

SANDĖLIAVIMO SĄLYGŲ ĮTAKA BIČIŲ ŽIEDADULKIŲ TARŠAI MIKROSKOPINIAIS GRYBAIS

Austėja ZAMOKAITĖ, Vytauto Didžiojo universitetas, Žemės ūkio akademija, Agronomijos fakultetas, el. paštas austeja.zamokaite@vdu.lt

Jolanta SINKEVIČIENĖ, Vytauto Didžiojo universitetas, Žemės ūkio akademija, Agronomijos fakultetas, el. paštas jolanta.jukneviiciene@vdu.lt

Santrauka

Tyrimo tikslas – nustatyti mikroskopinių grybų paplitimą bičių žiedadulkėse, esant skirtingiems sandėliavimo laikotarpiams. 2021 m. liepos viduryje iš vieno bityno tuo pačiu metu buvo paimta 20 bičių žiedadulkių mėginių (po 200 g). Tą pačią dieną surinktų šviežių bičių žiedadulkių mėginiai buvo išvalyti ir išdžiovinti iki 8 proc. drėgmės. Sandėliuoti nuo 1 mėn. iki 3 mėn.

Mikroskopiniai grybai izoliuoti skiedimo metodu (kolonijas sudarantys vienetai, ksv g⁻¹). Sandėliavimo metu išskirti grybai priklausė *Aspergillus*, *Penicillium* ir *Fusarium* gentims. Prieš sandėliavimą bičių žiedadulkių užterštumas mikroskopiniais grybais buvo $1,1 \times 10^3$ kvs g⁻¹, o sandėliavimo pabaigoje – 2,3 karto didesnis.

Atlikus tyrimą buvo pastebėta, kad žiedadulkėse, kurios buvo laikomos ilgiausiai, dėl netinkamų sąlygų nebesidaugino *Aspergillum* grybai, tačiau labai padaugėjo *Penicillium* genties grybų.

Reikšminiai žodžiai: bičių žiedadulkės, tarša, mikroskopiniai grybai

Įvadas

Pradėjus keistis žmonių mitybos įpročiams, vis dažniau grįžtama prie gamtos mums teikiamų produktų, tokių kaip bičių medus ar žiedadulkės (Serra Bonvehí ir Escola Jorda, 1997). Pastarosios dėl savo maistinių ir gydomųjų savybių yra puikus maisto produktas, papildantis žmogaus mitybą (Qiang-QiangLi et al., 2018). Svarbiausias bičių žiedadulkių kokybės rodiklis yra jų mikrobiologinė tarša. Aplinkos sąlygos labiausiai daro įtaką bakterijų ir mikroskopinių grybų dauginimuisi (Xue et al., 2014). Dažniausiai nuo bičių žiedadulkių surinkimo iki jų vartojimo praeina nemažai laiko, per kurį padidėja galimybė mikroskopiniams grybams daugintis. Tai yra viena iš svarbiausių bičių žiedadulkių sandėliavimo problemų (Kačaniová et al., 2011). Mikroskopiniai grybai, kurių visada gausu aplinkoje, pradeda vystytis, kai tik susidaro palankios drėgmės ir temperatūros sąlygos (Petrović et al., 2014). Mikotoksinais užterštas maistas gali sukelti citotoksinį, neurotoksinį, imunosupresinį, teratogeninį, mutageninį ir kancerogeninį poveikį (Krnjaja et al., 2012). *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Cladosporium* ir *Mucor* genčių grybai buvo nustatyti kaip pirmiau minėtų ligų etiologiniai veiksniai (Krysinska-Traczyk et al., 2001).

Tyrimo tikslas – nustatyti skirtingų žiedadulkių sandėliavimo laikotarpių įtaka mikroskopinių grybų paplitimui.

Tyrimo uždaviniai

1. Nustatyti bičių žiedadulkių taršą mikroskopiniais grybais;
2. Palyginti skirtingais laikotarpiais sandėliuotų bičių žiedadulkių mikroskopinių grybų kiekį.

Tyrimų metodai ir sąlygos

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

Bičių žiedadulkių mėginių paruošimas saugojimui. 2021 m. liepos viduryje iš vieno bityno tuo pačiu metu buvo paimta 20 bičių žiedadulkių mėginių (po 200 g). Tą pačią dieną surinktų šviežių bičių žiedadulkių mėginiai buvo išvalyti ir išdžiovinti iki 8 proc. drėgmės.

Bičių žiedadulkių drėgnumo nustatymas. Žiedadulkių drėgnis buvo nustatytas pagal Europos Komisijos reglamentą EB 152.2009 (Mayda et al., 2020).

