

MICROBIAL QUALITY OF HONEY MIXTURE WITH POLLEN

Vladimíra Kňazovická, Miroslava Kačániová, Mária Dovičičová, Martin Melich, Zuzana Barboráková, Miriam Kadási-Horáková, Ján Mareček

ABSTRACT

The aim of this study was evaluation of microbial quality in raw materials (honey, pollen) and evaluation of microbial quality in honey mixture with pollen (2.91 % and 3.85 %) and also dynamics of microbial groups in honey mixtures with pollen after 14 days storage at the room temperature (approximately 25 °C) and in cold store (8 °C). We used dilution plating method for testing of samples. Detections of total plate microbial count (aerobic and anaerobic microorganisms), sporulating bacteria, coliform bacteria, *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. and microscopic fungi were performed. In general, counts of microorganisms decreased in honey mixture with pollen compared to raw pollen and these counts increased compared to natural honey. Total plate count was 5.37 log KTJ.g⁻¹ in pollen; 1.36 log KTJ.g⁻¹ in honey; 2.97 log KTJ.g⁻¹ in honey mixture with 2.91 % pollen and 2.04 log KTJ.g⁻¹ in honey mixture with 3.85 % pollen. Coliform bacteria were detected in pollen (1.77 log KTJ.g⁻¹). Then, we found coliform bacteria in one sample of honey mixtures with pollen (2.91 %) – 1.00 log KTJ.g⁻¹. *Bifidobacterium* species were detected only in raw pollen. We did not find *Lactobacillus* sp. in any of the samples. Microscopic fungi were detected on two cultivating media. Yeasts were present in pollen sample (average 5.39 log KTJ.g⁻¹), honey mixture with 2.91 % pollen (average 2.51 log KTJ.g⁻¹) and honey mixture with 3.85 % pollen (average 1.58 log KTJ.g⁻¹). Filamentous microscopic fungi were detectable in pollen (average 3.38 log KTJ.g⁻¹), in honey (only on one medium: 1.00 log KTJ.g⁻¹), in honey mixture with 2.91 % pollen (average 1.15 log KTJ.g⁻¹) and in honey mixture with 3.85 % pollen (1.71 %). Raw pollen contained microscopic fungi as *Absidia* sp., *Mucor* sp., *Alternaria* sp. and *Emericella nidulans*. Honey mixture with 2.91 % pollen after storage (14 days) contained lower microbial counts when compared with the sample analyzed at the beginning, beside sporulating bacteria and filamentous microscopic fungi in sample stored at 8 °C. We recorded growth of anaerobic microorganisms in honey mixture with 3.85 % pollen after storage (8 °C, 25 °C / 14 days).

Keywords: bee product, filamentous microscopic fungi, bacteria

ÚVOD

Peľ je potravinový doplnok zatiaľ známy najmä medzi včelármi a nadšencami včelích produktov. Včely potrebujú kvalitnú výživu najmä v období skorej jari. Využívajú peľové zásoby. Sú pre ne nevyhnutné ako zdroj bielkovín – peľ využívajú na prípravu kŕmnej kašičky pre plod a matku; na regeneráciu tkanív a opotrebovaných buniek všetkých včiel vo včelstve (Demeter a Haščík, 2008). Každé peľové zrno si v sebe nesie genetickú výbavu a zásobu všetkých potrebných energetických a výživných látok (Titěra, 2006). Užívanie peľu sa odporúča aj u ľudí. Podľa Bogdanova (2004), peľ má rôzne zdravie prospešné účinky a je tiež využívaný v apiterapii.

Peľ je tvorený sacharidmi (najmä polysacharidmi), sú hlavnou zložkou peľu, vrátane škrobu, fruktózy, glukózy a sacharózy; tiež obsahuje bielkoviny (najmä enzýmy) a aminokyseliny; tuková zložka v peľi pozostáva z rôznych lipidov, mastných kyselín a sterolov (Bogdanov, 2004). V bielkovinách peľu sa nachádzajú všetky esenciálne aminokyseliny pre včely i človeka a tiež vitamíny (najmä A, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉; v stopových množstvách B₁₂, C, D, E, K) a minerálne látky, konkrétne draslík, fosfor, síra, horčík, meď, sodík, vápnik, zinok, železo a v stopových množstvách jód (Titěra, 2006).

Včely lietavky zbierajú peľ na kvetoch, spracujú ho pomocou sekréty čelustných žliaz a ukladajú do tzv. peľových košíčkov. Tieto peľové obnôžky nosia do úľa, kde ich včely mladušky navlhčia nektárom, uložia do buniek plástov, utlačia hlavou a zalejú medom. V uloženom peľi prebieha mliečne kvasenie, vzniká

kyselina mliečna, ktorá peľ konzervuje (Demeter a Haščík, 2008).

Podľa spôsobu získavania rozoznávame obnôžkový a plástový peľ; podľa spôsobu spracovania mrazený, sušený, lyofilizovaný a fermentovaný peľ. Jedným zo spôsobov spracovania čerstvého obnôžkového peľu je jeho pridanie priamo do medu.

