

## FUSARIUM SPP. TARŠA BIČIŲ SURINKTOSE ŽIEDADULKĖSE

**Monika BUDRYTĖ**, Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademija, Agronomijos fakultetas, el. paštas [monika.budryte1@vdu.lt](mailto:monika.budryte1@vdu.lt)

**Jolanta SINKEVIČIENĖ**, Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademija, Agronomijos fakultetas, el. paštas [jolanta.sinkeviciene@vdu.lt](mailto:jolanta.sinkeviciene@vdu.lt)

### Santrauka

Tyrimo tikslas – nustatyti bičių surinktose žiedadulkėse *Fusarium spp.* paplitimą esant skirtingoms aplinkos temperatūroms ir skirtingiems sandėliavimo laikotarpiams. 28 vnt. (po 200 g) bičių žiedadulkių mėginiai buvo surinkti 2021 m. gegužės III dekadą Kauno rajone. Mėginiai buvo laikomi nuo 1 iki 4 mėnesių esant skirtingiems temperatūrų režimams (8–9 °C ir 20–23 °C).

Grybams išskirti naudotas skiedimo metodas (ksv g<sup>-1</sup>). Bičių surinktose žiedadulkėse grybų tarša prieš sandėliuojant kito nuo 1 × 10<sup>1</sup> iki 1.5 × 10<sup>3</sup> ksv g<sup>-1</sup>. Nustatytos *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium spp.* bei kitos grybų gentys. Žiedadulkėse išskirtos *Fusarium* genčiai priklausančios rūšys – *F. sporotrichioides* ir *F. graminearum*.

Įvertinus skirtingomis temperatūromis bei sandėliavimo laikotarpiais sandėliuotų žiedadulkių taršą mikroskopiniais grybais, nustatyta, kad saugiausia bičių žiedadulkes laikyti 8–9 °C temperatūroje ir kuo trumpiau.

**Reikšminiai žodžiai:** bičių žiedadulkės, tarša, *Fusarium*.

### Įvadas

Atsirandant sąmoningo gyvenimo būdo svarbai, vis didėja paklausa mažai perdirbtiems natūralios kilmės maisto produktams, kuriuose yra bioaktyvių ingredientų. Pastaraisiais dešimtmečiais išpopuliarėjo bitininkystės produktai, iš kurių bičių žiedadulkės išgaunamos didžiausiais kiekiais (Kieliszek et al., 2018).

Svarbiausias žiedadulkių kokybės standarto kriterijus yra mikrobiologinis užterštumas. Surenkamų bičių žiedadulkių kokybė priklauso nuo aplinkos veiksnių, kurie turėjo įtakos mikroskopinių grybų ir bakterijų veiklai (Xue et al., 2014). Susidarius palankioms drėgmės ir temperatūros sąlygoms, mikroskopiniai grybai pradeda vystytis. Šie grybai gali augti esant 10–40 °C temperatūrai ir vandens aktyvumui svyruojant nuo 0,62–1 aw (Petrovic et al., 2014). Kadangi bičių surinktos žiedadulkės yra hidrofobiškos ir esant palankioms sąlygoms gali tapti palankia terpe mikroorganizmams daugintis. Augimo metu mikroorganizmai naudoja žiedadulkių aminorūgštis kaip pagrindinį anglies šaltinį energijai gaminti (DeGrandi-Hoffman ir kt., 2013).

Mikotoksinus gamina tokie mikroskopiniai grybai kaip *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* ir *Penicillium* (Akond et al., 2012). Šie grybai yra gyvybinga ir aktyvi mikroorganizmų grupė, kuri aktyviai sintetina ir į aplinką išskiria įvairaus cheminio pobūdžio toksiškus metabolitus (Lugauskas, 2006). Tam tikrų grybų rūšių išskiriami metabolitai gali sukelti kvėpavimo ligas, alergijas, pabloginti maisto kokybę, kelti pavojų jo saugai. Todėl svarbu išsiaiškinti, kurios grybų rūšys vyrauja žiedadulkėse (Hussein, Brasel, 2001), o aptikus išskiriančius mikotoksinus, jų veiklą reikia mažinti (Lugauskas ir kt., 2002).

