Su, H.J. (2001) Exposure of workers to airborne microorganisms in open-air swine houses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (1), 155-161.  
DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.155-161.2001>
- Drew, G., Deacon, L., Pankhurst, L., Pollard, S.J., Tyrrel, S. (2009) Guidance on The Evaluation of Bioaerosol Risk Assessment for Composting Facilities. Published by The Environmental Agency. Cranfield, Bedford, Ujedinjeno Kraljevstvo.
- Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., Yao, M., Schlenker, G. (2009) Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental Research*, 109 (5), 511-517.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>
- Dungan, R.S. (2010) Board-invited review: fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. *Journal of Animal Science*, 88 (11), 3693-3706.  
DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3094>
- Gladding, T.L., Rolph, C.A., Gwyther, C.L., Kinnersley, R., Walsh, K., Tyrrel, S. (2020) Concentration and composition of bioaerosol emissions from intensive farms: pig and poultry livestock. *Journal of Environmental Management*, 272, 111052.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111052>
- Hadina, S., Vučemilo, M., Tofant, A., Matković, K. (2004) Sastav mikrobne flore zraka u odgajalištu svinjogojske farme. *Stočarstvo*, 58 (4), 243-249.
- Held, B.W., Jurgens, J.A., Arenz, B.E., Duncan, S.M., Farrell, R.L., Blanchette, R.A. (2005) Environmental factors influencing microbial growth inside the historic expedition huts of Ross Island, Antarctica. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55 (1), 45-53.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.06.011>
- Hermann, J.R., Brockmeier, S.L., Yoon, K.-J., Zimmerman, J.J. (2008) Detection of respiratory pathogens in air samples from acutely infected pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72 (4), 367-370. [Online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2442681/> [Accessed 16 November 2020].
- Hwang, S.H., Yoon, C. (2017) Main environmental factors affecting concentrations of culturable airborne bacteria in indoor laboratories over a period of one year. *Applied Ecology and Environmental Research*, 15 (1), 321-333.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1501\\_321333](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1501_321333)
- HZN (2008) Workplace atmosphere – Guidelines for measurement of airborne microorganisms and endotoxin (HRN EN 13098:2008). Zagreb: Croatian Standards Institute.
- ISO (2011) Indoor air - Part 17: Detection and enumeration of moulds – Culture-based method (16000-17:2011, IDT ISO 16000- 17:2008). Geneva: International Organization for Standardization.
- Karwowska, E. (2005) Microbiological air contamination in farming environment. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14 (4), 445-449. [Online] Available at: <http://www.pjoes.com/Microbiological-Air-Contamination-in-Farming-Environment,87779,0,2.html>. [Accessed 16 November 2020].
- Kim, K.Y., Ko, H.J. (2019) Indoor distribution characteristics of airborne bacteria in pig buildings as influenced by season and housing type. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32 (5), 742-747.  
DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0415>
- Kim, K.Y., Ko, H.J., Kim, H.T., Kim, C.N., Kim, Y.S. (2008) Assessment of airborne bacteria and fungi in pig buildings in Korea. *Biosystems Engineering*, 99 (4), 565-572.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2007.12.006>
- Maciorowski, K.G., Herrera, P., Jones, F.T., Pillai, S.D., Ricke, S.C. (2007) Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Animal Feed Science and Technology*, 133(1), 109-136.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.08.006>
- Ministérios do Ambiente, Ordenamento do Território e Energia, da Saúde e da Solidariedade, Emprego e Segurança Social (2013) Diário da Republica n.º 235/2013, 1º Suplemento, Serie I de 2013-12-04. Lisboa: Diário da Republica (Quarta-feira, 4 de dezembro de 2013, Número 235). [Online] Available at: <https://dre.pt/application/conteudo/136349> [Accessed 16 November 2020].
- Narodne novine (1999) Pravilnik o dobroj proizvođačkoj praksi. Zagreb: Official Gazette (NN 71/1999). [Online] Available at: <https://narodne-novine.nn.hr/eli/sluzbeni/1999/71/1306> [Accessed 16 November 2020].
- Ostović, M., Pavičić, Ž., Tofant, A., Balenović, T., Ekert Kabalin, A., Menčik, S., Valpotić, H., Kezić, D. (2009) Opći principi određivanja higijenske kvalitete zraka, kao pokazatelja dobrobiti svinja u intenzivnoj proizvodnji. *Stočarstvo*, 63 (1), 35-41.



- Pavić, S., Smoljanović, M., Mijaković, I., Ćurin, K., Prodan-Bedalov, M. (2001) Načela utvrđivanja mikrobiološke kakvoće zraka. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 52(3), 355-365. [Online] Available at: <https://hrcak.srce.hr/531>. [Accessed 16 November 2020].
- PKN (1989) Air purity protection. Microbiological testings. Determination of the number of bacteria in the atmospheric air (immission) with sampling by aspiration and sedimentation method (PN-89/Z-04111.02). Warsaw: Polish Committee for Standardization.
- PKN (1989) Air purity protection. Microbiological testings. Determination of the number of the fungi in the atmospheric air (immission) with sampling by aspiration and sedimentation method (PN-89/Z-04111.03). Warsaw: Polish Committee for Standardization.
- Popescu, S., Borda, C., Diugan, E. A., Oros, D. (2014) Microbial air contamination in indoor and outdoor environment of pig farms. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 47 (1), 182-187. [Online] Available at: <http://spasb.ro/index.php/spasb/article/view/1710>. [Accessed 16 November 2020].
- R Development Core Team (2008) R: A language and environment for statistical computing (Release 3.2.2) [Software]. Vienna, Austria: R foundation for statistical computing.
- Schaeffer, J. W., Reynolds, S., Magzamen, S., VanDyke, A., Gottel, N. R., Gilbert, J. A., Owens, S. M., Hamton-Marcell, J. T., Volckens, J. (2017) Size, composition, and source profiles of inhalable bioaerosols from Colorado dairies. Environmental Science & Technology, 51 (11), 6430-6440. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00882>
- Smit, L.A.M., Heederik, D. (2017) Impacts of intensive livestock production on human health in densely populated regions. GeoHealth, 1 (7), 272-277. DOI: <https://doi.org/10.1002/2017GH000103>
- Stetzenbach, L.D. (2009) Airborne Infectious Microorganisms. In: Schaechter, M., ed. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Oxford: Academic Press, pp. 175-182.
- Tang, Q., Huang, K., Liu, J., Shen, D., Dai, P., Li, Y., Li, C. (2020) Seasonal variations of microbial assemblage in fine particulate matter from a nursery pig house. Science of the Total Environment, 708, 134921. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134921>
- Uremović M., Uremović Z. (1997) Svinjogojstvo. Zagreb: Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Yassin, M.F., Almouqatea, S. (2010) Assessment of airborne bacteria and fungi in an indoor and outdoor environment. International Journal of Environmental Science & Technology, 7(3), 535-544. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03326162>
- Zhao, Y., Aarnink, A.J.A., De Jong, M.C.M., Groot Koerkamp, P.W.G. (2014) Airborne microorganisms from livestock production systems and their relation to dust. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 44 (10), 1071-1128. DOI: <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.746064>