Typickými fyzikálno-chemickými vlastnosťami medu sú vysoký obsah sacharidov (následkom je vysoký osmotický tlak), obsah kyselín a následne kyslosť prostredia (nízke pH), nízky obsah vody, nízka vodná aktivita a obsah rôznych komponentov, pôvodom z rastlín a včiel (Cooper, 2005). Kombinácia týchto parametrov je významným aspektom, dôsledkom čoho si med vo všeobecnosti udržuje výbornú mikrobiologickú kvalitu. Prostredie je bariérou pre mikroorganizmy. Avšak odchýlka od prípustnej hodnoty jedného alebo viacerých fyzikálno-chemických vlastností sa môže negatívne prejaviť v mikrobiologickej kvalite produktu. Aj z tohto dôvodu, je dôležité opatrne zaobchádzať s medom. Pri vmiešaní peľu je nutné zhodnotiť čistotu a množstvo peľu, ktorý pridávame.

Všetky mikroorganizmy potrebujú k svojmu životu zdroje uhlíka, dusíka, minerálnych látok a vodu, pričom obmedzenie zdroja nevyhnutnej živiny vedie k zmene mikrobiálneho metabolizmu (Cooper, 2005). Z toho vyplýva, že v mede sa nachádzajú mikroorganizmy, ktorým med poskytuje dostatok živín k prežitiu, resp. tie, ktoré svoj metabolizmus dokážu prispôsobiť daným podmienkam. Pre med je charakteristický nízky počet a limitovaná rôznorodosť mikroorganizmov (Iurlina a Fritz, 2005). Podľa Snowdon a Cliver (1996) častou súčasťou medu sú spóry *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. a mikroskopické huby

(kvasinky a vláknité mikroskopické huby), pri ktorých bol zistený rast v mede; rast baktérií je nepravdepodobný.

V súčasnosti, zvýšený dôraz je kladený na stanovenie mikrobiologických húb, pretože niektoré sú potenciálnymi producentmi mykotoxínov, ktoré môžu kontaminovať potraviny a poškodiť zdravie konzumenta (Kačániová et al., 2009). Mykologický rozbor peľu je pravdepodobne potrebný ešte vo väčšej miere ako v prípade medu. V peľi sa nesmú nachádzať žiadne cudzorodé častice, nesmie byť zlepený a napadnutý vláknitými mikroskopickými hubami, kvôli riziku prítomnosti aflatoxínov (Titěra, 2006), čo sa dá potvrdiť alebo vyvrátiť mykologickým rozborom, resp. detekciou produkovaných metabolitov.

Podľa Bogdanova (2004) deštrukcia mikroorganizmov peľu žiarením, ozónovým spracovaním alebo chemickými prostriedkami (fumigáciou) nie je potrebná a vedie k hromadeniu toxických rezíduí.

Cieľom práce bolo hodnotenie mikrobiologickej kvality základných surovín určených na zmiešanie (medu, peľu), hodnotenie mikrobiologickej kvality vzoriek medu s prídavkom peľu v dvoch koncentráciách a hodnotenie dynamiky mikrobiálnych spoločenstiev po 14-dňovom skladovaní pri izbovej a chladničkej teplote.

MATERIÁL A METÓDY

Pre účely tejto práce sme analyzovali:

- základné suroviny pre zmes:
 - peľ (čerstvý),
 - med (repkový, pastovaný);
- med s prídavkom peľu – v dvoch koncentráciách:
 - 1,5 kg peľu na 50 kg medu, teda 2,91 %,
 - 2 kg peľu na 50 kg medu, teda 3,85 %;
- med s prídavkom peľu po 14 dňoch skladovania pri izbovej teplote (cca 25 °C) a v chladničke (cca 8 °C).

Tabuľka 1 Charakteristiky metódy použitej na stanovenie uvedených mikrobiálnych skupín

Skupina mikroorganizmov	Podmienky očkovania			Podmienky kultivácie		
	riedenia	platňa	spôsob	O ₂	teplota	čas
CP mikroorganizmov	10 ⁻¹ - 10 ⁻⁴	GTK	zaliatie	aeróbne	30 °C	48-72 h
CP anaeróbných mikroorganizmov		MPA / W	zaliatie	anaeróbne	25 °C	48-72 h
CP sporulujúcich baktérií		AnA	zaliatie	aeróbne	37 °C	48-72 h
Koliformné baktérie		VČŽL	na povrch	aeróbne	37 °C	24 h
<i>Bifidobacterium</i> sp.		mod W+SP	zaliatie	anaeróbne	37 °C	48-72 h
<i>Lactobacillus</i> sp.		Rog	zaliatie	aeróbne	37 °C	48-72 h
Mikroskopické huby		CD	zaliatie	aeróbne	25 °C	5-7 dní
		SA				

CP – celkový počet; GTK – Agar s glukózou, tryptónom a kvasničným extraktom, VČŽL – Agar s violetou kryštálovou, červeňou neutrálnou, žltými soľami a laktózou (IMUNA, Šarišské Michaľany); MPA – Nutrient agar no. 2 (mäso-peptónový agar), W – Wilkins Chalgren anaerobic agar, mod W+SP – Wilkins Chalgren anaerobic agar so sójovým peptónom modifikovaný podľa Rada a kol. (1999), AnA – Anaerobic agar, Rog – Rogosa SL agar, CD – Czapek Dox agar modifik. SA – Malt agar (Sladinový agar) (Biomark laboratories, Pune)

Všetky analyzované vzorky pochádzajú z včelej farmy na západnom Slovensku, z roku 2010. Analýza každej vzorky pozostávala z určenia celkového počtu mikroorganizmov (aeróbných aj anaeróbných), celkového počtu sporulujúcich baktérií, koliformných baktérií, baktérií rodov *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* a mikroskopických húb. Postupovali sme podľa platných

Slovenských technických noriem (STN): **STN EN ISO 4833 (1997)** – celkový počet mikroorganizmov; **STN ISO 4832 (1997)** – koliformné baktérie; **STN ISO 7954 (1997)** – mikroskopické huby.

