

# **ACTA SCIENTIARUM POLONORUM**

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

**Medicina Veterinaria**

Weterynaria

Veterinary Medicine

9(1) 2010



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn  
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

## **Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum***

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),  
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin), Edward Niedźwiecki (Szczecin),  
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,  
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

## **Rada Naukowa serii *Medicina Veterinaria***

Miroslav Baran (Koszyce, Słowacja), Ryszard Bobowiec (Lublin),  
Carlos Castrillo (Saragossa, Hiszpania), Andrzej Depta (Olsztyn),  
Øystein Sjaastad (Oslo, Norwegia), Jacek Szczawiński (Warszawa),  
Wojciech Zawadzki (Wrocław) – przewodniczący,  
Bożena Króliczewska (Wrocław) – sekretarz

Opracowanie redakcyjne i korekta:

Anna Piskor

Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie

Teresa Alicja Chmura

Projekt okładki

Daniel Morzyński

ISSN 1644-0676

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków Uniwersytetu Przyrodniczego  
we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,  
Wrocław 2010

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki  
ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax 71 328-12-77  
e-mail: [wyd@up.wroc.pl](mailto:wyd@up.wroc.pl) <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 200 + 16 egz. Ark. wyd. 2,6. Ark. druk. 2,5  
Druk i oprawa: F.P.H. „ELMA”

## **THE EFFECT OF DIETARY MULTICOMPONENT PRESERVATIVE ON MICROBIOLOGICAL QUALITY OF MIXTURES FOR SOWS**

Daniel Korniewicz<sup>1</sup>, Zbigniew Dobrzański<sup>2</sup>, Adolf Korniewicz<sup>2</sup>,  
Paweł Gajewczyk<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Wrocław University of Environmental and Life Sciences

<sup>2</sup> LNB Poland Ltd, Kiszkowo, Poland

**Abstract.** The aim of the study was to determine the influence of multicomponent preservative in a loose form on the reduction of bacteria, fungi and mycotoxins in mixtures for pregnant and lactating sows. The mixtures were stored for 3 months. The research material were 6 mixtures for pregnant sows and 6 mixtures for lactating ones, differing with the level of total protein, the addition of crystalline amino acids and preservative. The mixtures were produced from the same components according to the receipt established. The preservative in amount of 0.8% was introduced to the experimental mixtures. The following acids were the active components of the preservative: formic, propionic, phosphoric, citric and benzoic. The control mixtures and those with the preservative were stored for 3 months in a storehouse. After 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> month of the storage, the total number of bacteria and fungi was determined, and after 3 months of the storage the content of alfatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol was determined.

The preservative applied influenced the reduction in the number of aerobic mesophilic bacteria from  $1.3 \times 10^6$  to  $3.1 \times 10^2$  and a decrease in fungi number from  $3.9 \times 10^3$  to  $4.0 \times 10^1$  cfu/g. The highest bacteria reduction was noted in the case of mixtures with the lowest protein level with an addition of crystalline amino acids. The preservative reduced the content of alfatoxin B<sub>1</sub> from 2.0 to 1.0 ppb. The preservative assessed did not influence the reduction of ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in a significant manner. The content of these mycotoxins was subject to a decrease of only 20 to 30%.

**Key words:** feed mixtures, protein, aerobic bacteria, fungi, mycotoxins

### **INTRODUCTION**

The results of reproductive performance of sows depend to a high degree on the quality of feed given. It is conditioned by the quality of feed materials used for the production

---

Corresponding author – Adres do korespondencji: Zbigniew Dobrzański, Department of Animal Hygiene and Animal Welfare, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, ul. Chelmońskiego 38C, 51-630, Wrocław, e-mail: zbigniew.dobrzanski@up.wroc.pl

of mixtures, and also by storage conditions. The basic component of feed mixtures for pigs are cereals which are naturally contaminated by bacteria and fungi [Kiecana 1994, Korniewicz et al. 1995, 1996a, b, Kozik et al. 1992, Kozik, Korniewicz 1993, Kwiatek et al. 2008, Gajęcki 2009].

That microorganisms develop intensively in a favourable conditions (temperature, humidity). Cereal grain collected using harvesters needs cleaning and a direct lowering of humidity up to 14% before the storage. An omission of these treatments before longer storage may be a direct reason of an intensive proliferation of bacteria and fungi [Korniewicz et al. 1989, Baranowski et al. 2003].

Mycotoxins formed during cereals vegetation and grain storage remain there during the whole storage period [Baranowski et al. 2003]. That leads to losses of nutritional components of grain and decreases production results of animals fed with such a mixture [Richter 1989, Richter et al. 1996, Korniewicz et al. 1996a,b). Feed mixtures are an attractive environment for microorganisms development. The most harmful as regards toxins formation are mould fungi of *Fusarium* genus.

Mycotoxins, except their overall toxic activity, may also exhibit carcinogenic, mutagenic, teratogenic activity and may cause disorders in a proper functioning of reproductive system [Schaefer et al. 2000, Sweeney 2002, Teilemann et al. 2002].

The most important mycotoxins produced by mould fungi are as follows: aflatoxins – B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> and ochratoxin A (OTA), zearalenone (ZEA), deoxynivalenol (DON), fumonisins (FUM). Each mycotoxin is characterised by a specific toxicity and acts on the health in a specific manner.

DON contained in mixtures for pigs causes appetite loss, vomiting, diarrhea, decrease in body mass gains [Dänicke et al. 2004]. With the concentration of DON from 1.3 to 3.5 mg/kg of feed given, there was a decrease in feed intake by fattening pigs [Young et al. 1983, Bergsio et al. 1993]. Cote et al. [1994] in turn demonstrated that the content from 2.5 to 4.5 mg of DON/kg of feed caused some disorders in pigs reproduction.

Zearalenone (ZEA) also known as a toxin F<sub>2</sub> is a derivative of resorcylic acid. As it is given by some authors [Obremski 2001, Gajęcki 2002, Gliński et al. 2002, Zwierzchowski 2002] zearalenone is the third the most common mycotoxin. ZEA causes disorders in estrogenic hormones balance in gilts and sows [Jana and Skwarski 1998].

The typical symptoms of a toxic activity of that mycotoxin are redness, swelling and inflammatory state of external sexual organs, formation of cysts on oviduct walls, under development or atrophy of yellow body, sexual cycle disorders, low body mass of newborn piglets and lowered viability [Etienne and Jemmali 1982, Gajęcki 2002, Zwierzchowski 2002].

The study on zearalenone metabolism demonstrate that the toxin after an oral administration is completely absorbed [Biehl et al. 1993]. ZEA and its metabolites are detected in blood after 30 minutes from the administration [Olsen et al. 1991, Obremski 2001, Obremski et al. 2003].

The piglets born alive develop slower as a result of the presence of toxin in mother's milk, and an increased number of collapses is observed as a consequence [Sweeney 2002].

Ochratoxin A (OTA) is formed mainly during the storage of barley grain of an excessive humidity. It is assumed that the concentration of 200 mg OTA/kg of feed does not induce any apparent symptoms of pigs poisoning, however it may cause some patho-

logical changes in kidneys. As it was demonstrated by Jarczyk et al. [2000] even low dose of 19 µg/kg of feed may cause diarrhea and collapses in piglets.

Fumonisin (FUM) are a group of toxins of maize origin. The most common is fumonisin B<sub>1</sub> that influences the synthesis of lipids in nervous cells [Grajewski et al. 2009].

The level of mycotoxins in feed mixtures may be reduced applying treatments like: cleaning and sorting of damaged grains, binding with sorbents of natural origin like aluminosilicates, and by an addition of properly selected chemical preservative. The ability of the formation of bonds with a sorbent is exhibited by aflatoxin B<sub>1</sub>, and partially by DON and ZEA. OTA in turn is not subject to sorbent detoxication [Grajewski 1999].

The most effective agents limiting the development of fungi are propionic, citric and orthophosphoric acids [Korniewicz et al. 1995], and of bacteria the formic one [Eckel et al. 1992, Roth et al. 1992]. Richter [1989] demonstrated the lack of propionic acid influence on the reduction of ZEA level in cereal grains, and a reduction of 68% of OTA content.

Mycotoxins synthesized by moulds during cereals vegetation maintain a high chemical stability during grain storage. Thus, there is a need of particular recognition of mycotoxins formed in order to select the effective preservative. Grajewski et al. [2009] demonstrated the results of analysis concerning the presence of fungi and mycotoxins in cereal grains and feed mixtures available on Polish market in years 2006, 2007, 2008. The content of fungi, aflatoxin B<sub>1</sub>, DON, ZEA, FUM and NIV was determined. The level of the contamination of analysed material with fungi and mycotoxins confirms the need of further monitoring of feed components used for the production of feed mixtures.

The special role in feeding of intensively used pigs is attributed to the level of protein and exogenous amino acids. As it was demonstrated in numerous experiments [Buraczewski and Buraczewska 1997, Fandryjewski et al. 1999, Korniewicz 2004, Korniewicz et al. 2009] the amount of nitrogen retained in pigs organism with respect to the amount taken in feed is only 40–48%. The remaining 52% of the nitrogen is expelled with faeces and urine, presenting a considerable threat to the environment. Thus, due to economic and ecological respect in pigs feeding it is purposeful to undertake the study concerning the limitation of total protein level in feed mixtures with a concurrent complement of crystalline amino acids that are fully available.

The aim of the present study was to determine an influence of multicomponent preservative in feed mixtures for pregnant and lactating sows on the reduction of bacteria and fungi and mycotoxins. The effectiveness of that preservative was assessed during the storage period of feed mixtures of a differentiated content of total protein and an addition of crystalline exogenous amino acids.

## **MATERIAL AND METHODS**

The research material were 6 feed mixtures of "PS" type for pregnant sows and 6 feed mixtures of "LS" type for lactating sows. The mixtures differed with respect to the total protein content and an addition of exogenous amino acids and a preservative.

- 1 – control group, the level of protein and amino acids recommended in accordance with Polish standards.
- 2 – protein level lowered of 10%, supplemented with lysine and methionine, threonine and tryptophan to the level recommended in accordance with Polish standards.

3 – protein level lowered of 20%, supplemented with lysine and methionine, threonine and tryptophan to the level recommended in accordance with Polish standards.

For all kinds of feed mixtures of "PS" and "LS" kind, the multicomponent preservative in a powdered form was added in an amount of 0.8%. The preservative was manufactured by "PROVIT" Ltd. in Kutno (Poland) according to an established recipe. The following acids were the active components of the preservative: formic, propionic, phosphoric and citric. Phosphoric, formic and propionic acids were deposited on a highly absorptive silica, and then were joined with a loose citric and benzoic acid.

Eight tones of each mixture with an addition of the preservative assessed was produced in Fodder Plant "PIAST" Lewkowiec (Poland). The samples of 20 kg each from the mixtures manufactured were taken to jute sacks and placed in a storehouse, where they were stored for the 3 months period. The temperature in the storehouse ranged from 18 to 20°C, and the relative air humidity was 53–58%.

Feed mixtures for all groups were produced from the same components according to the established recipe at the "PIAST" Fodder Plant in Lewkowiec (Poland). The basic feed material for the production of mixtures was barley and wheat meal, beet pulp, wheat bran, extracted soybean meal and rapeseed oil. In the control mixtures, the 0.8% of the preservative was replaced by 0.8% of barley meal.

After 1 and 3 months of mixtures storage, the laboratory samples were taken and were subject to a microbiological assessment in the Department of Veterinary Hygiene in Wrocław. Total count of mesophilic aerobic bacteria was determined in the samples according to the method of PN-EN ISO 4833:2004, and total fungi count according to the method of PN-ISO 7954:1999. The incubation time of fungi was 5 days at a temperature of 25°C. After 3 months of the storage, the separate samples were collected and analysed with respect to mycotoxins level in the Department of Veterinary Hygiene in Poznań (Poland). The content of aflatoxin B<sub>1</sub>, ochratoxin A<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol was determined. The mycotoxins were analysed using HPLC method with fluorescence detection.

The level of total protein in mixtures for experimental groups was lowered by the limitation of extracted soybean meal contribution. Amino acids like lysine, methionine, threonine and tryptophan optimised in mixtures, were equalised to the level recommended in Polish Standards for Pig Feed [1993] by their addition in a crystalline form. Mineral components and vitamins were supplemented to the recommended level by the addition of 0.3% of premix to the feed mixtures. The premix was manufactured at LNB Poland Ltd. Kiszkowo (Poland), according to an established recipe.

The components used for the production of feed mixtures were subjected to chemical analysis determining the content of basic nutrients. The analysis was conducted according to mandatory methods [AOAC 1990] in the laboratory of LNB Poland Ltd., and amino acid composition of protein in feed material used for the production of feed mixtures was determined using chromatographic method in a laboratory at Degusa AG Hanem-Wolfgang in Germany. Based on the results of the analysis, the optimization of nutrient content in feed mixtures for all groups was done according to experimental assumption.

The calorific value of mixtures was calculated on the basis of analysis of components and digestibility indices and equations contained in Polish Standards for Pig Feed [1999] and CVB [2004].

Detailed composition of feed mixtures for pregnant and lactating sows, and the content of nutrients in 1 kg of that mixtures are presented in Tables 1 and 2.