Keletas *Fusarium* rūšių yra svarbūs fitopatogeniniai grybai. Pastarieji dėl visame pasaulyje daromos žalos pasėliams, gyvulininkystėje ir žemės ūkyje sudaro didelius ekonominius nuostolius. Šie grybai prisideda prie rimčiausių žmonijos problemų – nepakankamos mitybos ir maisto produktų taršos. *Fusarium spp.* gebėjimas gaminti keletą mikotoksinų dideliais kiekiais kelia pavojų ne tik gyvūnų, bet ir žmonių sveikatai (Ferrigo ir kt., 2016).

Žiedadulkių maistinė vertė kelia vis didesnę susidomėjimą jomis kaip maisto papildu. Norit užtikrinti žiedadulkių kokybę, reikia nustatyti žiedadulkių mikrobiologinę taršą ir įvertinti jos kitimą skirtingomis sandėliavimo sąlygomis.

**Tyrimo tikslas** – nustatyti bičių surinktose žiedadulkėse *Fusarium spp.* paplitimą esant skirtingoms aplinkos temperatūroms ir sandėliavimo laikotarpiams. **Tyrimo uždaviniai**

1. Nustatyti bičių žiedadulkių taršą mikroskopiniais grybais;
2. Įvertinti skirtingų laiko ir temperatūrų įtaką *Fusarium spp.* plitimui žiedadulkėse.

### Tyrimų objektas ir metodai

Tyrimai atlikti VDU Žemės ūkio akademijoje 2021–2022 m. Agroekosistemų ir dirvožemio mokslų katedros laboratorijose.

*Žiedadulkių mėginiai.* Tyrimams surinkti 28 vnt. (po 200 g) pavasariinių bičių žiedadulkių mėginių. Mėginiai surinkti 2021 m. gegužės III dekadą Kauno rajone.

*Žiedadulkių laikymo sąlygos.* Surinktos žiedadulkės patalpintos į sterilius popierinius maišelius. Išvalytos ir išdžiovintos iki 8,0 proc. drėgnumo žiedadulkės iki mikologinių analizių tyrimų pradžios laikytos šaldiklyje -15°C temperatūroje. Tyrimo metu 14 vnt. žiedadulkių mėginių laikyti 1–4 mėnesių laikotarpiu esant 8–9 °C, o kiti (14 mėginių) – esant 20–23 °C.

*Palinologinė analizė.* Atlikus palinologinę bičių žiedadulkių analizę, nustatyta, kad žiedadulkėse vyrauja bastutinių (*Brassicaceae*) šeimos augalų gentys. Mažesnę dalį sudarė erškėtinių (*Rosaceae*), pupinių (*Fabaceae*) ir miglinių (*Poaceae*) šeimos augalų gentys.

*Grybų išskyrimas ir identifikavimas.* Mikroskopiniams grybams auginti ir išskirti buvo taikytas skiedimo metodas. Grybams nustatyti 10 g mėginio įdėta į 90 ml fiziologinį tirpalą (NaCl, 8,5 g L<sup>-1</sup>) ir centrifuguota 15 min. Iš paruoštos suspensijos imti 1 ml skiediniai (nuo 10<sup>-1</sup> iki 10<sup>-4</sup>). Visi tyrimai buvo atlikti trimis pakartojimais. Bulvių dekstrozės agaras (PDA) ir Czapek-Dox agaras (CDA) (Sigma-Aldrich, Vokietija) buvo naudojami atskiroms gentims ir rūšims išskirti ir identifikuoti. Lėkštelės buvo inkubuojamos 26 ± 2 °C temperatūroje tamsoje 5–7 dienas. Mielėms išskirti lėkštelės su kultūromis buvo laikytos 3 dienas. Bendras grybų skaičius buvo nustatytas ir įvertintas kaip kolonijas formuojantys vienetai viename grame (ksv g<sup>-1</sup>) bičių žiedadulkių. Išskirtų kolonijų ir skirtingų grybų rūšių morfologinės savybės buvo nustatytos remiantis Pitt ir Hocking (2009) bei Samson ir kt. (2002) morfologiniais identifikatoriais.

*Statistinė analizė.* Duomenys analizuoti naudojant programinę įrangą Statistica ver. 10 (*StatSoft Inc.*, JAV). Tyrimo duomenys statistškai įvertinti naudojant statistinę programą ANOVA (Raudonius, 2017).

## Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Tyrimų metu analizuoti skirtingos botaninės kilmės bičių žiedadulkių mėginiai. Tyrimų metu nustatyta, kad žiedadulkes bitės surinko iš *Brassicaceae* (50 proc.), *Rosaceae* (31 proc.), *Fabaceae*, *Poaceae*, *Asteraceae* (8 proc.) šeimų augalų.

Išanalizavus gautus tyrimo rezultatus, kurie pateikti 1 lentelėje, nustatyta, kad bičių žiedadulkių mėginiuose prieš jų laikymą buvo aptikta 12 grybų genčių. Grybų kiekis žiedadulkėse svyravo nuo 1 × 10<sup>1</sup> iki 1,5 × 10<sup>3</sup> ksv g<sup>-1</sup>. Žiedadulkėse gausiausiai išskirta *Alternaria* (1,5 × 10<sup>3</sup> ksv g<sup>-1</sup>), *Penicillium* (1,5 × 10<sup>2</sup> ksv g<sup>-1</sup>), *Acremonium* (1 × 10<sup>2</sup> ksv g<sup>-1</sup>) ir *Fusarium* (1,2 × 10<sup>1</sup> ksv g<sup>-1</sup>) genčių grybų. Kitų kolonijas sudariusių grybų genčių skaičius bičių žiedadulkių mėginiuose prieš sandėliavimą sudarė 1 × 10<sup>1</sup> ksv g<sup>-1</sup>. *Alternaria*, *Penicillium* ir *Fusarium* gentys priskiriamos toksinus gaminantiems grybams (Petrovic et al., 2014). Remiantis Akond et al. (2012) atliktais tyrimais, *Alternaria* ir *Penicillium* taip pat buvo vyraujantys grybai džiovintose bičių žiedadulkėse.

**1 lentelė.** Bičių žiedadulkių mėginių užterštumas (ksv g<sup>-1</sup>) prieš sandėliavimą

**Table 1.** Levels of fungal contamination (cfu g<sup>-1</sup>) in bee pollen samples before its storage

Grybai <i>Fungi</i>	Užterštumo lygis (ksv g <sup>-1</sup> ) <i>Pollution level</i>
<i>Acremonium</i> spp.	1 × 10 <sup>2</sup>
<i>Alternaria</i> spp.	1,5 × 10 <sup>3</sup>
<i>Aspergillus</i> spp.	1 × 10 <sup>1</sup>
<i>Botrytis</i> spp.	1 × 10 <sup>1</sup>
<i>Chaetomium</i> spp.	1 × 10 <sup>1</sup>
<i>Cladosporium</i> spp.	1 × 10 <sup>1</sup>
<i>Fusarium</i> spp.	1,2 × 10 <sup>1</sup>
<i>Mucor</i> spp.	1 × 10 <sup>1</sup>
<i>Paecilomyces</i>	1 × 10 <sup>1</sup>
<i>Penicillium</i> spp.	1,5 × 10 <sup>2</sup>
<i>Trichoderma</i> spp.	1 × 10 <sup>1</sup>
Mielės	1 × 10 <sup>1</sup>

Toksinus gaminantiems grybams priskiriama *Fusarium* gentis. Šios genties grybai vystosi ir dauginasi esant 24 – 26 °C temperatūrai ir mažiausiam (0,90 a<sub>w</sub>) substrato drėgnumui (Kostic et al., 2019). Atlikto tyrimo metu šviežiai surinktose bičių žiedadulkėse dėl padidėjusios žiedadulkių drėgmės suaktyvėjo šios genties grybų vystymasis, o tai gali turėti įtakos grybų antrinių metabolitų – toksinų sintezei (Bogdanov, 2012; Kostic et al., 2019).

Tirtuose žiedadulkių mėginiuose *Fusarium* genties grybų esant 8–9 °C temperatūrai, po 1 mėn. išskirta 1,1 × 10<sup>1</sup> ksv g<sup>-1</sup> (2 lent.). Esant 20–23 °C temperatūrai ir tokiam pačiam sandėliavimo laikotarpiui, *Fusarium* genties grybų kiekis padidėjo iki 1,5 × 10<sup>1</sup> ksv g<sup>-1</sup>. Sandėliuojant skirtingomis temperatūros sąlygomis, didžiausi šios genties grybų kolonijų kiekiai išskirti po 3 mėn. žiedadulkių sandėliavimo esant 8–9 °C temperatūrai ir po 4 mėn. sandėliavimo esant 20–23 °C temperatūrai.