Na mikrobiologickú analýzu vzoriek sme použili platňovú zriedňovaciu metódu. Základné riedenie (10⁻¹) sme získali 30-minútovou homegenizáciou 5 g vzorky a 45 ml fyziologického roztoku (0,85 % NaCl). Ďalšie riedenia sme pripravili podľa zásad desiatkového systému riedenia. Očkovali sme riedenia 10⁻¹ až 10⁻⁴ pre všetky analyzované mikrobiálne skupiny, vždy 1 ml, v dvojnásobnom opakovaní. Potom sme mikroorganizmy kultivovali za presne stanovených podmienok. Charakteristika jednotlivých častí metódy je uvedená v tabuľke 1.

Pred analýzou na počet sporulujúcich baktérií sme medu podrobili teplotnému šoku pri teplote 80 °C počas 10 min. Anaeróbne prostredie sme vytvorili kultiváciou v anaerokultoch (Merck, Darmstadt).

Po kultivácii sme spočítali kolónie na platniach. Pre výpočet KTJ.g⁻¹ sme použili vzorec (pre počty na miskách z dvoch za sebou idúcich riedení):

$$N = \sum C / [(n_1 + 0,1n_2) \cdot d], \text{ kde:}$$

$\sum C$ – súčet charakteristických kolónií na platniach

n₁ – počet misiek z prvého riedenia použitého na výpočet

n₂ – počet misiek z druhého riedenia použitého na výpočet

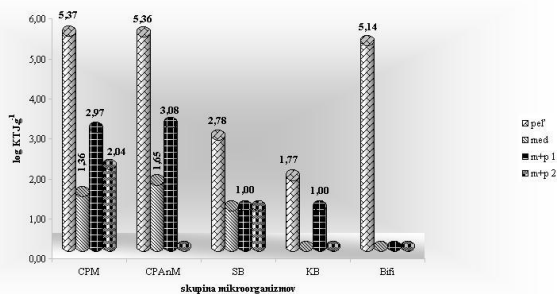
d – riediaci faktor zhodný s prvým použitým riedením

Ak boli kolónie prítomné len na miskách prvého použitého riedenia (10⁻¹), hodnotu KTJ.g⁻¹ sme určili podielom súčtu kolónií a počtu misiek (na ktorých boli kultivované) a následným vynásobením prevrátenou hodnotou zriedenia (teda 10). Všetky hodnoty sme zlogaritovali a výsledky uviedli v log KTJ.g⁻¹.

Na zachytenie širšieho spektra mikroskopických húb sme použili 2 živné média – Czapek Dox agar a Sladinový agar. Počty sme vyjadrili osobitne pre kvasinky a osobitne pre vláknité mikroskopické huby, ktoré sme zatriedili do rodov, resp. druhov podľa De Hoog et al. (2000). Ako doplnkový test pri vzorke peľu sme použili kultiváciu na AFPA [selektívne médium pre *Aspergillus flavus/A. parasiticus*; **STN 56 0087 ISO 7954 (2010)**], na ktorom aspergily, schopné produkovať aflatoxín, majú spodinu kolónie sfarbenú do oranžova.

Detekčný limit uvedenej metódy je 10 KTJ.g⁻¹, teda 1,00 log KTJ.g⁻¹.

VÝSLEDKY A DISKUSIA



Obrázok 1 Mikrobiologická kvalita medu, peľu a ich zmesí

m+p 1 – med s prídavkom peľu (2,91 %), m+p 2 – med s prídavkom peľu (3,85 %); CPM – celkový počet mikroorganizmov, CPAnM – celkový počet anaeróbných mikroorganizmov, SB – sporulujúce baktérie, KB – koliformné baktérie, Bifi – *Bifidobacterium* sp. a príbuzné baktérie; KTJ – kolóniu tvoriaca jednotka;

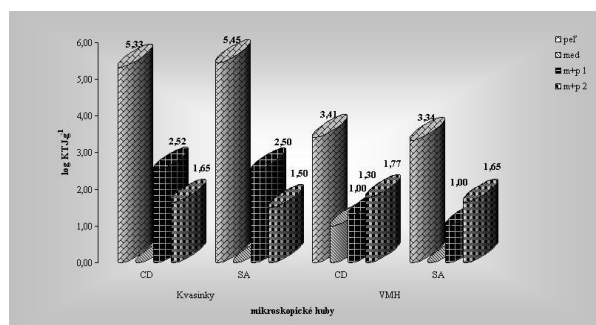
Na obrázku 1 sú graficky znázornené hodnoty celkového počtu mikroorganizmov (CPM), celkového počtu anaeróbných mikroorganizmov (CPAnM), počtu sporulujúcich baktérií, koliformných baktérií, bifidobaktérií (*Bifidobacterium* sp.) a príbuzných organizmov vo vzorke peľu medu a ich zmesí v dvoch koncentráciách. V nasledovnom texte sú uvedené hodnoty v log KTJ.g⁻¹ vzorky. Prepočty rozdielov v počte mikroorganizmov pôvodných surovín a ich zmesí sú uvedené aj pre KTJ.g⁻¹.