Table 1. Percentage composition and the content of nutrients in mixtures for pregnant sows  
Tabela 1. Skład procentowy i zawartość składników pokarmowych w mieszankach dla loch  
prośnych

Feed materials Materiały paszowe	Groups – Grupy		
	I control I kontrolna	II protein lowered of 10% II obniżone białko o 10%	III protein lowered of 20% III obniżone białko o 20%
Nutrients Składniki pokarmowe			
Barley meal – Śruta jęczmienna	31.1575	36.2575	39.5375
Oat meal – Śruta owsiana	25.00	25.00	25.00
Dry beet pulp – Wysłodki buraczane suche	25.00	25.00	25.00
Extracted soybean meal – Pockstrakcyjna śruta sojowa	8.70	4.50	–
Wheat bran – Otręby pszenne	5.00	5.00	5.00
Rapeseed oil – Olej rzepakowy	2.30	2.10	2.00
Preservative – Konserwant	0.80	0.80	0.80
Pasture chalk – Kreda pastewna	1.05	1.05	1.06
Monocalcium phosphate – Fosforan jednowapniowy	0.45	0.49	0.52
Pasture salt – Sól pastewna	0.23	0.23	0.23
Premix – Premiks	0.30	0.30	0.30
Phyzyme XP 4000 TPT – Phyzyme XP 4000 TPT	0.0125	0.0125	0.0125
L-lysine 98 – L-lizyna 98	–	0.15	0.30
L-threonine – L-treonina	–	0.06	0.13
Dl-methionine – D1-metionina	–	0.03	0.07
Tryptophan – Tryptofan	–	0.02	0.04
In total – Razem	100.00	100.00	100.00
Content in 1 kg of mixture: Zawartość w 1 kg mieszanek:			
Net energy – Energii netto [kcal]	2082	2080	2084
Metabolic energy – Energii metabolicznej [MJ]	12.10	12.09	12.11
Total protein – Białka ogólnego [%]	13.00	11.72	10.33
Crude fibre – Włókna surowego [%]	9.59	9.65	9.70
Crude fat – Tłuszczu surowego [%]	4.74	4.56	4.47
Crude ash – Popiołu surowego [%]	5.55	5.41	5.26
Ca [%]	0.80	0.80	0.80
P [%]	0.44	0.44	0.43
Na [%]	0.15	0.15	0.15
Lysine – Lizyny [%]	0.64	0.64	0.64
Methionine – Metioniny [%]	0.20	0.21	0.22
Methionine + Cystine – Metioniny + cystyny [%]	0.46	0.45	0.45
Threonine – Treoniny [%]	0.48	0.48	0.48
Tryptophan – Tryptofanu [%]	0.15	0.15	0.15
Isoleucine – Izoleucyny [%]	0.49	0.42	0.35
Valine – Waliny [%]	0.65	0.58	0.51

<sup>1)</sup> In the control mixtures, 0.8% of the preservative was replaced by 0.8% of barley meal.

W mieszankach kontrolnych w miejsce 0,8% konserwantu zwiększono o 0,8% śrutę jęczmienną.

Table 2. Percentage composition and the content of nutrients in mixtures for late pregnant and lactating sows

Tabela 2. Skład procentowy i zawartość składników pokarmowych w mieszankach dla loch wysoko-prośnych i karmiących

Feed materials Materiały paszowe	Groups – Grupy		
	I control I kontrolna	II protein lowered of 10% II obniżone białko o 10%	III protein lowered of 20% III obniżone białko o 20%
Nutrients Składniki pokarmowe			
Barley meal – Śruta jęczmienna	39.00	39.00	39.00
Wheat meal – Śruta pszenna	32.6525	37.5875	39.9275
Extracted soybean meal			
Poekstrakcyjna śruta sojowa	17.15	11.50	8.80
Wheat bran – Otręby pszenne	4.00	4.50	4.70
Rapeseed oil – Olej rzepakowy	2.80	2.65	2.60
Preservative – Konserwant	0.80	0.80	0.80
Pasture chalk – Kreda pastewna	1.62	1.62	1.62
Monocalcium phosphate			
Fosforan jednowapniowy	0.95	1.00	1.05
Pasture salt – Sól pastewna	0.46	0.46	0.46
Premix – Premiks	0.30	0.30	0.30
Phyzyme x P – Phyzyme x P	0.0125	0.0125	0.0125
L-lysine 98 – L-lizyna 98	0.190	0.370	0.460
L-threonine – L-treonina	0.035	0.065	0.080
DL – methionine 99	–	0.025	0.040
DL – metionina 99			
Tryptophan – Tryptofan			
In total – Razem	100.00	100.00	100.00
Content in 1 kg of mixture: Zawartość w 1 kg mieszanki:			
Net energy – Energii netto [kcal]	2283	2283	2284
Metabolic energy – Energii metabolicznej [MJ]	13.27	13.27	13.27
Total protein – Białka ogólnego [%]	17.00	15.32	14.52
Crude fibre – Włókna surowego [%]	3.48	3.47	3.46
Crude fat – Tłuszczu surowego [%]	4.54	4.38	4.33
Crude ash – Popiołu surowego [%]	5.59	5.41	5.34
Ca [%]	0.95	0.95	0.95
P [%]	0.64	0.64	0.64
Na [%]	0.20	0.20	0.20
Lysine – Lizyny [%]	0.94	0.94	0.94
Methionine – Metioniny [%]	0.30	0.30	0.30
Methionine + Cystine [%]	0.62	0.60	0.59
Metioniny + cystyny [%]			
Threonine – Treoniny [%]	0.63	0.63	0.63
Tryptophan – Tryptofanu [%]	0.22	0.22	0.22
Isoleucin – Izoleucyny [%]	0.68	0.59	0.54
Valine – Waliny [%]	0.80	0.70	0.66

<sup>\*)</sup> In the control mixtures, 0.8% of the preservative was replaced by 0.8% of barley meal.

W mieszankach kontrolnych w miejsce 0,8% konserwantu zwiększono o 0,8% śrutę jęczmienną.



## RESULTS

### "PS" mixtures for pregnant sows

The mixtures were manufactured from well dried feed materials that is confirmed by dry matter value (88.6–88.2%). The basic differentiating factor was the level of total protein 13.0–11.7–10.3%, and an addition of the preservative in an amount of 0.8% to experimental mixtures. The total count of mesophilic aerobic bacteria in control mixtures after 1 month of storage (tab. 3) was similar ( $1.3 \times 10^6$ – $1.8 \times 10^6$ – $1.5 \times 10^6$ ) and did not depend on the protein level. In the experimental mixtures with an addition of the preservative in turn, the high reduction in bacteria number was observed ( $1.8 \times 10^4$ – $1.6 \times 10^4$ – $3.5 \times 10^3$ ). The highest reduction in bacteria count was noted in the mixture of the lowest protein content. The analysis conducted after 3 months of the storage prove that the number of aerobic bacteria in control mixtures was not subject to change. In the experimental mixtures with an addition of the preservative in turn, the further reduction in bacteria number up to  $1.1 \times 10^3$  was observed.

The number of toxin-forming fungi in control mixtures after 1 month of storage was almost the same and did not depend on the protein level in that mixtures ( $2.4 \times 10^4$ – $2.7 \times 10^4$ ) cfu/g. The preservative applied influenced the considerable reduction in fungi number ( $1.2 \times 10^3$ ) cfu/g. After 3 months of storage, the same level of fungi ( $2.4 \times 10^4$ ) was maintained in the control mixtures, while in those with the preservative there was further reduction in fungi number up to  $1.9 \times 10^2$  cfu/g.

### "LS" mixtures for lactating sows

That mixtures, similarly like "PS" type ones, were manufactured from well dried feed material, and dry matter content was 88.5–88.2–88.0%.

The basic differentiating factor was the level of total protein 17.0–15.3–14.5% and an addition of the preservative in an amount of 0.8% to the experimental mixtures. Total number of aerobic mesophilic bacteria in control mixtures after 1 month of storage (tab. 4) was the same ( $1.3 \times 10^5$ – $1.1 \times 10^5$ ) and did not depend on protein level in mixtures and amino acids addition. In the experimental mixtures with the preservative addition in turn, the considerable reduction in bacteria number up to do  $1.1 \times 10^3$  was observed, and in the case of mixtures with the lowest protein level even up to  $3.1 \times 10^2$ . After 3 months of storage, the bacteria number in control and experimental mixtures stayed on the same level.

The number of toxin-forming fungi in the control mixtures at the 1<sup>st</sup> month of the storage was the same ( $3.9 \times 10^3$ ) and did not depend on the protein level. The addition of the preservative to these mixtures influenced the reduction in fungi number up to do  $2.3 \times 10^2$  cfu/g. That profitable influence of the preservative on fungi reduction was observed in the further period. After 3 months of the storage, the decrease in fungi number up to  $4 \times 10^1$  cfu/g was noted.

In the mixtures of "LS" type for lactating sows, the considerably lower number of aerobic bacteria and fungi, as compared to mixtures of "PS" type for pregnant sows, was observed. It concerned the control mixtures as well as those with the preservative addition. Such a big difference resulted from the fact that the mixtures of "LS" type were in granulated form. Thus, the granulation process influenced also the microbiological quality of the mixtures compared.

Table 3. Microbiological assesment of feed mixtures of "PS" type for pregnant sows during the storage period

Tabela 3. Ocena mikrobiologiczna mieszanek pełnoporcjowych dla loch próśnych typu „LP” w okresie przechowywania

Specification Wyszczególnienie	Storage period [months] Okres przechow. [miesiące]	Control "C" Kontr. „K”  Experimental "E" Dośw. „D”	Protein level [%] Poziom białka [%]		
			13.0	11.7	10.3
Dry matter [%] Sucha masa [%]			88.6	88.4	88.2
Total number of aerobic mesophilic bacteria [cfu/g] Ogólna liczba bakterii tlenowych mezofilnych [jtk/g]	1	C	1.3x10 <sup>6</sup>	1.8x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>6</sup>
		E	1.8x10 <sup>4</sup>	1.6x10 <sup>4</sup>	3.5x10 <sup>3</sup>
	3	C	1.4x10 <sup>6</sup>	1.7x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>6</sup>
		E	8.1x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>3</sup>	1.1x10 <sup>3</sup>
Number of toxin-forming fungi [cfu/g] Liczba grzybów toksynotwórczych [jtk/g]	1	C	2.4x10 <sup>4</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>	2.7x10 <sup>4</sup>
		E	1.6x10 <sup>3</sup>	1.8x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>3</sup>
	3	C	2.5x10 <sup>4</sup>	2.6x10 <sup>4</sup>	2.8x10 <sup>4</sup>
		E	1.8x10 <sup>2</sup>	1.0x10 <sup>2</sup>	1.0x10 <sup>2</sup>

x) Allowable levels:

Bacteria – 3x10<sup>6</sup>

Fungi – 200 000

x) Dopuszczalne poziomy:

Bakterii – 3x10<sup>6</sup>

Grzybów – 200 000

Table 4. Microbiological assesment of feed mixtures of "LS" type for lactating sows during the storage period

Tabela 4. Ocena mikrobiologiczna mieszanek pełnowartościowych dla loch karmiących typu „LK” w okresie przechowywania

Specification Wyszczególnienie	Storage period [months] Okres przechow. [miesiące]	Control "C" Kontr. „K” Experimental "E" Dośw. „D”	Protein level [%] Poziom białka [%]		
			17.0	15.3	14.5
Dry matter [%] Sucha masa			88.5	88.2	88.0
Total number of aerobic mesophilic bacteria [cfu/g] Ogólna liczba bakterii tlenowych mezofilnych [jtk/g]	1	C	$1.3 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$
		E	$1.1 \times 10^3$	$9.1 \times 10^2$	$3.1 \times 10^2$
	3	C	$3.8 \times 10^5$	$2. \times 10^5$	$1.2 \times 10^4$
		E	$9.1 \times 10^2$	$1.1 \times 10^3$	$3.1 \times 10^2$
Number of toxin-forming fungi [cfu/g] Liczba grzybów toksynotwórczych [jtk/g]	1	C	$3.9 \times 10^3$	$3.9 \times 10^3$	$3.2 \times 10^2$
		E	$2.3 \times 10^2$	$3.0 \times 10^2$	$4.6 \times 10^2$
	3	C	$3.9 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	$4.6 \times 10^2$
		E	$4.0 \times 10^1$	$7.5 \times 10^1$	$4.0 \times 10^1$

### Mycotoxins

The analysis of all the mixtures with respect to the presence and the level of mycotoxins were conducted once only, after 3 months of storage. The results of the analysis are presented in Tables 5 and 6.

#### "PS" type mixtures for pregnant sows

The presence of analysed mycotoxins was noted in all the mixtures. The amount of aflatoxin B<sub>1</sub> in control mixtures was on the level of 7.5–6.2 ppb. The preservative used influenced the significant decrease in that mycotoxin amount in particular mixtures (2.8–1.5 ppb). In the case of mixtures with lowered protein level, control ones and those with the preservative, lower amount of aflatoxin B<sub>1</sub> was observed.

Ochratoxin A was present in the same amount in the case of control mixtures and those with the preservative as well. The tendency to an increase in ochratoxin A content in mixtures with lowered protein level is observed. The content of zealarenone in the control mixture was 120 ppb. The preservative used significantly reduced the content of that mycotoxin up to 95 ppb. Lower concentration of ZEA was observed in all mixtures with reduced protein level.