Laboratorinio eksperimento variantai – skirtinga bičių žiedadulkių laikymo trukmė:

1. Nesandėliuota;
2. Sandėliuota 1 mėn.;
3. Sandėliuota 2 mėn.;
4. Sandėliuota 3 mėn.

Eksperimento atlikimo sąlygos. Džiovintų bičių žiedadulkių mėginiai (15 mėginių) buvo dedami į sterilius plastikinius maišelius su užtrauktukais ir laikomi kontroliuojamo klimato kameroje. Mėginiai buvo laikomi visiškoje tamsoje. Aplinkos temperatūra buvo 8–9 °C.

Mikroskopiniai grybai izoliuoti skiedimo metodu (kolonijas sudarantys vienetai, ksv g⁻¹). 10 g mėginio buvo įdėta į 90 ml fiziologinio tirpalo (NaCl tirpale 8,5 g L⁻¹), tirpalas centrifuguotas 15 min. Iš paruoštos suspensijos paimti 1 ml skiediniai (nuo 10⁻¹ iki 10⁻⁴). Bulvių dekstrozės agaras (PDA) (Sigma-Aldrich, Vokietija) buvo naudojamas grybų gentims ir rūšims išskirti ir identifikuoti. Į kiekvieną Petri lėkštelę buvo įpilta po 1 ml paruoštos suspensijos, ant kurios buvo užpilta bulvių dekstrozės agaras (PDA) terpė. Lėkštelės buvo inkubuojamos 26 ± 2 ° C temperatūroje tamsoje 5–7 dienas. Izoliuotų kolonijų ir skirtingų rūšių morfologinės charakteristikos buvo nustatytos remiantis Samson et al. (2002) ir Pit, Hocking (2009) apibūdinimais.

Statistiškai duomenys apdoroti vieno veiksnio dispersinės analizės metodu kompiuterine programa ANOVA, (Raudonius, 2017). Skirtinga raide (a, b, c,...) pažymėtų variantų vidurkių skirtumai buvo esminiai, $P < 0,05$.

Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Pradinis drėgmės kiekis bičių žiedadulkėse sudarė 8 proc. Toks drėgmės kiekis yra nepalankus daugelio mikroskopinių grybų vystymuisi (Krnjaja at al., 2012). Tyrimų laikotarpiu drėgmės kiekis didėjo ilgėjant žiedadulkių laikymo trukmei (1 lent.).

1 lentelė. Drėgmės kiekis (%) bičių žiedadulkėse laikymo metu

Table 1. Moisture content (%) of the bee pollen samples during its storage

Sandėliavimo trukmė Storage duration	Drėgmės kiekis (%) Moisture content (%).
Kontrolinis variantas – nesandėliuotos Control	8.00 b
1 mėnuo 1 months	8.10 a
2 mėnuo 2 months	8.12 a
3 mėnuo 3 months	8.11 a

Pastaba. Rodiklio reikšmės, pažymėtos skirtingomis raidėmis, esmingai skiriasi esant 95 proc. tikimybės lygiui

Note: The values of the indice marked with different letters differ significantly by 95% probability level.

Prieš sandėliavimą bičių žiedadulkių užterštumas mikroskopiniais grybais sudarė $1,1 \times 10^3$ kvs g⁻¹ (2 lentelė). Po vieno mėnesio sandėliavimo užterštumas mikroskopiniais grybais padidėjo iki $2,2 \times 10^3$ kvs g⁻¹. Tačiau žema sandėliavimo temperatūra riboja grybų dauginimosi ir plitimo intensyvumą. Po dviejų sandėliavimo mėnesių bendra grybų tarša sumažėjo iki $2,1 \times 10^3$. Didžiausias užterštumas mikroskopiniais grybais nustatytas po 3 mėnesių sandėliavimo laikotarpio, kolonijas formuojančių grybų kiekis sudarė $2,5 \times 10^3$ kvs/g⁻¹, arba buvo 2,3 karto didesnis už kiekį, nustatytą nesandėliuotose žiedadulkėse.

2 lentelė. Mikrobiologinės taršos lygis bičių žiedadulkėse jų laikymo metu (kvs/g⁻¹)

Table 2. The total levels of fungal contamination in bee pollen samples during its storage (cfu g⁻¹)

Sandėliavimo trukmė Storage duration	Užterštumo lygis Contamination level
Kontrolinis variantas – nesandėliuotos Control	1.1×10^3 c
1 mėnesis 1 months	2.2×10^3 ab
2 mėnesiai 2 months	2.1×10^3 a
3 mėnesiai 3 months	2.5×10^3 a

Pastaba. Rodiklio reikšmės, pažymėtos skirtingomis raidėmis, esmingai skiriasi esant 95 proc. tikimybės lygiui.