Vo vzorke medu s prídavkom 2,91 % peľu (v porovnaní s peľom ako surovinou) sa počet mikroorganizmov znížil približne 221 krát, čo sa potvrdilo poklesom o 2,40 log KTJ.g⁻¹ (t. j. 251 krát) pri CPM a poklesom o 2,28 log KTJ.g⁻¹ (191 x) pri CPAnM. Z toho vyplýva, že pridaním peľu do medu došlo k prečisteniu peľu z hľadiska výskytu mikroorganizmov. Počet mikroorganizmov medu sa v porovnaní s pôvodným stavom zvýšil približne 34 krát – CPM sa zvýšil o 1,61 log KTJ.g⁻¹ (41 x) a CPAnM sa zvýšil o 1,43 log KTJ.g⁻¹ (27 x). Počet sporulujúcich baktérií v zmesi klesol o 1,78 log KTJ.g⁻¹ (60 x) v porovnaní s pôvodnou vzorkou peľu, pričom nedošlo k zvýšeniu sporulujúcich baktérií v mede. V peľi sa nachádzali koliformné baktérie, ktorých počet sa pridaním do medu znížil o 1,78 log KTJ.g⁻¹ (60 x). V pôvodnej vzorke medu sme nezistili prítomnosť koliformných baktérií. Po pridaní peľu boli zistiteľné použitou metódou. Baktérie rodu *Bifidobacterium* a príbuzné organizmy sa v peľi nachádzali, ale prenos do medu ich zničil. Prítomnosť baktérií rodu *Lactobacillus* sme nezaznamenali v žiadnej zo sledovaných vzoriek. Podľa **Olofsson a Vásquez (2008)** *Bifidobacterium* sp. a *Lactobacillus* sp., baktérie produkujúce kyselinu mliečnu, zistené v niekoľkých vzorkách čerstvo vytočeného medu, pochádzajú z medového včaku včely medonosnej a nie z rastlín, ako sa predpokladalo.

Vo vzorke medu s prídavkom 3,85 % peľu sme zistili pokles CPM o 3,33 log KTJ.g⁻¹ (2137 x) v porovnaní so vzorkou peľu, pričom v porovnaní s pôvodnou vzorkou medu sa CPM zvýšil o 0,68 log KTJ.g⁻¹ (5 x). Počet sporulujúcich baktérií klesol o 1,78 log KTJ.g⁻¹ (60 x) v porovnaní s pôvodnou vzorkou peľu, pričom nedošlo k zvýšeniu sporulujúcich baktérií v mede, rovnako ako v predchádzajúcom prípade. CPAnM, počet koliformných baktérií a bifidobaktérií bol vo vzorke pod zistiteľný limit.

Kačániová et al. (2008) analyzovali 20 vzoriek peľu priamo od včelárov. Zistili priemerne 2,40 log KTJ.g⁻¹ mezofilných aeróbných sporulujúcich mikroorganizmov; 1,70 log KTJ.g⁻¹ mezofilných anaeróbných mikroorganizmov; 1,60 log KTJ.g⁻¹ koliformných baktérií a 2,40 log KTJ.g⁻¹ mikroskopických húb. Medzi najviac zastúpené vlákňité mikroskopické huby patrili *Alternaria alternata* (34,6 %), *Cladosporium cladosporioides* (25 %) a *Penicillium* sp. (6,4 %). Menej frekventovanými boli *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor racemosus*, *Mycelia sterilia*, *Rhizopus stolonifer* a *Trichoderma* sp.. Zistili sme podobné hodnoty počtu mikroorganizmov v peľi, okrem počtu anaeróbných mikroorganizmov, ktorého hodnota bola výrazne vyššia.

Obrázok 2 predstavuje grafické znázornenie kvantitatívneho hodnotenia mikroskopických húb všetkých štyroch vzoriek, na dvoch živných médiách (Czapek Dox agar a Sladinový agar), použitých na zachytenie rozsiahlejšieho spektra mikroskopických húb. Keďže podobnosť hodnôt pri oboch médiách je zreteľná, v ďalšom texte uvádzame priemerné hodnoty. V peľi sa nachádzalo približne 5,39 log KTJ.g⁻¹ kvasiniek, v mede sme ich prítomnosť nezistili. Vo vzorke medu s 2,91 % peľu nastal pokles počtu kvasiniek o 2,88 log KTJ.g⁻¹ (759 x), vo vzorke medu s 3,85 % peľu bol zaznamenaný dokonca pokles o 3,81 log KTJ.g⁻¹ (6457 x). Vlákňité mikroskopické huby boli súčasťou peľu v počte 3,38 log KTJ.g⁻¹, v mede sa potvrdili len na jednom z použitých médií v počte 1,00 log KTJ.g⁻¹.