Table 5. Mycotoxins content in feed mixtures of "PS" type for pregnant sows after 3 months of storage

Tabela 5. Zawartość mikotoksyn w mieszankach pełnowartościowych typu „LP” dla macior próśnych po 3 miesiącach przechowywania

Specification Mycotoxin Wyszczególnienie Mikotoksyna	Control "C" Kontrolna „K”	Protein level in mixtures [%] Poziom białka w mieszankach [%]		
	Experimental. "E" Doświadcz. „D”	13.3	11.7	10.3
Aflatoxin B <sub>1</sub> [ppb] Aflatoksyna B <sub>1</sub> [ppb]	C E	7.5 2.8	6.6 1.6	6.2 1.5
Ochratoxin A (OTA) [ppb] Ochratoksyna A (OTA) [ppb]	C E	18.1 18.0	21.9 21.0	22.0 22.0
Zealarenone (ZEA) [ppb] Zealarenon (ZEA) [ppb]	C E	120 95	98 86	80 66
Deoxynivalenol (DON) [ppb] Deoksyniwalenol (DON) [ppb]	C E	116 106	98 71	89 69

<sup>x)</sup> Allowable content in feed mixtures of 12% humidity <sup>x)</sup> Dopuszczalna zawartość w mieszankach pełnowartościowych o wilgotności 12% dla świń:

- Aflatoxin B <sub>1</sub>	- 0.02 mg/kg = 20 ppb	- Aflatoksyna B <sub>1</sub>	- 0,02 mg/kg = 20 ppb
- Ochratoxin A	- 0.05 mg/kg = 50 ppb	- Ochratoksyna A	- 0,05 mg/kg = 50 ppb
- Zealarenone	- 0.25 mg/kg = 250 ppb	- Zealarenon	- 0,25 mg/kg = 250 ppb
- Deoxynivalenol	- 0.9 mg/kg = 900 ppb	- Deoksyniwalenol	- 0,9 mg/kg = 900 ppb

Table 6. Mycotoxins content in feed mixtures of "LS" type for lactating sows after 3 months of storage

Tabela 6. Zawartość mikotoksyn w mieszankach pełnowartościowych typu „LK” dla macior karmiących po 3 miesiącach przechowywania

Specification Mycotoxin Wyszczególnienie Mikotoksyna	Control "C" Kontrolna „K”	Protein level in mixtures [%] Poziom białka w mieszankach [%]		
	Experimental. "E" Doświadcz. „D”	17.0	15.3	14.5
Aflatoxin B <sub>1</sub> [ppb] Aflatoksyna B <sub>1</sub> [ppb]	C E	2.0 1.0	1.8 1.0	1.7 1.1
Ochratoxin A (OTA) [ppb] Ochratoksyna A. (OTA) [ppb]	C E	16.6 15.0	16.0 14.5	15.0 14.0
Zealarenone (ZEA) [ppb] Zealarenon (ZEA) [ppb]	C E	92.0 13.4	59.0 8.7	54.0 7.2
Deoxynivalenol (DON) [ppb] Deoksyniwalenol (DON) [ppb]	C E	106.0 84.0	104.0 83.0	102 80.0

The content of deoxynivalenol (DON) was the highest in the control mixture (116 ppb). The preservative reduced the formation of that mycotoxin in the control mixture up to 106 ppb. In the control mixtures with reduced protein level, the content of DON was lower of about 20%, and in the mixtures with the preservative of 34%.

#### **"LS" type mixtures for lactating sows**

The presence of analysed mycotoxins was noted in all feed mixtures for lactating sows. The concentration of that toxins was differentiated depending on the preservative used and protein level in the mixtures assessed.

The amount of aflatoxin B<sub>1</sub> in control mixtures was on similar level, i.e. 2.0–1.8–1.7 ppb. The preservative used significantly reduced the content of that toxin up to 1.0 ppb. The content of ochratoxin A in the control mixtures did not depend on the protein level and was from 16.6 to 15.0 ppb. The preservative had very slight influence on the reduction of that toxin, i.e. only of 10% as compared to the control mixtures. The content of zearalenone in the control mixture was the highest, i.e. 92 ppb. In the mixtures with reduced protein level in turn, the concentration of that mycotoxin decreased up to 54 ppb.

The content of deoxynivalenol (DON) in the control mixture was similar 106–102 ppb). The preservative influenced also the reduction of that mycotoxin of about 20% independently on the protein level in the mixtures analysed.

Comparing the results of "PS" type mixtures to "LS" mixtures, it should be stated that the granulation process influenced the lower concentration of mycotoxins analysed. Especially high differences applies to aflatoxin B<sub>1</sub>.

## **DISCUSSION**

The common practice in the production conditions is an application of preservatives and acidifiers in feed mixtures for piglets and fattening pigs. There is lack of preservatives aimed at an application in feed mixtures for pregnant and lactating sows on a domestic market. Thus, the authors elaborated the recipe of multicomponent preservative on a mineral carrier, and its efficiency was assessed during the period of mixtures storage. Feed mixtures for pregnant sows contained only 11.4–11.8% of water, thus that conditions were not favourable for a development of bacteria, since the threshold value for them is 13%. The total count of aerobic bacteria in the mixtures analysed did not exceed the allowable value of  $3 \times 10^6$  cfu/g. The preservative used appeared to be a very effective agent reducing the number of bacteria up to  $1.1 \times 10^3$  cfu/g. That effectiveness results from relatively high content of formic acid in the preservative used. In another study, Korniewicz et al. [1995] using the preparation containing 60% of formic acid for the preservation of grain and mixtures, demonstrated even higher reduction in bacteria number from  $2.3 \times 10^5$  to  $4.3 \times 10^2$ . The high effectiveness of formic acid in a reduction in bacteria proliferation in mixtures for pigs was demonstrated by Eckel et al. [1992].

The number of toxin-forming fungi in all the mixtures for pregnant and lactating sows did not exceed the permissive level of 200 000 cfu/g. It is also the proof of the high quality of feed materials used in that mixtures manufacturing. The preservative used caused a reduction in fungi number in mixtures as soon as after 1 month of storage. Such a high effectiveness of the preservative results from high contribution of propionic,

phosphoric and citric acids in the preservative. In another study, Kozik et al. [1992], Korniewicz et al. [1995, 1990] demonstrated that propionic acid or its salts added to feed mixtures for piglets caused 10-fold reduction in the fungi number.

Kubizna [2009] analysing the results of microbiological assessment of 1984 samples of mixtures and feed materials from Lower Silesia and Opole Voivodship in a period of 2003–2007 demonstrated a clear increase in the fungi flora concentration, especially in the case of mixtures for pigs, from 3.39 to 4.01 log 10 cfu/g. That data point the need of preservatives application, not only in mixtures for piglets, but for fatteners and sows as well. Kwiatek et al. [2008] demonstrated, that in the period of 2003–2006 in Poland, the highest level of fungal contamination concerned the cereal grain, and it was 10<sup>6</sup> cfu/g. The author proved that the regression of the results obtained point a slow, however systematic, improvement in microbiological quality of feed materials used in Poland. It especially concerns to extracted meals from oilseed plants, and cereal grain to a lower degree.

Mycotoxins produced by fungi microflora were noted in all mixtures for pregnant and lactating sows, however their concentration did not exceed the values recommended by the European Community [2006]. The addition of multicomponent preservative appeared to be very effective in aflatoxin B<sub>1</sub> reduction.

Grajewski et al. [2009] presented the results of the analysis of mycotoxins in cereal grain, feed mixtures in a period of 2006–2008. The analysis gathered concerned: aflatoxins – 457, ochratoxins A – 523, zearalenone – 637, deoxynivalenol – 757, fumonisins – 106.

The mean of positive samples in the mixtures analysed was as follows: aflatoxin B<sub>1</sub> – 0.08 ppb, ochratoxin A – 27.2 ppb, deoxynivalenol – 160–230 ppb, zearalenone – 15–35 ppb.

The level of mycotoxins contamination of feed mixtures available on the market demonstrate the need of a constant monitoring and an application of agents reducing their concentration, including preservatives.

The results concerning a microbiological assessment of mixtures for sows obtained in the present study prove the purposefulness of an addition of an effective preservative in order to improve the quality of mixtures.

## REFERENCES

- AOAC, 1990. In Official Methods of Analysis. 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.
- Baranowski A., Richter W., Grzybowski G., 2003. Wybrane mikotoksyny występujące w paszach gospodarskich [Selected mycotoxins present in livestock feeds]. *Prace i Mat. Zoot. Monogr. i Rozpr., Zesz. 4*, 57–83 [in Polish].
- Bergsjö B., Langseth W., Nafstad I., Jansen H., Larsen K.J.S., 1993. The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs. *Vet. Res. Commun.*, 17, 283–294.
- Biehl M.L., Prelusky D.B., Koritz G.D., Hartin K.E., Buck W.B., Trenholm H.L., 1993. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 12, 152–159.
- Buraczewski S., Buraczewska L., 1997. Normowanie białka dla świń (2) [Protein standardization in pigs]. *IFiZZ PAN Jabłonna*, 23–39 [in Polish].

- Cote L.M., Reynolds J.D., Vesonder R.E., Buck W.B., Swanson S.P., Coffey R.T., Brown D.C., 1984. Survey of vomitoxin-contaminated feed grains in midwestern United States, and associated health problems in swine. *J Am. Vet. Med. Assoc.*, 184(2), 189–192.
- CVB 2004. Veevoedertabel 2004. Central Veevoedertabel, Lelystad, Holland.
- Dänicke S., Valenta H., Döll S., 2004. On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pigs. *Arch. Anim. Nutr.*, 58, 169–180.
- Eckel B., Kirchgessner M., Roth F.X., 1992. Zum Einfluss von Ameisensäure auf tägliche Zunahmen, Futteraufnahme, Futteverwertung und Verdaulichkeit. *J. Anim. Physiol. Nutr.*, 67, 93–100.
- Etienne M., Jemmali M., 1982. Effects of zearalenone (F2) on estrous activity and reproduction in gilts. *J. Anim. Sci.*, 55, 1, 1–9.
- Fandrejowski H., Ray S., Weremko D., Skiba G., 1999. Wpływ poziomu białka na diecie o wyrównanej zawartości aminokwasów strawnych na skład chemiczny ciała oraz wykorzystanie białka i energii u mięsnych świń [An influence of protein level in diet of balanced digestible amino acids content on body chemical composition and protein and energy utilization in meat pigs]. *Ann. Warsaw Agric. Univ. Anim. Sci.*, 36, 63–71 [in Polish].
- Gajęcki M., 2002. Zearalenone – undesirable substances in feed. *Pol. J. Vet. Sci.*, 5(2), 117–122.
- Gajęcki M., 2009. Rozwój systemu identyfikacji obecności mikotoksyn w materiale roślinnym [The development of identification system of mycotoxins presence in plant material]. *Pasze Przem.*, 7/8/9, 41–46 [in Polish].
- Gliński Z., Kostro K., Swoboda-Mazurek M., 2002. Zoonozy XXI wieku [Zoonosis of 21st century]. *Medycyna Wet.*, 8(1), 18–22 [in Polish].
- Grajewski J., 1999. Biologiczna degradacja mikotoksyn [Biological degradation of mycotoxins]. *Pasze Przem.*, 2/3, 27–31 [in Polish].
- Grajewski J., Brujjet-Kosicka A., Twarużek M., Kosicki R., Mikłaszewska B., 2009. Wyniki wieloletnich badań mikotoksyn w produktach rolnospożywczych z uwzględnieniem pasz [The results of longstanding studies on mycotoxins in agricultural-food products, allowing fodders]. *Pasze Przem.*, 7/8/9, 34–40 [in Polish].
- Jana B., Skwarski R., 1998. Wpływ zearalenonu na funkcje rozrodcze zwierząt [An influence of zearalenone on reproductive functions of animals]. *Medycyna Wet.*, 54, 667–670 [in Polish].
- Jarczyk A., Rogiewicz A., Młynarczyk M., Banciewicz E., 2000. Próba oceny wrażliwości prosiąt na zawartość w mieszance wysokiego i niskiego stężenia ochratoxyny A oraz na obecność w niej antybiotyku [An attempt of an assessment of piglets susceptibility on high and low content of ochratoxin A and the presence of antibiotics in feed mixture]. *Biul. Nauk. UMW Olsztyn* 7, 83–90 [in Polish].
- Kiecana J., 1994. Badania nad fuzariozą kłosów jęczmienia jarego (*Horleum vulgare L.*) z uwzględnieniem podatności odmian i zawartości mikotoksyn w ziarnie [The study on fusariosis of barley ears (*Horleum vulgare L.*) allowing the susceptibility of varieties and mycotoxins content in grain]. *Rozpr. Nauk.*, 161, Wyd. AR Lublin [in Polish].
- Korniewicz A., Kaczmarek K., Kozik E., 1989. Wpływ różnych konserwantów na jakość mikrobiologiczną wilgotnego ziarna pszenicy, kukurydzy i podstawowe składniki pokarmowe [An influence of various preservatives on microbiological quality of wet grain of wheat, maize and basic nutrients]. *Rocz. Nauk. Zoot., Monogr. Rozpr.*, 27, 395–410 [in Polish].
- Korniewicz A., Kozik E., Czarnik-Matusewicz H., 1990. Wpływ Cytronu na jakość mikrobiologiczną mieszanek dla prosiąt [An influence of Cytronie on microbiological quality of mixtures for piglets]. *Rocz. Nauk. Zoot., Monogr. Rozpr.*, 28, 175–184 [in Polish].
- Korniewicz A., Kozik E., Korniewicz D., 1995. Skuteczność absorbentów kwasu propionowego i mrówkowego w konserwacji pszenicy, bobiku i mieszanki dla prosiąt [An effectiveness of propionic and formic acids absorbents in wheat, horse bean and mixture for pigs preservation]. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 22, 2, 235–246 [in Polish].