*Fusarium* genties grybų buvo nustatytos dvi rūšys – *F. sporotrichioides* ir *F. graminearum*. Tarp svarbiausių mikotoksinų, kuriuos gamina *Fusarium* rūšys, yra trichotecenai, fumonizina, zearalenonai ir T-2 toksinai. Šiuos mikotoksinus gamina *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. proliferatum*, *F. moniliforme*, *F. verticillioide*, *F. sporotrichioides* grybų rūšys (Bennett, Klich, 2003; Hussein, Brasel, 2001).

**2 lentelė.** *Fusarium spp.* kiekis (kvs g<sup>-1</sup>) bičių žiedadulkėse sandėliavimo metu**Table 2.** *Fusarium spp.* amount (cfu g<sup>-1</sup>) in bee pollen during their storage

Grybai <i>Fungi</i>	8–9 °C			
	1	2	3	4
<i>Fusarium spp.</i>	1.1 × 10 <sup>1</sup>	1 × 10 <sup>1</sup>	1.2 × 10 <sup>1</sup>	1 × 10 <sup>1</sup>
<i>F. sporotrichioides</i> Sherb.	1 × 10 <sup>1</sup>	1 × 10 <sup>1</sup>	1 × 10 <sup>1</sup>	1.1 × 10 <sup>1</sup>
<i>F. graminearum</i> Swabe	1 × 10 <sup>1</sup>	1.1 × 10 <sup>1</sup>	1.1 × 10 <sup>1</sup>	1.1 × 10 <sup>1</sup>
	20–23 °C			
<i>Fusarium spp.</i>	1.5 × 10 <sup>1</sup>	1.5 × 10 <sup>1</sup>	1.7 × 10 <sup>1</sup>	1.9 × 10 <sup>1</sup>
<i>F. sporotrichioides</i> Sherb.	1 × 10 <sup>1</sup>	1.1 × 10 <sup>1</sup>	1.2 × 10 <sup>1</sup>	1.2 × 10 <sup>1</sup>
<i>F. graminearum</i> Swabe	1 × 10 <sup>1</sup>	1.1 × 10 <sup>1</sup>	1.2 × 10 <sup>1</sup>	1.2 × 10 <sup>1</sup>

1, 2, 3, 4 – saugojimo trukmė mėnesiais

Bičių žiedadulkėse, laikomose esant 8–9 °C temperatūroje, *F. sporotrichioides* grybai intensyviau pradėjo vystytis po 4 mėn. sandėliavimo, o laikomose 20–23 °C temperatūroje – po 3 mėn. Šios rūšies grybų kiekis bičių žiedadulkėse išliko nepakitęs esant skirtingiems temperatūros režimams bičių žiedadulkes sandėliavus vieną mėnesį. *F. graminearum* grybų kiekis esant 8–9 °C temperatūrai padidėjo po 2 mėn. sandėliavimo, šis kiekis stabiliai išsilaikė visą sandėliavimo laikotarpį. Esant 20–23 °C temperatūrai, *F. graminearum* grybų kiekis ženkliai padidėjo po 2 mėn. sandėliavimo. Po 3 ir 4 laikymo mėnesių *F. graminearum* kiekis buvo didžiausias, siekė 1.2 × 10<sup>1</sup> ksv g<sup>-1</sup>. Taigi galima teigti, kad aukštesnė temperatūra ir ilgesnis sandėliavimo laikotarpis skatino grybų vystymąsi ir dauginimąsi.

## Išvados

1. Tyrimo metu, bičių žiedadulkių mėginiuose prieš jų laikymą buvo išskirta 12 grybų genčių, iš kurių didžiausi kiekiai buvo *Alternaria* (1.5 × 10<sup>3</sup> kvs g<sup>-1</sup>), *Penicillium* (1.5 × 10<sup>2</sup> kvs g<sup>-1</sup>), bei *Fusarium* (1.2 × 10<sup>1</sup> kvs g<sup>-1</sup>), genčių grybų.
2. Tyrimų laikotarpiu *Fusarium spp.* tarša bičių žiedadulkėse siekė 1.2 × 10<sup>1</sup> kvs g<sup>-1</sup>.
3. Žiedadulkėse buvo išskirtos dvi *Fusarium spp* rūšys: *F. sporotrichioides* ir *F. graminearum*, kurių kiekis didėjo esant 20 – 23 °C temperatūrai ir ilgėjant sandėliavimo trukmei.
4. Įvertinus bičių žiedadulkių taršą *Fusarium spp* grybais nustatyta, kad saugiausia bičių žiedadulkes sandėliuoti 8 – 9 °C temperatūroje 1 mėn. laikotarpį.