Note: The values of the indice marked with different letters differ significantly by 95% probability level.

Tyrimų metu bičių žiedadulkėse buvo nustatyti toksinus gaminantys grybai: *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp ir *Fusarium* spp (3 lentelė). *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp yra vieni iš daugiausiai toksinų gaminantys mikroskopiniai grybai (Xue et al., 2014).

Kontroliniuose žiedadulkių mėginiuose nustatyta didžiausia *Penicillium* spp. tarša, kuri sudarė $1,2 \times 10^2$ ksv g⁻¹. *Penicillium* spp. yra greitai plintantys ir aktyviai maistinį substratą skaidantys grybai (Petrović et al., 2014). Šie grybai dominavo Kačaniova et al., (2011), Krnjaja et al. (2012) atliktuose žiedadulkių mikrobiologinės taršos tyrimuose. *Aspergillus* spp. toksinus gaminantys grybai – vieni iš pavojingiausių žmogaus sveikatai (Xue et al., 2014). Tyrimo metu kontroliniuose žiedadulkių mėginiuose *Aspergillus* grybų išskirtas nedidelis kiekis – 1×10 ksv g⁻¹, panašius tyrimų rezultatus gavo ir Kačaniova et al. (2011). *Fusarium* spp. grybų tarša kontroliniuose žiedadulkių mėginiuose taip pat buvo nedidelė, ji siekė 1×10^1 . *Fusarium* spp. grybai gamina toksinus, tačiau jų poveikis nėra toks žalingas kaip *Aspergillus* genties grybų (Xue et al., 2014).

1–3 mėnesių laikotarpiu nustatytas bičių žiedadulkių užterštumas toksinus gaminančiais *Aspergillus* ir *Fusarium* grybais. Šių grybų tarša kito nuo 1×10 iki $1,1 \times 10^1$ ksv g⁻¹. *Aspergillus* genties grybų kiekis nustatytas tik 1–2 sandėliavimo mėnesių laikotarpiu. Galima daryti prielaidą, kad žema sandėliavimo temperatūra ir 8,11 proc. substrato drėgnumas buvo nepalankūs *Aspergillus* grybams plisti, todėl šios genties grybų po 3 sandėliavimo mėnesių nenustatyta. *Fusarium* genties grybų kiekis sandėliavimo metu kito skirtingai. Didžiausia šios genties grybų tarša nustatyta po 3 sandėliavimo mėnesių. Žema sandėliavimo temperatūra neturėjo reikšmingos įtakos *Fusarium* spp. plitimui apriboti.

3 lentelė. Toksinus gaminančių grybų populiacijų skaičius žiedadulkių mėginiuose (kvs/g⁻¹)

Table 3. Levels of toxin producing fungi (cfu g⁻¹) in bee pollen samples during its storage

Gentis Fungi	Grybų populiacijų skaičius (kvs g ⁻¹) Population of fungi (kvs g ⁻¹)			
	Nesandėliuota Not stored	1 mėnesis 1 months	2 mėnesiai 2 months	3 mėnesiai 3 months
<i>Aspergillus</i> spp.	1×10^1	1×10^1	1×10^1	-
<i>Penicillium</i> spp.	$1,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	2×10^3
<i>Fusarium</i> spp.	1×10^1	1×10^1	$1,1 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$

Pastaba. Rodiklio reikšmės, pažymėtos skirtingomis raidėmis, esmingai skiriasi esant 95 proc. tikimybės lygiui.

Note: The values of the indice marked with different letters differ significantly by 95% probability level.

Penicillium spp. grybų kiekis nesandėliuotose žiedadulkėse buvo didelis, jis siekė $1,2 \times 10^2$ ksv g⁻¹. Ilgėjant sandėliavimo trukmei, *Penicillium* spp. tarša didėjo. Didžiausias grybų kiekis išskirtas praėjus 3 mėnesiams nuo sandėliavimo pradžios, tarša sudarė $2,5 \times 10^3$ ksv g⁻¹. Šie rezultatai buvo panašūs į Kačaniová et al., (2011) ir Beev et al. (2018) atliktus bičių žiedadulkių taršos tyrimus, kuriais buvo nustatyta, kad *Penicillium* grybų kiekis didėjo ilgėjant sandėliavimo trukmei.