- Korniewicz D., Korniewicz A., Pałeczek B., Korniewicz M., 1996a. Efektywność kwasu fumarowego w mieszankach dla prosiąt i warchlaków [An effectiveness of fumaric acid in mixtures for piglets and weaners]. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 23, 1, 175–203 [in Polish].
- Korniewicz A., Korniewicz D., Kozik E., Pałeczek B., 1996b. Wpływ zeolitu i kwasu mrówkowego na jakość mieszanki i efekty produkcyjne prosiąt [An influence of zeolite and formic acid on mixture quality and performance results of piglets]. *Rocz. Nauk. Zoot.*, 23, 4, 181–197 [in Polish].
- Korniewicz D., 2004. Możliwości substytucji antybiotyków paszowych w mieszankach dla trzody chlewnej [The possibility of feed antibiotics substitution in mixtures for pigs]. *Zesz. Nauk. AR Wrocław nr 485, ser. Rozpr. CCXIV* [in Polish].
- Korniewicz D., Gajewczyk P., Dobrzański Z., Korniewicz A., 2009. Wpływ obniżonego poziomu białka w mieszankach pełnoporcjowych dla loch prośnych i karmiących na ilość azotu wydalanego do środowiska w odchodach oraz wskaźniki fizjologiczne [An influence of lowered protein level in feed mixtures for pregnant and lactating sows on the amount of nitrogen expelled to the environment in faeces and physiological indices] (in press) [in Polish].
- Kozik E., Korniewicz A., Czarnik-Matusiewicz H., 1992. Ocena skuteczności kwasu fumarowego jako konserwantu mieszanek treściwych [An assessment of effectiveness of fumaric acid as a preservative in feed mixtures]. *Rocz. Nauk. Zoot., ser. Monogr. Rozpr.*, 31, 349–358 [in Polish].
- Kozik E., Korniewicz A., 1993. Kwas propionowy i mrówczan sodu w konserwacji ziarna pszenicy i kukurydzy [Propionic acid and sodium formate in a preservation of wheat and maize grain]. *Rocz. Nauk. Zoot., Monogr. Rozpr.*, 32, 285–295 [in Polish].
- Kubizna J., 2009. Mikroflora grzybowa i skażenie mikotoksynami mieszanek i surowców paszowych oraz innych surowców w rejonie Polski południowo-zachodniej i zachodniej [Fungi microflora and mycotoxins contamination in mixtures, feed material and other raw materials in the region of south-west and west Poland]. *Praca dokt. UP Wrocław* [in Polish].
- Kwiatek K., Kukier E., Wasyl O., Hoszowski D., 2008. Jakość mikrobiologiczna materiałów paszowych w Polsce [Microbiological quality of feed materials in Poland]. *Medycyna Wet.*, 64(2), 193–198 [in Polish].
- Normy Żywienia Świń. Wartość pokarmowa pasz 1993 [Standards of Pigs Feeding. Nutritional value of feed mixtures]. *Omnitech Press Warszawa* [in Polish].
- Obremski K., 2001. Próba doświadczalnego ustalenia wartości diagnostycznych poziomów zearalenonu i jego metabolitów we krwi loszek [An attempt of experimental determination of values of diagnostics levels of zearalenone and its metabolites in gilts blood]. *Praca dokt. UW-M Olsztyn* [in Polish].
- Obremski K., Gajęcki M., Zwierzchowski W., Bakuła T., Apoznański J., Wojciechowski J., 2003. The level of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in the blood of gilts after feeding them of feed with a low content of zearalenone. *J. Anim. Feed Sci.*, 12, 529–538.
- Olsen M.E., Malmlof K., Pettersson H., Grajewski J., 1991. Influence of dietary fibre on plasma and urinary levels of zearalenone and metabolites in swine. *Mycotoxin Res.*, 7, 8–11.
- Polska Norma PN-EN ISO 4833:2004. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania drobnoustrojów [Polish Standard PN-EN ISO 4833:2004 Microbiology of food and fodders. Horizontal method of microorganisms determination] [in Polish].
- Polska Norma PN-ISO 795:1999. Ogólne zasady oznaczania drożdży i pleśni [Polish Standard PN-ISO 795:1999 General rules of yeasts and moulds determination] [in Polish].
- Richter W.L.F., 1988. Einfluss der Behandlung von Getreide mit Ammoniak auf die Zearalenon Intoxikation bei Schweinen. *Das wirtschaftseigene Futter*, 34, 3, 181–189.
- Richter W.L.F., 1989. Untersuchungen zur Entgiftung von zearalenonhaltiger Gerste. *Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch*, 66, 2, 219–224.



- Richter W.L.F., Lepschy J., Gleissenthal V., Linder Mayer H., Holzer A., Obst A., Gareis M., 1996. Behandlung von mit Fusarium culmorum infiziertem Winterweizen mit Konservierungsstoffen. Das wirtschaftseigene Futter, 42, 2, 143–160.
- Roth F.X., Eckel B., Kirchgessner M., Eidelsburger U., 1992. Zum Einfluss von Ameisensäure auf pH-Wert, Trockenmassegehalt, Konzentrationen an flüchtigen Fettsäuren und Milchsäure im Gastrointestinaltrakt. J. Anim. Physiol. Nutr., 67, 148–156.
- Schaefer W.R., Hermann T., Meinhold-Heerlein I., Deppert W.R., Zahradnik H.P., 2000. Exposure of human endometrium to environmental estrogens, antiandrogens, and organochlorine compounds. Fertil. Steril., 74(3), 558–563.
- Sweeney T., 2002. Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? Domest Anim. Endocrin., 23, 203–209.
- Teilmann G., Juul A., Skakkebaek N.E., Toppari J., 2002. Putative effects of endocrine disrupters on pubertal development in the human. Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism, 16(1), 105–121.
- Young L.C., McGirr L., Valli V.E., Lumsden J.H., Lun A., 1983. Vomitoxin in corn fed to young pigs. J. Anim. Sci., 57, 3, 655–664.
- Zalecenia Komisji 2006/576/WE z dnia 17 sierpnia 2006 w sprawie obecności deoksyniwalenolu, zearalenonu, ochratoxyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyny w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt [Commission recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 toxin and fumonisins in products intended for animals feeding] [in Polish].
- Zielonka Ł., Gajęcki M., Obremski K., Zwierzchowski W., 2003. Influence of low doses of deoxynivalenol applied *per os* on chosen indexes of immune response in swine. Pol. J. Vet. Sci., 6(3), 74–77.
- Zwierzchowski W., 2002. Wpływ niskiej dawki zearalenonu na układ rozrodczy niedojrzałych płciowo loszek [An influence of low zearalenone dose on reproductive system of sexually immature gilts]. Praca dokt. UW-M Olsztyn [in Polish].

## WPLYW DODATKU KONSERWANTU WIELOSKLADNIKOWEGO NA JAKOŚĆ MIKROBIOLOGICZNĄ MIESZANEK PEŁNOPORCJOWYCH DLA LOCH

**Streszczenie.** Celem podjętych badań było określenie wpływu konserwantu wieloskładnikowego w postaci sypkiej na redukcję bakterii, grzybów oraz mikotoksyn w mieszankach pełnoporcjowych przechowywanych przez 3 miesiące dla loch próśnych i karmiących. Materiał badawczy stanowiło 6 mieszanek dla loch próśnych i 6 mieszanek dla loch karmiących, różniących się poziomem białka ogólnego i dodatkiem krystalicznych aminokwasów oraz konserwantu. Mieszanki zostały wyprodukowane z tych samych komponentów według ustalonej receptury. Do mieszanek doświadczalnych dodawano konserwant w ilości 0,8%. Składnikami aktywnymi tego konserwantu były kwasy: mrówkowy, propionowy, fosforowy, cytrynowy i benzoowy. Wyprodukowane mieszanki kontrolne i z konserwantem przechowywano przez okres 3 miesięcy w warunkach magazynowych. Po 1. i 3. miesiącu przechowywania określono ogólną liczbę bakterii i grzybów, a po 3 miesiącach magazynowania określono zawartość aflatoksyny B<sub>1</sub>, ochratoxyny A, zearalenonu i deoksyniwalenolu.

Stosowany konserwant wpłynął na redukcję bakterii tlenowych mezofilnych z  $1,3 \times 10^6$  do  $3,1 \times 10^2$  oraz zmniejszenie liczby grzybów z  $3,9 \times 10^3$  do  $4,0 \times 10^1$  jtk/g. Największą redukcję

bakterii stwierdzono w mieszankach o najniższym poziomie białka z dodatkiem krystalicznych aminokwasów. Konserwant zredukował zawartość aflatoksyny B<sub>1</sub> z 2,0 do 1,0 ppb. Oceniany konserwant nie miał większego wpływu na redukcję ochratoksyny A, zearalenonu i deoksyniwalenolu. Zawartość tych mikotoksyn uległa zmniejszeniu tylko o 20 do 30%.

**Słowa kluczowe:** mieszanki paszowe, białko, bakterie tlenowe, grzyby toksynotwórcze, mikotoksyny

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.03.2010

For citation – Do cytowania: Korniewicz D., Dobrzański Z., Korniewicz A., Gajewczyk P., 2010. The effect of dietary multicomponent preservative on microbiological quality of mixtures for sows. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.*, 9(1), 3–18.

## **ANIMAL REMAINS FROM THE ARCHAEOLOGICAL EXCAVATION AT GROMNIK HILL (RUMMELSBERG) IN POLAND**

Aleksander Chrószcz<sup>1</sup>, Anna Krupska<sup>1</sup>, Maciej Janeczek<sup>1</sup>,  
Norbert Pospieszny<sup>1</sup>, Krzysztof Jaworski<sup>2</sup>, Aleksandra Pankiewicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Wrocław University of Environmental and Life Sciences

<sup>2</sup> University of Wrocław

**Abstract.** The Gromnik excavations were carried out between 2005 and 2007 as the part of an extensive scientific project. During the visual-comparative analysis the animal bone remains were identified and classified. The osteometric measurements and osteoarchaeological analysis was carried out. The osteoarchaeological investigations proved the majority of bovine remains. The shoulder height estimated and the percentage of bone remains are similar to other medieval findings in Silesia. Some marks of human activity according to the animal body utilization were described. The x-ray investigation of bovine finger skeleton with pathological changes was done.

**Key words:** osteoarchaeology, archaeozoology, species differentiation, osteometry, cattle

### **INTRODUCTION**

The zooarchaeological sources can be helpful in human environment and animal use reconstruction [Marcinak 2003]. The study on animal morphology and pathological changes observed in skeletons could not be performed successfully without the basic knowledge on animal anatomy, pathology and breeding. Therefore, authors of this study tried to describe the animal morphotype and human–animal relations on the base of accessible artifacts. We hope, the findings can be useful for other studies on animal role and its utilization in history.

Archeological site at Gromnik (Strzelińskie foothills, Lower Silesia) has been known to archeologists since the 2<sup>nd</sup> half of the 19<sup>th</sup> c. This is a multicultural site, the archeological materials from the Neolithic (Lengyel Culture), Bronze Age and early Iron Age (Lusatian Culture) and Middle Ages were found. Archeological research in 2005–2007 proved,

prehistoric artifacts (Neolith, Bronze Age and Iron Age) constitutes only a few part of total collection discovered at the site [Demidziuk 2007, Jaworski and Pankiewicz 2007].

Domination of artifacts dated to the Middle Ages is clear. During the investigations, two phases of Medieval settlement at the top of Gromnik were identified: Early Medieval phase, dated to the 2<sup>nd</sup> half of the 9<sup>th</sup> and the beginning of the 10<sup>th</sup> c., and Late Medieval (the 15<sup>th</sup> c.) phase. The first Medieval settlement was Slavic tribal stronghold. Tschirn family castle was build on the top in the 30's of the 15<sup>th</sup> c., it was destroyed after 1475. Two buildings (pit-house and frame building) discovered on the west side of the top, pits and cultural layers form the central part of the site were the parts of late settlement [Jaworski and Pankiewicz 2007]. Finally Gromnik view tower was built in 1825 with basal part of the rotunda ruins use. Latter building was completely destroyed during the Second World War [Małachowicz 2007].

A masonry sacral structure (a rotunda with two apses), which was discovered in the centre of the top, may be also dated back to the Middle Ages. Linking this construction to the older or younger phase of Medieval settlement is impossible now. Its form resembles the design typical for sacral architecture from the 9<sup>th</sup> – beginning of the 10<sup>th</sup> c., but the layers inside this building proved its late Medieval chronology [Jaworski and Pankiewicz 2007].