## Literatūra

1. Akond A. S. M. G., Pounders M. C., Blythe E. K., Wang X. 2012. Longevity of crapemyrtle pollen stored at different temperatures. *Scientia Horticulturae*, Vol. 139, p. 53–75.
2. Bogdanov, S. 2012. Pollen: Collection, harvest, composition, quality. In *Bee Product Science (The Pollen Book)*; Muehlethurnen, Switzerland, Chapter 1.
3. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. 2003. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 16, p. 497–516.
4. Degrandi-Hoffman G., Chen Y., Simons R. 2013. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects*, Vol. 4(1), p. 71–89 p.
5. Ferrigo D., Raiola A., Causin R. 2016. Fusarium Toxins in Cereals: Occurrence, Legislation, Factors Promoting the Appearance and Their Management. *Molecules*, Vol. 21(5), 627. <https://doi.org/10.3390/molecules21050627>
6. Hussein S., Brasel M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. School of Veterinary Medicine, University of Nevada-Reno. *Toxicology*, Vol. 167, p. 101–134 p. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)
7. Kielizek M., Piwowarek K., Kot A. M., Blazejak S., Chlebowska-Smigiel A., Wolska I. 2018. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 71, p. 170–180.
8. Lugauskas A., Paškevičius A., Repečkienė J. 2002. Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje. Vilnius: Aldorija, 434 p.
9. Lugauskas A. 2006. Mikotoksinų kaupimosi maiste dėsningumai ir prevencinių saugos priemonių paieška. *Maisto chemija ir technologija*, Vol. 40(2), p. 16–27 .
10. Petrovic T., Nedic N., Paunovic D., Rajic J., Matovic K., Radulovic V., Krnjaja V. 2014. Natural mycobiota and aflatoxin B1 presence in bee pollen collected in Serbia. *Biotechnology in Animal Husbandry*, Vol. 30(4), p. 731–741. <https://doi.org/10.2298/BAH1404731P>
11. Pitt J. I., Hocking A. D. 2009. *Fungi and Food Spoilage* (3rd ed.). Springer, 519 p.
12. Raudonius S. 2017. Application of statistics in plant and crop research: important issues. *Zemdirbyste-Agriculture*, Vol. 104 (4), p. 377–382. <https://doi.org/10.13080/z-a.2017.104.048>
13. Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvald J. C., Filtenborg O. 2002. *Introduction to Food and Airborne Fungi* (6th ed.). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 389 p.
14. Xue X., Johnathan N. S., Liuwei Z., Haimin D., Fengmao L., Yang L., Yi L. 2014. Simultaneous de-termination of aflatoxins and ochratoxin a in bee pollen by low-temperature fat precipitation and immunoaffinity column cleanup coupled with LC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, Vol. 7(3), p. 690–96 p. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9723-4>

## **FUSARIUM SPP. POLLUTION IN BEE COLLECTED POLLEN**

### **Summary**

The purpose of the study is to determine the prevalence of *Fusarium* spp. in pollen collected by bees at different ambient temperatures and during different storage periods. 24 pcs. (200g each) pollen samples collected in 2021. 3rd decade of May, Kaunas district. Samples were stored from 1 month. up to 4 months periods at different temperatures: 8 – 9 °C and 20 – 23 °C.

A dilution method (cfu g<sup>-1</sup>) was used to isolate the fungi. Fungal contamination in pollen collected by bees before storage ranged from  $1 \times 10^1$  to  $1.5 \times 10^3$  cfu g<sup>-1</sup>. *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* spp. and other genera of fungi were identified. Species belonging to the *Fusarium* genus were isolated in the pollen: *F. sporotrichioides* and *F. graminearum*.

After evaluating the contamination of pollen that was stored at different temperatures and storage periods, it was found that it is safest to store bee pollen at a temperature of 8 – 9 °C and for the shortest possible time.

**Keywords:** bee pollen, contamination, *Fusarium*