Obrázok 2 Kvantitatívne zastúpenie mikroskopických húb v mede, peľi a ich zmesiach

m+p 1 – med s prídavkom peľu (2,91 %), m+p 2 – med s prídavkom peľu (3,85 %); CD – Czapek Dox agar, SA – Sladinový agar, VMH – vlákňité mikroskopické huby; KTJ – kolóniu tvoriaca jednotka;

Martins et al. (2003) sledovali 80 vzoriek portugalského kvetového medu. Prítomnosť mikroskopických húb zaznamenali v 88,8 % vzoriek (71 z 80), pričom 25 z týchto vzoriek obsahovalo len kvasinky a 46 obsahovalo kvasinky aj vlákňité mikroskopické huby, konkrétne *Aspergillus candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Mucor* sp. a *Penicillium* sp. Úroveň kontaminácie vlákňitými mikroskopickými hubami bola 10¹ až 10² KTJ.g⁻¹. Úroveň kontaminácie kvasinkami (*Candida humicola* a *Saccharomyces* sp.) bola vyššia – 10⁴ až 10⁵ KTJ.g⁻¹.

Podľa **Finola et al. (2007)** mikroskopické huby môžu spôsobiť kvasenie medu, keď je v ňom vysoký obsah vody (nad 21 %) a existuje priama úmernosť počtu mikroskopických húb v mede a hodnoty vodnej aktivity. Kvasenie je nezvratný jav, ktorý môže v mede prebiehať najmä počas skladovania a spôsobuje významné ekonomické straty (**Carvalho et al., 2005**).

Spektrum vlákňitých mikroskopických húb, ktoré boli súčasťou peľu bolo relatívne široké, ich prehľad je uvedený v tabuľke 2. V mede (bez pridaného peľu) sa nachádzali *Penicillium* sp. a *Aspergillus fumigatus*.

González et al. (2005) sledovali mikroskopické huby, prirodzene sa vyskytujúce v peľi – 87 vzoriek pochádzalo zo Španielska a 3 vzorky z Argentíny. Zamerali sa na potenciálnych producentov mykotoxínov. Kvasinky a *Penicillium* sp. boli dominantnými hubami. Z mikroskopických húb potenciálne schopných produkcie mykotoxínov objavili *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus niger* komplex, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* a *Alternaria* sp. (veľmi často izolované).

Tabuľka 2 Vlákňité mikroskopické huby prítomné vo vzorke peľu

Vlákňité mikroskopické huby v peľi
<i>Absidia</i> sp.
<i>Alternaria</i> sp.
<i>Arthrinium</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Aspergillus</i> sekcia <i>Circumdati</i>
<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Emericella</i> sp.
<i>Emericella nidulans</i>
<i>Eurotium</i> sp.
<i>Eurotium amstelodami</i>
<i>Mucor</i> sp.
<i>Penicillium</i> sp.

Doplňkovým testom vzorky peľu na AFPA (*Aspergillus flavus parasiticus* selektívnom médiu) sme zistili absenciu *Aspergillus* sp., schopných produkovať mykotoxíny - aflatoxíny. Avšak zistené izoláty zo sekcie *Circumdati* môžu byť potenciálnymi producentmi mykotoxínu ochratoxínu A (Frisvad et al., 2004), izoláty *A. flavus* slovenského pôvodu majú často potenciú produkovať mykotoxín kyselinu cyklopiazónovú (Tančinová et al., 2007, Labuda a Tančinová, 2006), druh *A. fumigatus* produkuje tremorgénne mykotoxíny (Samson et al., 2007) a *Emericella nidulans* je konštantným producentom mykotoxínu sterigmatocystínu (Frisvad et al., 2006). Posledné tri uvedené druhy sú tiež potenciálnymi patogénmi človeka v skupine BSL-2 (De Hoog et al., 2000).

Podľa Bogdanova (2004) je z hygienického hľadiska mikrobiologická bezpečnosť hlavným kritériom kvality a je dôležité kontrolovať mikrobiologickú kvalitu peľu, obzvlášť absenciu patogénnych baktérií a mikroskopických húb. Niektoré mikroorganizmy môžu produkovať enzýmy, antibiotiká, mykotoxíny a rastové látky (vitamíny, aminokyseliny), môžu sa zúčastňovať na metabolických premenách a potláčať konkurujúce mikroorganizmy (Goerzen, 1991).

Vo vzorke medu s 2,91 % peľu sa znížil počet vlákňitých mikroskopických húb o 2,23 log KTJ.g⁻¹ (170 x) a vo vzorke medu s 3,85 % peľu bol pokles o 1,67 log KTJ.g⁻¹ (47 x) v porovnaní s pôvodnou vzorkou peľu.

Vo všetkých sledovaných mikrobiálnych parametroch zmesi peľu v mede sme zistili pokles počtov v porovnaní s pôvodnou vzorkou peľu. Výraznejší pokles CPM, CPAnM, sporulujúcich baktérií, koliformných baktérií, bifidobaktérií a kvasiniek sa prejavil vo vzorke medu s prídavkom 3,85 % peľu. Pokles vlákňitých mikroskopických húb bol vyšší vo vzorke medu s prídavkom 2,91 % peľu.