Išvados

1. Tyrimo metu tirtose žiedadulkėse buvo išskirtos 3 toksinus gaminančios grybų gentys – *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*.
2. Bendra grybų populiacija bičių surinktose žiedadulkėse kito nuo $1,1 \times 10^3$ iki $2,5 \times 10^3$ ksv g⁻¹.
3. *Penicillium* spp. dominavo visą sandėliavimo laikotarpį, jų paplitimas kito nuo $1,8 \times 10^3$ iki $2,5 \times 10^3$ ksv g⁻¹. *Aspergillus* spp. kiekis 1–2 mėnesių laikotarpiu nepakito, siekė 1×10 ksv g⁻¹. Po 3 sandėliavimo mėnesių šios genties grybų bičių žiedadulkėse nenustatyta. *Fusarium* spp. kiekis mėginiuose 1–3 mėnesių laikotarpiu didėjo. Didžiausia šios genties grybų tarša nustatyta po 3 sandėliavimo mėnesių.

Literatūra

1. Beev G., Stratev D., Vashin I., Pavlov D., Dinkov D. 2018. Quality assessment of bee pollen: a cross sectional survey in Bulgaria. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, Vol. 5, p. 11–16 p. <https://doi.org/10.29252/jfqhc.5.1.11>
2. Block G., Ssinha R., Gridley G. 1994. *American Journal of Clinical Nutrition* Vol. 59:, p. 232–239.
3. Kačaniová M., Juraček M., Chlevo R., Knazovická V., Kadasi-Horakova M., Kunova S., Lejkova J., Haščik P., Mareček J., Šimko M. 2011. Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia. *Journal of Environmental Science and Health*, Vol. 46, p. 623–629. <https://doi.org/10.1080/03601234.2011.589322>
4. Krysinska-Traczyk E., Kiecana I., Perkowski J., Dutkiewicz J. 2001. Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain and grain dust collected on farms in eastern Poland. *Annals Agricultural Environmental Medicine*, Vol. 8, p. 269–274.
5. Krnjaja V., Levic J., Stankovic S., Petrovic T., Stojanovic L. J., Radovic C., Gogic M. 2012. Distribution of moulds and mycotoxins in maize grain silage in the trench silo. *Biotechnology in Animal Husbandry*, Vol. 28, No.4, p. 845–854. <https://doi.org/10.2298/BAH1204845K>
6. Mayda N., Özkok A., Bayram N. E., Gercek Y. C., Sorkun K. 2020. Bee bread and bee pollen of different plant sources: determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization*, Vol. 14, p. 1795–1809. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00427-y>
7. Pitt, J. I., Hocking, A. D. 2009. *Fungi and food spoilage*, Vol. 519, p. 388. New York: Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_2
8. Petrović T., Nedić N., Paunović D., Rajić J., Matović K., Radulović V., Krnjaja V. 2014. Natural mycobiota and aflatoxin B1 presence in bee pollen collected in Serbia. *Biotechnology in Animal Husbandry*, Vol 30, p. 731–741. <https://doi.org/10.2298/BAH1404731P>
9. Li, Q. Q., Wang, K., Marcucci, M. C., Sawaya, A. C. H. F., Hu, L., Xue, X. F., . Hu, F. L. 2018. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *Journal of Functional Foods*, Vol. 49, p. 472–484.
10. Raudonius, S. 2017. Application of statistics in plant and crop research: important issues. *Žemdirbystė. Agriculture* T. 104, Nr. 4, p. 377–382.
11. Samson R. A., Hoekstra E. S., Frisvad J. C., Filtenborg O. 2002. Introduction to Food-and Airborne Fungi (6th ed.). Central Bureau of Fungal Cultures, The Netherlands, 389 p.

12. Serra Bonvehí', J., Escola' Jorda', E. 1997. Nutrient composition and microbial quality of honeybee collected pollen in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 45, p. 725–732.
13. Xue X., Jonatan N. S., Liuweim Z., Haiminm D., Fengmao L., Yang L., Yi L. 2014. Simultaneous determination 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. 690–696 <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9723-4>

THE INFLUENCE OF STORAGE CONDITIONS ON BEE POLLEN CONTAMINATION BY MICROSCOPIC FUNGI

Summary

The purpose of the study is to determine how the contamination of bee pollen with microscopic fungi changed during its storage for different periods. 2021 in mid-July, 20 bee pollen samples (200 g each) were taken from one apiary at the same time. After collecting fresh bee pollen on the same day the samples were cleaned and dried to 8% humidity. Store from 1 month. up to 3 months period.

A dilution method (cfu g⁻¹) was used to isolate the fungi. Identified fungi during storage belonged to the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Before storage, bee pollen contamination with microscopic fungi was 1.1×10^3 kvs g⁻¹, and at the end of storage it was 2.3 times higher.

As a result of the study, it was noticed that in the pollen that was stored for the longest time, due to inappropriate conditions, fungi of the genus *Aspergillum* no longer multiplied, but *Penicillium* increased significantly.

Keywords: bee pollen, contamination, microscopic fungi