## MATERIAL AND METHODS

The animal remains consist of 912 bones, the majority of them were strongly fragmented. According to chronology, the whole material was divided in two parts: Early Medieval settlement remains (the 2<sup>nd</sup> half of the 9<sup>th</sup> – beginning of the 10<sup>th</sup> c.) and knight's castle artifacts from 15<sup>th</sup> century.

The investigated material was identified according to methods introduced by Driesch [1976], Bocheński et al. [2000] and Lasota-Moskalewska [2008]. The osteometric measurements, sex identification and animal height estimation were carried out with use of procedures proposed by Boessneck [1956], Całkin [1960], Howard [1963], Fock [1966].

We attempted to state some hypothesis due to human life style and animal use in this historic period.

## RESULTS

The species analysis of archaeological bone remains form Gromnik was presented in Diagram 1. Due to the bone fragments condition, the species identification was successful in 67%. The unidentified bone material equals 33%. The anatomical analysis of identified animal skeleton remains was displayed in Table 1. The comparison of two investigated animal bones groups proved small differences between them (Diag. 2), except the last one (species unknown). The osteological measurements of the metapodial bones and the shoulder height calculations in cattle was shown in Table 2. The mean value of these calculations equals 1107,98 mm and 1116,79 mm for the metacarpal bones and 1087,72 mm for the metatarsal bone. The examples of human and animal activity visible in the bone surface was presented in Figures 1–4 and 6. The radiographic image of the bovine finger skeleton was shown in Figure 5.

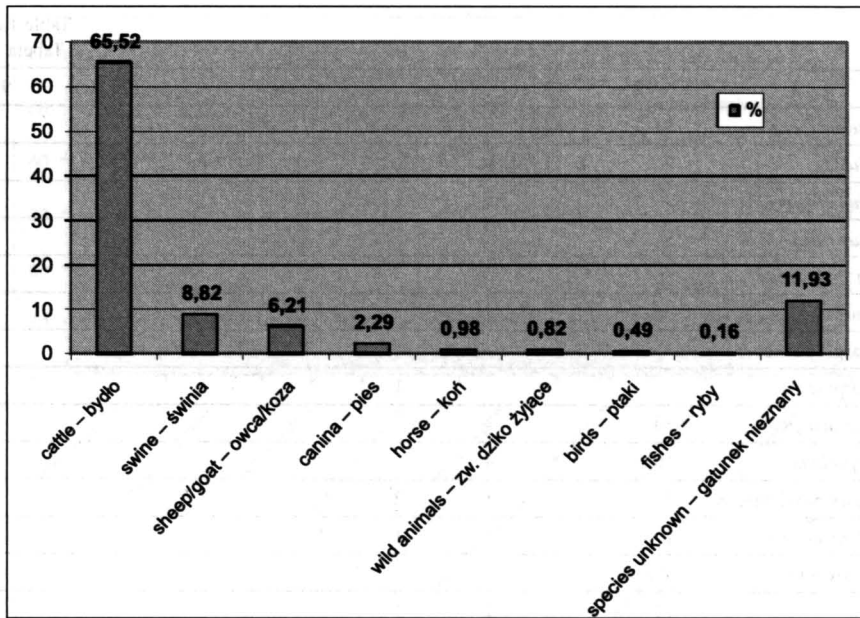


Diagram 1. The percent participation in Gromnik osteological remains

Diagram 1. Udział procentowy szczątków kostnych poszczególnych gatunków zwierząt w znaleziskach z Gromnika]

Table 1. Detailed partition of bone remains in Gromnik archeological site (pp. – probably)

Tabela 1. Szczegółowy rozkład szczątków kostnych w stanowisku gromnickim (pp – prawdopodobnie)

Fragment kostny Bone fragment	Bydło Cattle	Świnia Pig	Koza/ Owca Goat/Sheep	Pies Dog	Koń Horse	Zw. dziko żyjące Wild-living animals	Gatunek nieznan Species unknown	Ptaki Birds
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Cranium</b>	21	5			1		8	
<i>Dentes</i> (fragm.)		8						
<i>Dentes incisivi</i>	2	1		3		1 pp.		
<i>Dentes buccales</i>	14	11	5					
<i>Dentes buccales</i> (juv.)	3				2			
<b>Vertebrae</b>	30	7			1 (pp), 1		2	
<i>Costae</i>	69	5	2	3	1		22	
<b>Sternum</b>							1	
<i>Scapula</i>	26		6				4	
<i>Humerus</i>	37	3	6	2				

Table 1 cont.  
Tabela 1 cd.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Humerus (juv.)</i>	3							
<i>Radius</i>	9	6	1			1 pp.	2	
<i>Radius et Ulna</i>	3							
<i>Radius (juv.)</i>	3							
<i>Ulna</i>	15							
<i>Os carpi</i>		1					1	
<i>Os carpi radiale</i>		1						
<i>Os carpale IV</i>				1				
<i>Os metacarpale</i>	30		1					
<i>Metapodium</i>	40		4					
<i>Phalanx proximale</i>	4		1	2				
<i>Phalanx media</i>	2			1				
<i>Phalanx distale</i>	4							
<i>Pelvis</i>	14		1	1				
<i>Pelvis (juv.)</i>				1				
<i>Acetabulum</i>	5						1	
<i>Femur</i>	12	1				1 pp.	6	
<i>Femur (juv.)</i>	1		1	1			1	
<i>Patella</i>	1							
<i>Tibia</i>	31	2	8			1 pp.		
<i>Tibia (juv.)</i>	2							
<i>Fibula</i>		1						
<i>Os maleolare</i>	1							
<i>Talus</i>	3							
<i>Calcaneus</i>	9	1	1					
<i>Calcaneus (juv.)</i>	1	1						
<i>Os tarsale centroquartale</i>	1		1					
<i>Os metatarsale</i>	5					1 pp.		
<i>Os longum</i>							25	2
<i>Os coracoideum</i>								1
<i>Os talotibiale</i>								1
<i>Femur (aves)</i>								1

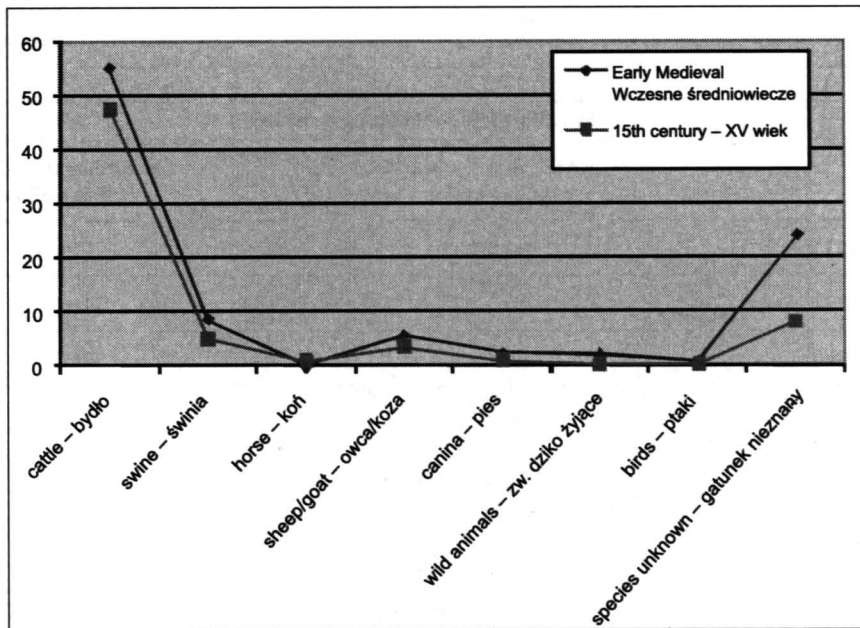


Diagram 2. The comparison of osteological remains from early Middle Ages and 15th century  
Diagram 2. Porównanie rozkładu gatunkowego szczątków kostnych datowanych na wczesne średniowiecze i wiek XV

Table 2. The shoulder height estimation based on metapodial measurements in cattle [mm] (GL – the greatest length of metapodium, Bp – the greatest breadth of proximal metapodium extremity, Bd – the greatest breadth of distal metapodium extremity, KD – the smallest breadth of metapodium body, UD – the smallest circumference of metapodium body)

Tabela 2. Wysokość w kłębie ustalona na podstawie pomiarów kości metapodium bydła (GL – największa długość kości metapodium, Bp – największa szerokość końca bliższego kości metapodium, Bd – największa szerokość końca dalszego kości metapodium, KD – najmniejsza szerokość trzonu kości metapodium, UD – najmniejszy obwód trzonu kości metapodium)

Nr of bone remain Nr inwentarzowy szczątku kostnego	Bone fragment Fragment kostny	GL	Bp	Bd	KD	UD
1	2	3	4	5	6	7
213/07	os metacarpale	179,65	48,13	49,35	25,62	–
213/07	os metacarpale	186,71	52,56	51,69	28,22	8,44
65/07	os metatarsale	199,95	46,51	52,06	27,65	9,45

Table 2 cont.  
Tabela 2 cd.

1	2	3	4	5	6	7
Shoulder height – Wysokość w kłębie						
		According to Fock Według Focka	According to Boessneck Według Boessnecka	According to Calkin Według Calkina		
213/07	<i>os metacarpale</i>	1077,9	1133,59	1074,31		
213/07	<i>os metacarpale</i>	1120,26	1178,14	1116,53		
65/07	<i>os metatarsale</i>	1069,7	1125,72	1067,73		

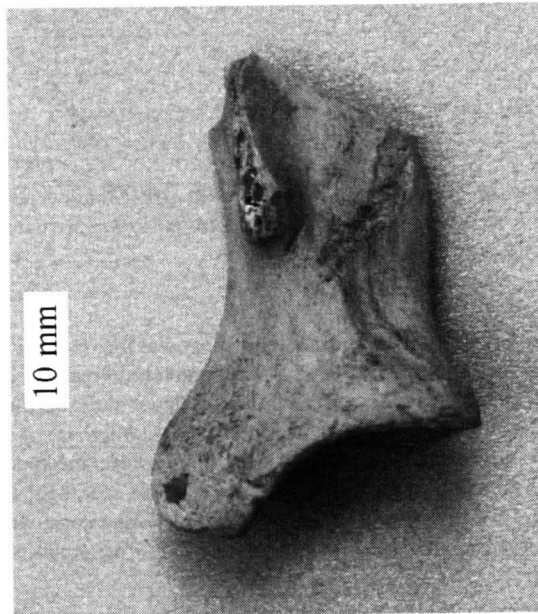


Fig. 1. Distal part of sheep/goat scapula. The results of hewing the glenoidal cavity from the rest of scapula

Ryc. 1. Odcinek dalszy łopatki owcy/kozy. Oddzielenie panewki łopatki od reszty kości jest wynikiem czynności związanych z podziałem tuszy





Fig. 2. Bovine thoracic limb skeleton. The long bones body broken apart caused by human activity

Ryc. 2. Elementy szkieletu kończyny piersiowej bydła. Rozłupanie trzonów kości długich jest przejawem działalności ludzkiej