Pôvodnou vzorkou na obrázku 3A je med s prídavkom 2,91 % peľu. Analýzou sme zistili absenciu koliformných baktérií, tak ako bifidobaktérií a príbuzných baktérií (avšak tie neprežili ani prenos

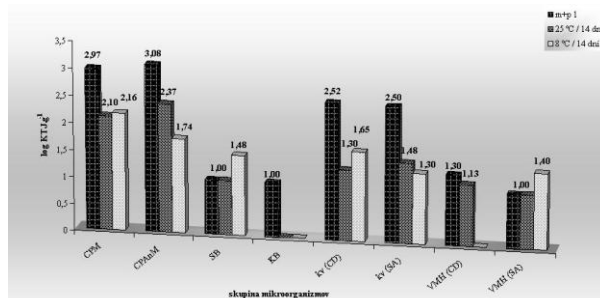
z peľu do medu) po 14 dňoch skladovania oboma spôsobmi. V znížení počtov ostatných mikrobiálnych skupín boli rozdiely.

Skladovaním pri izbovej teplote sa znížili počty všetkých sledovaných mikrobiálnych skupín porovnaním s pôvodnou vzorkou. Zaznamenali sme vyšší pokles CPM (o 0,87 log KTJ.g⁻¹, teda 7 x), počtu kvasiniek (o 1,12 log KTJ.g⁻¹, teda 13 x) a počtu vlákňitých mikroskopických húb (o 0,08 log KTJ.g⁻¹, teda 1 x). CPAnM sa znížil po 14 dňoch o 0,71 log KTJ.g⁻¹, 5 x. Počet sporulujúcich baktérií zostal na rovnakej úrovni.

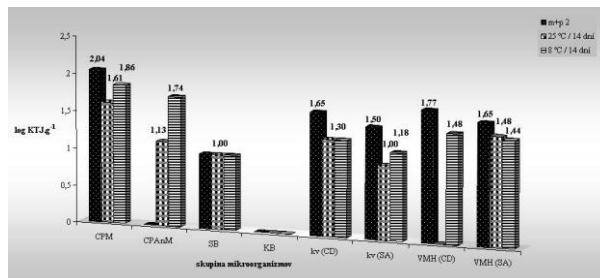
Skladovanie v chladničke viedlo k poklesu počtu mikroorganizmov, okrem vlákňitých mikroskopických húb (zачytených na jednom z dvoch použitých živných médií) a sporulujúcich baktérií. Počet vlákňitých mikroskopických húb sa zvýšil o 0,25 log KTJ.g⁻¹ - 2-násobne a počet sporulujúcich baktérií o 0,48 log KTJ.g⁻¹ - 3-násobne v porovnaní s pôvodnou vzorkou. V porovnaní so vzorkou skladovanou pri izbovej teplote sme zaznamenali vyšší pokles CPAnM - o 1,34 log KTJ.g⁻¹, teda 22-násobne oproti pôvodnej vzorke. CPM sa znížil po 14 dňoch o 0,81 log KTJ.g⁻¹ (6x) a počet kvasiniek sa znížil o 1,03 log KTJ.g⁻¹ (11x).

Súhrnne, vyššie poklesy počtu mikroorganizmov boli zaznamenané v mede s prídavkom peľu (2,91 %) po 14 dňoch skladovania pri izbovej teplote. Skladovanie v chladničke viedlo k malému nárastu vlákňitých mikroskopických húb a sporulujúcich baktérií a tiež k výraznému poklesu CPAnM.

A



B



Obrázok 3 Dynamika mikrobiálnych spoločenstiev vo vzorkách medu s prídavkom peľu po 14 dňoch skladovania pri izbovej teplote a v chladničke

A – med s prídavkom peľu 1,5 kg / 50 kg – 2,91 %

B – med s prídavkom peľu 2 kg / 50 kg – 3,85 %

m+p 1 – med s prídavkom peľu (2,91 %), m+p 2 – med s prídavkom peľu (3,85 %);

CPM – celkový počet mikroorganizmov, CPAnM – celkový počet anaeróbných mikroorganizmov, SB – sporulujúce baktérie, KB – koliformné baktérie, kv (CD) – kvasinky, kultivované na Czapek Dox agare, kv (SA) – kvasinky, kultivované na Sladivom agare, VMH (CD) – vlákňité mikroskopické huby, kultivované na Czapek Dox agare, VMH (SA) – vlákňité mikroskopické huby, kultivované na Sladivom agare;

KTJ – kolónia tvoriaca jednotka;