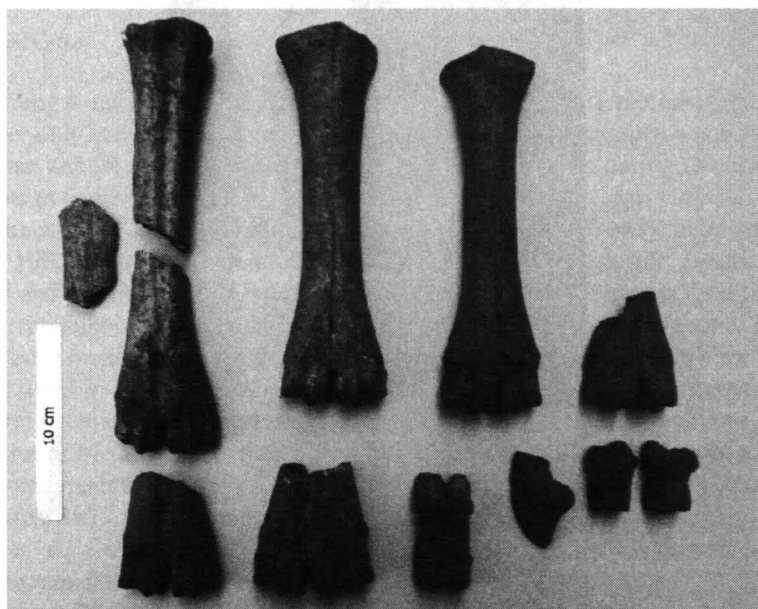


Fig. 3. Examples of distal parts of the bovine limb skeleton

Ryc. 3. Przykłady zachowanych części obwodowych szkieletu kończyn bydła

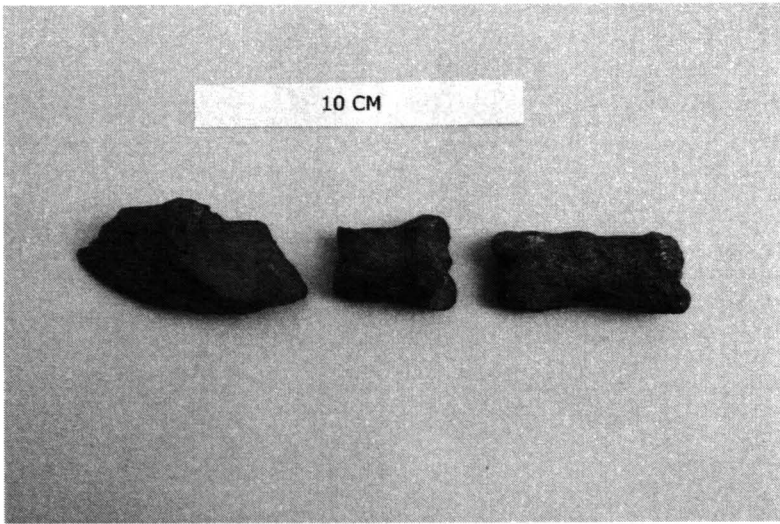


Fig. 4. Bovine finger with pathological changes

Ryc. 4. Kości palca bydła ze zmianami patologicznymi

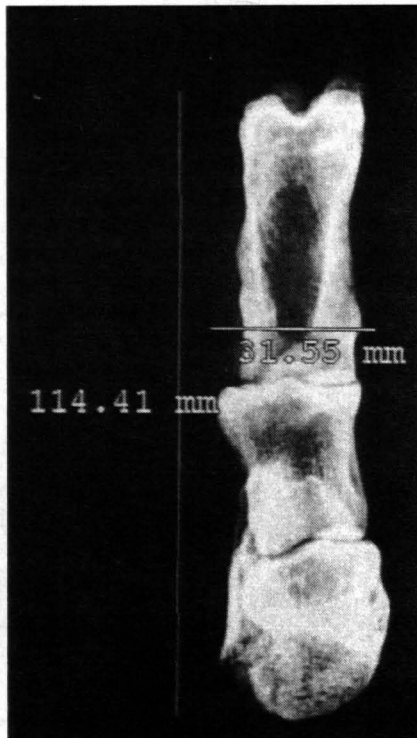


Fig. 5. Radiographic picture of bovine finger bones with bone tissue changes

Ryc. 5. Radiogram palca bydła z widocznymi zmianami struktury tkanki kostnej

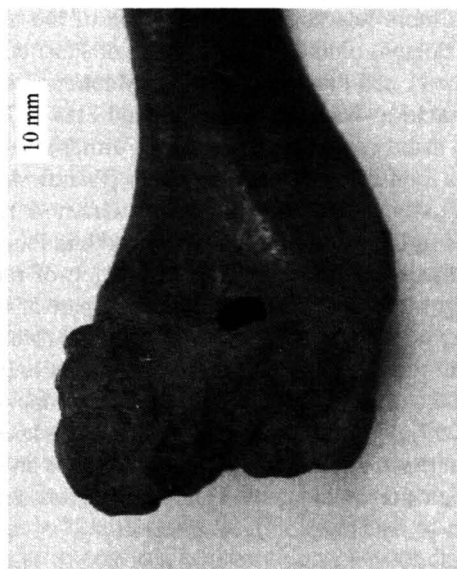


Fig. 6. Distal extremity of pig's humerus. The bone scraps were thrown out and it were the objects of canine manipulations

Ryc. 6. Koniec dalszy kości ramiennej świni. Szczątek kostny został wyrzucony, a następnie stał się obiektem manipulacji psa

## DISCUSSION

According to the suggestions introduced by Marciniak [2003], our investigations will include not only standard procedures used in archaeozoology, but also we would like to describe the animal role and husbandry in human environment during the existence of settlements in Gromnik.

The archaeological investigations stated the hypothesis of early uninhabitation in Gromnik Hill, but it would be probably the place of worship during Lusatian culture [Jaworski and Pankiewicz 2007]. Very low quantity of ceramic remains from this period and the great number of well known lusatian colonization places at the foot of hill could confirm above mentioned assumption [Gaik et al. 2005, Jaworski and Pankiewicz 2007]. The exact worship center location was not discovered. Even ignoring the chronology, the post-offering character of these findings can not be proved. Other excavations in Silesia proved a lot of Medieval settlements with the great number of bone remains and its quantitative and qualitative character is similar to observed in Gromnik Hill [Chrzanowska 1975, Wyrost 1979, Chrzanowska and Krupska 2001]. It is clear, the majority of bovine remains, ca. 67% of total bones amount (Diag. 1). Therefore this work concentrates on cattle bone remains.

The Gromnik stronghold area was estimated on 3000 m<sup>2</sup>. On the contrary to others Slesian settlements, it was one of the largest. Moreover, the existence of double absided rotunda at the hill top, probably from the Great Moravian period, makes this archaeo-

logical excavation even more interesting, as a location of the oldest place of christian worship in Silesia and Poland, older than foundations of Piast and Přemyslovci dynasty [Profantová 2003, Jaworski and Pankiewicz 2007]. Mentioned rotunda seems to be similar to the buildings found in Wawel Hill [Kozieł and Fraś 1979] and from Mikulčice [Profantova 2003], both dated to the 9<sup>th</sup>–10<sup>th</sup> century. Further investigations carried out in Wawel Hill transpose its foundation to the 11<sup>th</sup> century [Pianowski 2004]. If double absided rotunda were built at Wawel Hill, it would exist at Gromnik Hill, too. Unfortunately, the exact dating requires further investigations [Jaworski and Pankiewicz 2007].

Probably, the Late Medieval rebuilding and adaptation of rotunda to new function caused the lack of Early Medieval findings in the west part of building [Jaworski and Pankiewicz 2007]. Moreover, the great number of bones in rotunda wall neighborhood and before late medieval fortifications might be result of its removal and translocation during the adaptation of the rotunda to the new Renaissance function (chapel of Gromnik castle) [Małachowicz 2007]. Rebuildings and long carelessness periods caused the archaeological remains dislocations. These circumstances influence on the bone condition was observed in other Silesian sites [Chrzanowska 1975, Krupska and Chrzanowska 2003]. The great fragmentation of archaeozoological material proved also its postconsumptive character [Chrószcz et al. 2007, Lasota-Moskalewska 2008]. The majority of excavated remains come from the 15<sup>th</sup> century.

The comparison of osteological remains from Early Middle Ages and the 15<sup>th</sup> century proved similar distribution of findings (Diag. 2). Only the last group containing unknown species was considerably larger in Early Medieval period, probably due to taphonomic factors. The bone fragmentation and some burned up remains occurrence was the result of animal body partition and other culinary processes performed by denizens of Gromnik. The marks of the human activities were demonstrated as the lack of not fragmented vertebrae, hewing the glenoidal cavity from the rest of scapula common not only in cattle, but also in pig and small ruminants (Fig. 1) and breaking apart of the long bones bodies (Fig. 2). The similar observation were frequently described in literature [Sobociński 1957, Marciniak 2003, Lasota-Moskalewska 2008]. Additionally, some bite marks in the surface of humeral trochlea proved, the bone scraps were thrown out and became the objects of canine manipulations (Fig. 6) [Wojtal 2007].

The great number of cattle and swine remains is typical for the archaeozoological material from the majority of Germanic and Slavic Early Medieval settlements, as a result of the domestic animal breeding, husbandry and utilization manners [Bökönyi 1974, Skibniewski et al. 2007]. The skeletal remains of cattle and swine had usually been accompanied by few horse, dog and small ruminants bones [Bökönyi 1974]. Both tendencies are clearly visible in osteoarchaeological investigation results in Gromnik (Diag. 1 and 2). The epiphyseal cartilages ossification proved, the animals were usually adult and their utilization was planned and reasonable, similar to observed in other Silesian settlements from the same period [Chrzanowska 1975, Krupska and Chrzanowska 2003].

The most numerous and interesting remains belong to postcranial skeleton of cattle (65,25%). The lack of larger young animal bone remains group proved the cattle use as drought animal and milk source. The distal parts of cattle limbs, as a less attractive, occurred undestroyed (Fig. 3). The bovine phalanxes findings in material form investigated site allow to state the animal skinning and maybe rawhide tanning within the settlement. Moreover, the sex identification and shoulder height calculation was possible only in

three animals (Medieval cattle). According to Howard [1963], the metapodias were classified as coming from female and/or ox. Additionally, Całkin method [1960] supports the thesis, that two metacarpal bones come from female, but the metatarsal bone sex identification is unclear. These results are only the hypothesis due to few measurable metapodial remains, but other authors proved the majority of female bones in excavations from this period [Chrzanowska 1975, Krupska and Chrzanowska 2003]. The shoulder height was estimated for cattle [Boessneck 1956, Całkin 1960, Fock 1966]. The results characterized the similar value (Tab. 2) and they were comparable to the shoulder height estimated by other authors on the basis of remains from similar period and territory [Chrzanowska 1975, Chrzanowska and Krupska 2001, Krupska and Chrzanowska 2003, Skibniewski et al. 2007]. The animals from Gromnik Hill were shorter than today or Neolithic, but breeding, husbandry and utilization manner in Medieval not allows for full genotypic expression [Skibniewski et al. 2007]. The strong fragmentation of bone material and the lack of large cranial skeleton fragments made the bovine morphotype analysis impossible.

The pathological structures observed in bovine bones allow to assume possible cattle utilization as a draught animals, typical for the Middle Ages [von den Driesch 1976, Bartosiewicz 1997, Lasota-Moskalewska 2008]. The deformations of vertebrae, ribs or limb bones caused by injuries, chronic inflammations, bovine diseases or husbandry factors were often described in literature [Szeligowski et al. 1997, Chrzanowska and Siembieda 2003, Skibniewski et al. 2007]. Similar changes in captive animals were described [O'Regan et al. 2006]. The radiographic investigation proved condensation of the bone tissue and blurred lamellar bone structure (Fig. 5). The border between osseous tissue and marrow cavity was indistinct. These changes suggest chronic osteomyelitis, often caused of the puncture wound infection. During disease serious pain and lameness is well known. It is impossible to state, if these changes were congenital or posttraumatic in character. Sometimes the long-lasting overloading of the limb or hard floor can be the cause of similar deformation. These posture of the digit indicate clearly the lesion of the digital ligaments apparatus. Furthermore the abaxial orientation of the digit predisposes to injury [Cupere de et al. 2000, Parizi-Meimandi 2007]. If this animal was used as draught animal, it was too young or the animal breeding, husbandry and care were not free of mistakes.

Some marks of human activity occurred in the body surface of bovine humeral bone. The fragment of superficial layer of bone tissue was cut out and removed, but the aim of this procedure remains unknown.

Other animals bone remains are the minority of investigated material (Diag. 1 and 2). Their proportions are similar to observed in other silesian archeological sites [Chrzanowska 1975, Chrzanowska and Krupska 2001, Krupska and Chrzanowska 2003].

## CONCLUSION

The supremacy of bovine osteological remains at Gromnik Hill excavations and low existence of young animal skeletal fragments can be the result of affluence and fastidiousness increase among the inhabitants of Gromnik Hill. The same tendency occurred at other settlements in Silesia between 10<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> century. Other species was represented by the lower amount of bone remains, which were also strongly fragmented. The condition of animal bone remains proved the most probably its post-consumptive character.

## REFERENCES

- Bartosiewicz L., 1997. Draught cattle, their osteological identification and history. *Ann. Sci. Zool.* 281, 9–147.
- Bocheński Z., Lasota-Moskalewska A., Bocheński Z., Tomek T., 2000. *Podstawy archeozoologii. Ptaki.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Boessneck J., 1956. Ein Beitrag zur Errechnung der Widerristhoehe nach Metapodienmasen bei Rindern. *Zeitschrift Tierzucht u. Zuchtungsbiol.*, 68, 75–90.
- Bökönyi S., 1974. *History of domestic mammals in central and eastern Europe.* Akademiai Kiado, Budapest.
- Całkin W., 1960. Izmiencziwost metapodii i jej znaczenie dla izuczenija krupnogo rogatego skota driewnosti. *Bull. Moskovsk. Obsh. Ispytat. Prir.*, 65, 109–126.
- Chrószcz A., Krupska A., Pospieszny N., 2007. Szczątki kostne zwierząt ze średniowiecznego stanowiska archeologicznego na górze Gromnik, [w:] Jaworski K., Pankiewicz A. (Eds.). *Gromnik. Z dziejów zasiedlenia i zagospodarowania szczytu.* Instytut Archeologii Uniwersytetu Wrocławskiego, 129–142.
- Chrzanowska W., 1975. Die Knochenreste des Rindes (*Bos primigenius f. taurus*) aus fruehmittelalterlichen Staedten Opole und Wrocław. *Zool. Pol.*, 25 (2–3), 119–162.
- Chrzanowska W., Krupska A., 2001. Szkielety zwierzęce z wykopalisk w Sobótce z roku 2001. *Śl. Spraw. Archeol.*, 43, 473–478.
- Chrzanowska W., Siembieda J., 2003. Pathologische Veraenderungen Haustierknochen von Mikulčice, [in:] Polaček L. (ed.). *Studien zum Burgwall von Mikulčice.* Institute of Archaeology Czech Academy of Sciences Brno 5, 139–149.
- Cupere de B., Lentacer A., Neer van W., Waelkens M., Verslype L., 2000. Osteological Evidence for the Draught Exploitation of Cattle: First Applications of a new Methodology. *Int. J. Osteoarch.*, 10, 254–267.
- Demidziuk K., 2007. Wrocławskie archiwalia aktowe sprzed 1945 roku do archeologii Gromnika, [w:] Jaworski K., Pankiewicz A. (Eds.). *Gromnik. Z dziejów zasiedlenia i zagospodarowania szczytu.* Instytut Archeologii Uniwersytetu Wrocławskiego, 25–48.
- Driesch von den A., 1976. *Das Vermessen von Tierknochen aus vor- und fruehgeschichtlichen Siedlungen.* Institut fuer Palaeoanatomie, Domestikationsforschung und Geschichte der Tiermedizin der LMU, Muenchen.
- Fock J., 1966. *Metrische Untersuchungen an Metapodien einiger europaeischer Rindrassen.* Dissertation Muenchen.
- Gaik E., Gołaszewski J., Stelmach R., Zarzycka H., Maciejewski W., 2005. *Przeworno. Historia i terażniejszość. Przeworno.*
- Howard M.M., 1963. The metrical attributes of two samples of bovine limb bones. *J. Zool. Lond.*, 157, 91–100.
- Jaworski K., Pankiewicz A., 2007. Badania archeologiczne na szczycie Gromnika po II Wojnie Światowej, [w:] Jaworski K., Pankiewicz A. (Eds.). *Gromnik. Z dziejów zasiedlenia i zagospodarowania szczytu.* Instytut Archeologii Uniwersytetu Wrocławskiego, 79–121.
- Krupska A., Chrzanowska W., 2003. Zwierzęce szczątki kostne z wielokulturowego stanowiska Wilkowice 8, woj. dolnośląskie, [in:] Gediga B., *Archeologiczne Zeszyty Autostradowe. Badania na autostradzie A4.* Instytut Archeologii i Etnologii PAN, Wrocław 2(1), 355–369.
- Lasota-Moskalewska A. (Ed.). 2008. *Archeozoologia. Ssaki.* WUW, Warszawa.
- Małachowicz M., 2007. Dzieje zabudowy Gromnika, [in:] Jaworski K., Pankiewicz A. (Eds.). *Gromnik. Z dziejów zasiedlenia i zagospodarowania szczytu.* Instytut Archeologii Uniwersytetu Wrocławskiego, 49–78.
- Marciniak A., 2003. What is 'natural' in the archaeozoological Animals bone assemblage? Taphonomic and statistical arguments. *Archeozool. Poznań–Katowice* 21, 121–134.

- O'Regan H., Turner A., Sabin R., 2006. Medieval big cats remains from the Royal Menagerie in the Tower of London. *Int. J. Osteoarch.*, 16, 385–394.
- Parizi-Meimandi A., Shakeri A.M., 2007. Abattoir study of radiographic changes of bones and joints of digital region in cattle with abnormal claws. *Vet. Arch.*, 77(2), 187–194.
- Pianowski Z., 2004. Który Bolesław – problem początków architektury monumentalnej w Małopolsce, [w:] *Początki architektury monumentalnej w Polsce. Materiały z sesji naukowej. Gniezno, 20 - 21 listopada 2003*, 257–283.
- Profantová N., 2003. Mikulčice – pohřebiště u 6. a 12. kostela. *Spisy ARU, Brno*.
- Skibniewski M., Kobryń H., Skibniewska E., 2007. Wysokość w kłębie bydła domowego średniowiecznej Polski. *Med. Wet.*, 63(3), 369–372.
- Sobociński M., 1957. Co mówią szczątki zwierzęce o spożywaniu mięsa przez naszych przodków. *Z Otchł. Wieków*, 23, 205–207.
- Szeligowski E., Żakiewicz M., Kłos Z., Janicki M., Sterne J., 1997. *Chirurgia Weterynaryjna Kulczyckiego. PWRiL, Warszawa*.
- Wojtal P., 2007. *Zooarchaeological studies of the late pleistocene sites in Poland. Instytut Systematyki i Ewolucji Zwierząt PAN, Kraków*.
- Wyrost P., 1979. Wyniki dotychczasowych badań archeozoologicznych nad kostnym materiałem wykopaliskowym z Ostrówka w Opolu, [w:] *Ziarko S (red.). Kształtowanie się kultury wczesnopolskiej na Opolszczyźnie. WOINTiE, Opole*, 105–134.

## **SZCZĄTKI KOSTNE ZWIERZĄT ZE STANOWISKA ARCHEOLOGICZNEGO NA GÓRZE GROMNIK, POLSKA DATOWANYCH NA WCZESNE ŚREDNIOWIECZE I XV WIEK**

**Streszczenie.** Badania archeologiczne na górze Gromnik były prowadzone w latach 2005–2007 jako część szeroko zakrojonego programu badawczego. Podczas analizy wzrokowo-porównawczej pozyskane szczątki kostne zwierząt zostały zidentyfikowane i sklasyfikowane. Przeprowadzono badania osteometryczne i archeozoologiczne. Badania archeozoologiczne wykazały dominację pozostałości kostnych po bydło. Udział procentowy szczątków pochodzących od poszczególnych gatunków zwierząt, jak i szacowana wysokość w kłębie odpowiadają wynikom uzyskanym z innych średniowiecznych stanowisk archeologicznych na terenie Śląska. Opisano zauważone ślady aktywności ludzkiej pozostawione na szczątkach kostnych. Ustalono prawdopodobny typ użytkowania zwierząt. Przeprowadzono badanie radiograficzne kości szkieletu palca bydła ze zmianami patologicznymi.

**Słowa kluczowe:** osteoarcheologia, archaeozoologia, różnicowanie gatunków, osteometria, bydło

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.03.2010

For citation – Do cytowania: Chrószcz A., Krupska A., Janeczek M., Pospieszny N., Jaworski K., Pankiewicz A., 2010. Animal remains from the archaeological excavation at Gromnik Hill (Rummelsberg) in Poland. *Acta Sci. Pol. Med. Wet.* 9(1), 19–31.





## OCENA MIKROBIOLOGICZNA KARPI HANDLOWYCH POCHODZĄCYCH Z WYBRANYCH STAWÓW WOJEWÓDZTWA DOLNOŚLĄSKIEGO

Iwona Zacharow, Joanna Snoch-Bajek, Wiktor Niemczuk

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** Celem badań było zweryfikowanie hipotezy, że klinicznie zdrowe karpie handlowe są wolne od patogenów.

Do badań użyto handlowych karp z 9 gospodarstw województwa w okresie od 28 listopada do 7 grudnia 2009 r. Łącznie zbadano 45 zdrowych klinicznie karp o łącznej masie ciała 900–1800 g, od których pobrano próbki narządów wewnętrznych do badań bakteriologicznych.

Do diagnozy izolatów użyto szybkiego 4-godzinnego testu biochemicznego RapiID Nf Plus System.

U 42 ryb posiewy były jałowe, natomiast bakterie wyosobniono od 3 ryb, z których w 2 przypadkach stwierdzono z 99,83% prawdopodobieństwem *Acinetobacter baumannii* complex, a w jednym przypadku z 99,99% prawdopodobieństwem *Burkholderia cepacia*.

Wyzolowane szczepy bakteryjne badano również pod kątem antybiotykooporności metodą krążków dyfuzyjnych, stwierdzając brak ich wrażliwości na aminopenicyliny.

Wyzolowane szczepy bakteryjne są nietypowe dla ryb oraz mogą być patogenne dla człowieka.

**Słowa kluczowe:** karp, ocena mikrobiologiczna

### WSTĘP

Ryby są zwierzętami poikilotermicznymi, stąd bakterie u nich bytujące należą zarówno do mezofili, jak i psychrofilii. U słodkowodnych karp najczęściej stwierdza się bakterie z rodzajów *Aeromonas* i *Pseudomonas* [Harnisz i in. 2004], które są powszechne w środowisku wodnym oraz w tkankach ryb podczas procesów chorobowych.

Zanieczyszczenie ryb bakteriami może też mieć miejsce w chłodniach, w których drobnoustroje mogą silnie się namnażać [Prost 1980]. Zachorowania ludzi wywołane bakteriami ryb najczęściej występują w wyniku spożycia ryb poddanych niedostatecznej obróbce termicznej, jak też wskutek przyrannych infekcji podczas przygotowywania potraw.

Takie przypadki odnotowuje się szczególnie w krajach azjatyckich, gdzie ludzie znacznie częściej patroszą ryby samodzielnie [Bednarski i in. 2007]. W Polsce zakażenia przyranne notowane są najczęściej u rybaków śródlądowych.

Zainteresowanie rybami rośnie w okresie Świąt Bożego Narodzenia, kiedy to odbywa się sprzedaż żywych karpie handlowych.

Nadzór weterynaryjny sprawowany przez Inspekcję Weterynaryjną ogranicza się do sprawdzenia spełniania formalnych wymogów weterynaryjnych oraz nadania numerów ewidencyjnych producentom, co upoważnia ich do sprzedaży bezpośredniej towaru na wolnym rynku. Obecnie towar taki nie musi być badany, a tym samym hodowca nie legitymuje się żadnym świadectwem zdrowia.

Prezentowane badania miały na celu określenie, czy klinicznie zdrowe, żywe karpie handlowe, pochodzące z różnych gospodarstw znajdujących się w odmiennych warunkach środowiskowych, są wolne od patogenów.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto karpie handlowych pochodzących z 9 różnych, znacznie od siebie oddalonych gospodarstw oznaczonych numerami od 1 do 9. Pięć gospodarstw zlokalizowanych było w obrębie zlewni rzeki Baryczy. Trzy kolejne mieściły się w obrębie innej zlewni, w tym jedno z nich zasilane było okresowo wodą z oczyszczalni ścieków. Dotyczyło to jednego prywatnego stawu, nie będącego magazynem, o mieszanej obsadzie, z której dopiero planowano odłowienie większych sztuk do sprzedaży do celów konsumpcyjnych. Ryby odławiano w okresie od 28 listopada do 7 grudnia 2009 r., a pobierano je losowo, odrzucając sztuki z zewnętrznymi uszkodzeniami skóry.

W każdym gospodarstwie badaniom poddawano po 5 karpie handlowych o masie ciała od 900 do 1800 g, poza jednym przypadkiem, kiedy masa ryb mieściła się w granicach 500–800 g. Ponadto zbadano również liny o masie ciała 250–350 g. Łącznie zbadano 45 karpie i 2 liny. Wszystkie ryby były klinicznie zdrowe i charakteryzowały się bardzo dobrym stanem powłok zewnętrznych.

Po oszołomieniu i zniszczeniu rdzenia ryb, w celu wyeliminowania saprofitycznej flory fizjologicznej, która mogła zanieczyścić narządy wewnętrzne, płukano karpie pod bieżącą wodą, a następnie przemywano jałowym płynem fizjologicznym. Po odkażeniu linii cięcia i otwarciu powłok pobierano w jałowy sposób całe nerki i wycinki wątrobotrzustek, które do czasu badań umieszczano w próbkach wypełnionych ok. 2 ml jałowego PBS z 0,1% dodatkiem peptonu. Otrzymano w ten sposób 47 próbek z wątrobotrzustek oraz 47 próbek nerek.

Zawartości próbek po aseptycznym przeniesieniu do komory laminarnej były homogenizowane w jałowych moździerzach. Z każdej próbki posiewano ok. 100  $\mu$ l homogenatu na podłoża MCConcey'a i agar krwawy z 5% dodatkiem krwi barana, rozpraszając materiał eż w sposób sektorkowy. Tak posiane podłoża inkubowano

w temperaturze 25°C przez 24–72 h oraz 37°C przez 24–48 h. Po 24 h inkubacji odczytywano wstępny wzrost na podłożach stałych, który porównywano ze wzrostem po 48 lub 72 h.

Z otrzymanych kolonii wykonywano preparaty barwione metodą Grama w celu wstępnej oceny morfologii kolonii. W przypadku laktozo-ujemnych pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* sprawdzano zdolność bakterii do wytwarzania oksydazy cytochromowej, specjalnie przeznaczonymi do tego komercyjnymi odczynnikami firmy Bio Merieux.

Do diagnozy izolatów użyto szybkiego 4-godzinnego testu biochemicznego RapID Nf Plus System, inkubowanego w temperaturze 35°C, oceniając zdolność bakterii do wytwarzania tiosulfatazy, produkcji dehydralazy argininy i esteraz, hydrolizy p-nitrofenylo-N-acetylo-β, D-glukozaminy, p-nitrofenylo-α, D-glukozydu, p-nitrofenylo-β, D-glukozydu i o-nitrofenylo-β, D-galaktozydozy (ONPG), produkcji ureazy oraz fermentacji glukozy [Kitch i in. 1992].

Wyniki odczytywano na podstawie zmiany kolorów wynikających z reakcji biochemicznych zachodzących w poszczególnych dołkach zestawu. Rezultaty badań zostały potwierdzone z użyciem programu komputerowego ERIC (Electronic RapID Compendium) firmy REMEL, dołączonego do ww. zestawu diagnostycznego, obliczającego największe prawdopodobieństwo wystąpienia danego patogenu.

Wyizolowane szczepy bakteryjne badano również pod kątem antybiotykooporności metodą krążków dyfuzyjnych. Na podłożu Mueller-Hinton rozprowadzono zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Po nałożeniu krążków płytki inkubowano 24 godziny, w warunkach tlenowych, w temperaturze 35°C.

Do badań użyto krążków nasyconych antybiotykami i chemioterapeutykami stosowanymi powszechnie w terapii słodkowodnych ryb handlowych, a wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki badania oporności wyhodowanych szczepów na wybrane antybiotyki  
Table 1. Results of resistance the cultivated bacterial strains to the chosen antibiotics

<i>Acinetobacter baumani complex</i>	
chemioterapeutyk	wrażliwość <i>in vitro</i>
amoksylicyna 25 µg	R
amoksylicyna z kwasem klawulanowym 30 µg	R
flumequine 30 µg	S
florfenikol 30 µg	S
ciprofloksacyna 5 µg	S
doksycyklina 30 µg	S
enrofloksacyna 5 µg	S
oksytetracyklina 30 µg	S

Objaśnienia: S – wrażliwy, R – oporny  
Explanations: S – sensitive, R – resistance

## WYNIKI BADAŃ I OMÓWIENIE

U badanych 42 ryb posiewy były jałowe. Bakterie wyhodowano jedynie od nielicznych ryb z trzech gospodarstw (nr 2, 3 i 5), spośród których w dwóch przypadkach (gospodarstwa nr 3 i 5) oznaczono z 99,83% prawdopodobieństwem bakterie z rodzaju *Acinetobacter baumannii complex*, a w jednym (gospodarstwo nr 2) z rodzaju *Burkholderia* (*Pseudomonas*), gatunek *Burkholderia cepacia*.

*Acinetobacter baumannii complex spp.* wyizolowano od ryb pochodzących z gospodarstwa nr 5 położonego w obrębie rzeki Barycz oraz od karpia pochodzących ze stawów znajdujących się w obrębie innej zlewni (nr 3). Z tego też rejonu pochodziły ryby handlowe, od których wyizolowano *B. cepacia*, potwierdzoną z 99,99% prawdopodobieństwem przy użyciu ww. testu. W drugim obiekcie (nr 3), w którym istniało realne prawdopodobieństwo dostawania się wody z oczyszczalni ścieków, wyizolowano bakterie z rodzaju *Acinetobacter spp.*

W prezentowanym doświadczeniu nie stwierdzono obecności bakterii z rodzaju *Aeromonas*, który należy do drobnoustrojów najbardziej rozpowszechnionych w środowisku wodnym naszej szerokości geograficznej. Rodzaj ten namnaża się szczególnie obficie w bogatej w biogeny wodzie, którą jest z zasady woda stawów karpowych. Bakterie te są często przyczyną zmian chorobowych o różnym nasileniu u karpia. Mogą wywoływać objawy posocznicowe (tzw. ruchliwe *Aeromonas*) lub niejednokrotnie rozległe zmiany skórne w postaci jej zapalenia oraz wrzodów. Zaawansowane zewnętrzne zmiany, przynajmniej ze względów estetycznych, dyskwalifikują karpia na cele konsumpcyjne.

Bakterie z rodzaju *Acinetobacter spp.*, chociaż rzadko występujące i nietypowe dla ryb, stwierdzano zarówno u karpia [Pękała 2007], jak i u innych gatunków ryb [Grawiński i in. 2009]. Pękała [2007] odnotowała dwa przypadki choroby wywołanej przez *Acinetobacter spp.* u karpia handlowych, stwierdzając śnięcia z objawami ze strony skóry i skrzelii.

Chociaż Gram-ujemne pałeczki powszechnie występujące w wodach słodkich i morskich [Grawiński i in. 2009] u ryb dotychczas były rzadko stwierdzane, ostatnio coraz częstsze ich występowanie może łączyć się ze zmianą warunków środowiskowych.

Patogenność tych bakterii dla ryb jest mało poznana, chociaż spotyka się je zarówno u ryb śródlądowych, jak i morskich. *Acinetobacter spp.* mogą być przyczyną tzw. wewnątrzszpitalnych trudnych do leczenia zakażeń, prowadzących nawet do sepsy [Grawiński i in. 2009].

Bakterie z rodzaju *Pseudomonas spp.* są bardzo rozpowszechnione w przyrodzie i stanowią jedną z liczniejszych grup mikroorganizmów. U karpia największe znaczenie ma *Pseudomonas fluorescens* i *P. putida* [Kościńska 2007]. Są to drobnoustroje psychrofilne, których głównym rezerwuarem jest woda i z tego powodu można było się ich spodziewać u karpia handlowych sprzedawanych w zimie. Dużą niespodzianką było jednak stwierdzenie u ryb *Burkholderia cepacia* Gram-ujemnej bakterii, której naturalnym środowiskiem są osady rzeczne oraz wilgotna gleba wokół korzeni roślin. Obecność bakterii, dotychczas nie stwierdzanej u ryb, w narządach wewnętrznych szczególnie karpia handlowych, niesie ze sobą wiele zagrożeń. Drobnoustrój ten, zaliczany do tzw. fitopatogenów, wykazuje wielolekooporność na antybiotyki i chemioterapeutyki, jak również na czynniki zewnętrzne. W środowisku szpitalnym może przeżyć i mnożyć się w wodzie destylowanej i niektórych środkach dezynfekcyjnych oraz kontaminować odkażone powierzchnie. Stąd też może być przyczyną zakażeń szpitalnych, jako drobnoustrój oportunistyczny, u ludzi z obniżoną odpornością.

Wyniki badań oporności *in vitro* wyosobnionych szczepów wskazują na ich oporność na aminopenicyliny. Gram-ujemne pałeczki niefermentujące, takie jak *Acinetobacter spp.* i *Burkholderia spp.* posiadają wiele naturalnych oraz nabytych mechanizmów oporności na antybiotyki. *Acinetobacter spp.* mają gatunkowo specyficzne cefalosporynazy AmpC. Pojawiają się szczepy *Acinetobacter baumannii* wytwarzające ESBL (Extended Spectrum Beta-lactamases), które warunkują ich oporność na: penicyliny, cefalosporyny I, II, III i IV generacji oraz na monobaktamy. Najczęściej również *in vivo* nie działają na nie inhibitory (takie jak kwas klawulenowy), pomimo że w warunkach *in vitro* wykazują wrażliwość. Geny MBL (metalo- $\beta$ -laktamazy grupy B), które warunkują oporność na karbapenemy, mogą być przekazywane horyzontalnie pomiędzy różnymi gatunkami pałeczek niefermentujących (na przykład od *Pseudomonas aeruginosa*) [Gniadowski i in. 2009]. Dlatego też szczepy *Acinetobacter spp.* są odporne na wszystkie obecnie dostępne  $\beta$ -laktamy.

*Burkholderia spp.* jest bakterią naturalnie oporną na penicyliny i aminoglikozydy. Dla tej grupy mikroorganizmów badanie antybiotykooporności za pomocą metody dyfuzyjno-krażkowej dopuszczalne jest jedynie w przypadku nielicznych antybiotyków. Dla większości antybiotyków należy oznaczyć MIC, czyli minimalne stężenie hamujące wzrost, dlatego w powyższym badaniu nie określano oporności dla szczepu *Burkholderia spp.* metodą dyfuzyjno-krażkową [Gniadowski i in. 2009].

Według danych literaturowych [Harnisz i in. 2004a] antybiotykiem, na który najczęściej stwierdza się oporność bakterii izolowanych od ryb, jest enrofloksacyna. Wysoka oporność na antybiotyki może być spowodowana chowem ryb przy dużych obsadach oraz stosowaniem antybiotyków w nadmiernych ilościach [Harnisz i in. 2004b]. W przypadku wyizolowanego szczepu *Acinetobacter* oporność na leki z grupy chinolonów nie została potwierdzona. Może być to związane z racjonalnym stosowaniem antybiotyków w badanych gospodarstwach oraz niedopuszczaniem do przegęszczenia w zbiornikach wodnych.

W wyniku przeprowadzonych badań karpi handlowych stwierdzono występowanie nietypowej flory bakteryjnej, która cechowała się wyjątkową naturalną opornością na użyte w doświadczeniu antybiotyki. Ze względu na to, że wyizolowane szczepy są oportunistycznymi patogenami człowieka stanowiącymi zagrożenie zarówno dla hodowców, jak i konsumentów ryb, celowe wydaje się kontynuowanie oraz przeprowadzenie podobnych badań w innych gospodarstwach chowu ryb konsumpcyjnych. W przypadku zaś potwierdzenia takich wyników na liczniejszym materiale ważne byłoby dążenie ukierunkowane na zmianę dość liberalnych przepisów weterynaryjnych odnośnie do nadzoru nad rybami konsumpcyjnymi.

## PIŚMIENNICTWO

- Bednarska M., Bednarski M., Polechoński R., 2007. Aktualne problemy dotyczące zakażeń paciorkowcami u ryb. *Med. Wet.*, 7, 783–785.
- Gniadowski M., Żabicka D., Hryniewicz W., 2009. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki 2009 – Oznaczanie wrażliwości pałeczek Gram-ujemnych. *KORDL*, 18–23.
- Grawiński E., Podolska M., Kozińska A., Pękala A., 2009. Bakterie chorobotwórcze dla ryb i człowieka izolowane od dorszy bałtyckich. *Życie Wet.*, 5, 409–416.

- Harnisz M., Zmysłowska I., Gołaś I., Terach-Majewska E., 2004. Występowanie Gram ujemnych pałeczek w wodzie i rybach podczas intensywnego tuczu. *Ochrona zdrowia ryb – aktualne problemy*. IRS Olsztyn, 131–136.
- Harnisz M., Zmysłowska I., Gołaś I., Terach-Majewska E., 2004. Oporność na antybiotyki bakterii potencjalnie chorobotwórczych wyizolowanych z wody i ryb. *Ochrona zdrowia ryb – aktualne problemy*. IRS Olsztyn, 137–141.
- Kitch T.T., Jacobs M.R., Appelbaum P.C., 1992. Evaluation of the 4-Hour RapID NF Plus Method for Identification of 345 Gram-Negative Nonfermentative Rods. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Kozińska A., Guz L., Pękala A., 2002. Diagnostyka wybranych patogenów bakteryjnych w ichtiopatologii. *PIW Puławy*.
- Kozińska A., 2007. Najważniejsze zakażenia bakteryjne u karpia – aktualny stan wiedzy o etiologii i epizootologii oraz problemy diagnostyczne i terapeutyczne. *Ochrona zdrowia w gospodarce rybackiej*. PIW-PIB Puławy, 47–57.
- Pękala A., 2007. Nowe zagrożenia infekcji bakteryjnych u karpia. *Ochrona zdrowia w gospodarce rybackiej*. PIW-PIB Puławy, 59–64.
- Prost M., 1980. *Choroby ryb*. PWRiL.
- Szewczyk E.M., 2005. *Diagnostyka bakteriologiczna*. PWN, Warszawa.
- Zaremba M.L., Borowski J., 2004. *Mikrobiologia lekarska*. PZWL.

## MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF FARMED CARP FROM PARTICULAR PONDS IN PROVINCE DOLNOŚLĄSKIE

**Abstract.** The aim of our research was to verify hypothesis that clinically healthy commercial carps are pathogen free.

45 clinically healthy trade carps of total body mass 900–1800 grams from nine different farms in Dolnośląskie province were examined in the time period from 28th November to 7th December 2009. For bacteriological tests samples of internal organs were taken. Quick 4-hour biochemical test RapID NF Plus System was used to identify isolated bacteria.

In 42 cases samples were sterile (aseptic). In 3 other cases we have isolated following bacteria: *Acinetobacter baumannii complex* (with 99,83% probability), *Burkholderia cepacia* (with 99,99% probability).

Antibiotic-resistance for isolated strains were also defined by using disc diffusion method. Isolated strains were found to be resistant to aminopenicillins.

Isolated bacterial strains are untypical for fish and can be pathogenic for human.

**Key words:** carp, bacteriological investigation

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.03.2010

For citation – Do cytowania: Zacharow I., Snoch-Bajek J., Niemczuk W., 2010. Ocena mikrobiologiczna karpia handlowych pochodzących z wybranych stawów województwa dolnośląskiego. *Acta Sci. Pol. Med. Vet.* 9(1), 33–38.

## SPIS TREŚCI CONTENTS

<b>Daniel Korniewicz, Zbigniew Dobrzański, Adolf Korniewicz, Paweł Gajewczyk</b>	
The effect of dietary multicomponent preservative on microbiological quality of mixtures for sows .....	3
Wpływ dodatku konserwantu wieloskładnikowego na jakość mikrobiologiczną mieszanek pełnoporcjowych dla loch	
<b>Aleksander Chrószcz, Anna Krupska, Maciej Janeczek, Norbert Pospieszny, Krzysztof Jaworski, Aleksandra Pankiewicz</b>	
Animal remains from the archaeological excavation at Gromnik Hill (Rummelsberg) in Poland .....	19
Szczałki kostne zwierząt ze stanowiska archeologicznego na górze Gromnik, Polska datowanych na wczesne średniowiecze i XV wiek	
<b>Iwona Zacharow, Joanna Snoch-Bajek, Wiktor Niemczuk</b>	
Ocena mikrobiologiczna karpi handlowych pochodzących z wybranych stawów województwa dolnośląskiego .....	33
Microbiological evaluation of farmed carp from particular ponds in Province Dolnośląskie	