Pôvodnou vzorkou na obrázku 3B je med s prídavkom 3,85 % peľu. Koliformné baktérie; bifidobaktérie a príbuzné baktérie sa nenachádzali vo vzorkách v zistiteľnom množstve v uvedenej zmesi ani na začiatku ani po 14 dňoch. Počet sporulujúcich baktérií sa udržal pri oboch spôsoboch skladovania rovnaký ako na začiatku ($1,00 \log \text{KTJ.g}^{-1}$). Počet vláknitých mikroskopických húb sa znížil pri oboch spôsoboch skladovania 2-násobne. Skladovaním pri izbovej teplote klesol počet o $0,23 \log \text{KTJ.g}^{-1}$, pričom sme ich zachytili len na jednom z použitých živných médií a skladovaním v chladničke klesol ich počet priemerne o $0,25 \log \text{KTJ.g}^{-1}$. CPAnM v pôvodnej vzorke bol pod detekčným limitom metódy. Analýzou po 14 dňoch skladovania oboma spôsobmi sme zistili, že anaeróbne mikroorganizmy sa nachádzali vo vzorkách, bol zaznamenaný nárast na hodnotu $1,13 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ vo vzorke skladovanej pri izbovej teplote, čo predstavuje minimálne zdvojnásobený nárast. Vo vzorke, skladovanej v chladničke, bol CPAnM $1,74 \log \text{KTJ.g}^{-1}$, čo predstavuje minimálne 6-násobný nárast. CPM, tak ako aj počet kvasiniek klesli po skladovaní pri izbovej teplote o $0,43 \log \text{KTJ.g}^{-1}$, teda 3-násobne. Po skladovaní v chladničke klesli tieto počty 2-násobne, CPM klesol o $0,18 \log \text{KTJ.g}^{-1}$ a kvasinky o $0,34 \log \text{KTJ.g}^{-1}$.

Súhrnne, rozdiely mikrobiálnych ukazovateľov vzorky medu s prídavkom 3,85 % peľu po 14 dňoch skladovania boli veľmi malé. Vyšší pokles CPM a kvasiniek a nižší nárast CPAnM sme zaznamenali vo vzorke skladovanej pri izbovej teplote.

ZÁVER

Biodiverzitu, ako aj kvantitu mikroorganizmov v mede považujeme za premenlivé údaje, ktoré sú špecifické pre konkrétny analyzovaný med. Boli formované celým radom faktorov počas produkcie a spracovania medu. Pokiaľ med nebol vystavený extrémnym podmienkam, dochádza v ňom k rôznym fyzikálno-chemickým procesom a prirodzene sa v ňom nachádzajú niektoré mikroorganizmy.

V peľi sa, vo všeobecnosti, nachádza viac mikroorganizmov v porovnaní s medom. Z výsledkov analýz v našich experimentoch vyplýva, že je ich asi 1000-násobne viac v peľi ako v mede. Mikroorganizmy nachádzajúce sa v peľi sú veľmi rôznorodé. Je to dôsledok variability zdrojov, z ktorých pochádzajú. Taktiež ich fyzikálno-chemické charakteristiky sú iné ako pri mede a prichádzajú do styku s viacerými zdrojmi kontaminácie – pôdou, kvetmi, povrchom organizmu včiel, prachom a úľovým prostredím.

Peľ je veľmi cenným výživovým doplnkom a prirodzený spôsob ako ho uchovať v stave prijateľnom a stráviteľnom pre človeka je pridať ho do medu. Keď peľ pridáme do medu, zvýšime aj počet mikroorganizmov v zmesi medu s peľom v porovnaní s pôvodným medom a táto jedinečná zmes potrebuje určitý čas, aby sa s nimi vysporiadala. Cieľom nie je zničiť všetky mikroorganizmy, ale dosiahnuť rovnovážny stav, ktorý zabezpečí uchovanie produktu z hľadiska zdravotnej bezpečnosti a zároveň výživovej hodnoty. Výsledky analýz poukazujú na vhodne zvolené koncentrácie peľu v mede – 2,91 % (1,5 kg / 50 kg)

a 3,85 % (2 kg / 50 kg). Po primiešaní peľu do medu klesli počty mikroorganizmov v porovnaní s peľom a mierne stúpili v porovnaní s medom. Pričom vo vzorke s koncentráciou peľu 3,85 % bol pokles mikroorganizmov zreteľnejší, okrem vláknitých mikroskopických húb, ktorých počet viac klesol vo vzorke s 2,91 % peľu.

Už po 14-dňovom skladovaní sme zaznamenali poklesy počtu mikroorganizmov v porovnaní s výsledkami na začiatku pokusu. Je zaujímavé, že výraznejšie poklesy boli vo vzorke s koncentráciou peľu 2,91 %. Preto je možné, že existujú mechanizmy, ktoré po určitom čase skladovania vyrovnajú počty mikroorganizmov, nakoľko v sledovaných koncentráciách peľu v mede je rozdiel 0,94 %.

Z hľadiska spôsobu skladovania, výraznejší pokles počtu mikroorganizmov po 14 dňoch bol vo vzorkách, skladovaných pri izbovej teplote. V niektorých vzorkách skladovaných v chladničke sa mierne zvýšil počet anaeróbnych mikroorganizmov, vláknitých mikroskopických húb a sporulujúcich baktérií po 14 dňoch.

Uvedené výsledky sú čiastkové, v analýzach vzoriek skladovaných pri izbovej teplote a v chladničke pokračujeme.

LITERATÚRA

BOGDANOV, S. 2004. Quality and Standards of Pollen and Beeswax. In *Apiacta*, vol. 38, 2004, no. 11, p. 334-341.

CARVALHO, C. M., ROCHA, A., ESTEVINHO, M. L. F., CHOUPINA, A. 2005. Identification of honey yeasts species based on RFLP analysis of the its region. In *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, vol. 5, 2005, no. 1, p. 11-17. ISSN 1135-8122.

COOPER, R. 2005. *Chapter 2 – The antimicrobial activity of honey*. [online]. [cit. 2009-01-16]. Dostupné na internete: <<http://www.medicalhoney.com>>.

DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., FIGUERAS, M. J. 2000. *Atlas of clinical fungi*. 2nd edition. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 1126 p. ISBN 90-70351-43-9.

DEMETER, Š., HAŠČÍK, J. 2008. *Včelie produkty*. 3. zväzok v edícii Slovenská včela. Nitra : Polymedia, 2008. 60 p. ISBN 978-80-969977-0-1.

FINOLA, M. S., LASAGNO, M. C., MARIOLI, J. M. 2007. Microbial and chemical characterization of honeys from central Argentina. In *Food Chemistry*, vol. 100, 2007, issue 4, p. 1649-1953.

FRISVAD, J. C., FRANK, J. M., HOUBRAKEN, J. A. M. P., KUIJPERS, A. F. A., SAMSON, R. A. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. In *Studies in Mycology*, vol. 50, 2004, p. 23-43.

FRISVAD, J. C., THRANE U., SAMSON, R. A., PITT, J. I. 2006. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In HOCKING, A. D., PITT, J., SAMSON, R. A., THRANE, U. 2006. *Advances in Food Mycology*. Berlin : Springer, vol. 571, 2006, p. 1-131.

GOERZEN, D. W. 1991. Microflora associated with the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata* (Fab) (Hymenoptera: Megachilidae) in Saskatchewan, Canada. In *Apidologie*, vol. 22, 1991, no. 5, p. 553-561.

GONZÁLEZ, G., HINOJO, M. J., MATEO, R., MEDINA, A., JIMÉNEZ, M. 2005. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 105, 2005, no. 1, p. 1-9.

IURLINA, M. O., FRITZ, R. 2005. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources.

In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 105, 2005, no. 3, p. 297-304. ISSN 0168-1605.

KAČÁNIOVÁ, M., KŇAZOVICKÁ, V., NÔŽKOVÁ, J., ŠRAMKOVÁ, K. 2008. Microbiology of honeybee collected pollen. In *Dovkillja i zdorovja ljudini*. Užgorod : Vidavnicтво UžNU (Goverla), 2008, p. 357-360.

KAČÁNIOVÁ, M., PAVLIČOVÁ, S., HAŠČÍK, P., KOCIUBINSKI, G., KŇAZOVICKÁ, V., SUDZINA, M., SUDZINOVÁ, J., FIKSELOVÁ, M. 2009. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. In *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, vol. 56, 2009, no. 3, p. 285-295, ISSN 1217-8950.

LABUDA, R., TANČINOVÁ, D. 2006. Fungi recovered from slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenity. In *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 13, 2006, p. 193-200.

MARTINS, H. A., MARTINS, M. L., BERNARDO, F. M. A. 2003. *Bacilaceae* spores, fungi and aflatoxins determination in honey. In *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, vol. 98, 2003, p.85-88.

OLOFSSON, T. C., VÁSQUEZ, A. 2008. Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*. In *Current Microbiology*, vol. 57, 2008, no. 4, p. 356-363.

RADA, V., SIROTEK, K., PETR, J. 1999. Evaluation of Selective Media for Bifidobacteria in Poultry and Rabbit Caecal Samples. In *Journal of Veterinary Medicine, series B*, vol. 46, 1999, issue 6, p. 369-373, ISSN 0931-1793.

SAMSON, R. A., HONG, S., PETERSON, S. W., FRISVAD, J. C., VARGA, J. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. In *Studies in Mycology*, vol. 59, 2007, p. 147-203.

SNOWDON, J. A., CLIVER, D. O. 1996. Microorganisms in honey. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 31, 1996, issue 1-3, p. 1-26.

STN ISO 4832 Mikrobiológia – M4: 1997. *Všeobecné pokyny na stanovenie počtu koliformných baktérií. Metóda počítania kolónii v potravinách a krmivách.*

STN EN ISO 4833 Mikrobiológia – M1: 1997. *Všeobecné pokyny na stanovenie celkového počtu mikroorganizmov metódou počítania kolónii v potravinách a krmivách.*

STN ISO 7954 Mikrobiológia – M10: 1997. *Všeobecné pokyny na stanovenie počtu kvasiniek a plesní metódou počítania kolónii v potravinách a krmivách.*

STN 56 0087 (ISO 7954) R – 12: 2010. *Dôkaz potenciálnych toxínogénnych húb rodov Aspergillus a Penicillium.*

TANČINOVÁ, D., DOVIČIČOVÁ, M., LABUDA, R. 2007. *Aspergillus* sekcia *Flavi-* potenciálny producent

mykotoxínov. In *Zborník z medzinárodnej konferencie Rizikové faktory potravinového reťazca*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2007, p. 219-223.

TITĚRA, D. 2006. *Včelí produkty mýtů zbavené – med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. 1. vydání. Praha : Nakladatelství Brázda, s. r. o., 2006. 176 p. ISBN 80-209-0347-X.

Acknowledgments:

This work was supported by grants VEGA 1/0372/09 and KEGA 430-014SPU-4/2010.

Contact address:

Ing. Vladimíra Kňazovická, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +421376415812, E-mail: vladimira.knazovicka@uniag.sk

doc. Ing. Miroslava Kačániová, PhD., Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +421376414494, E-mail: miroslava.kacaniova@uniag.sk

Ing. Mária Dovičičová, PhD., Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mddmfbp@gmail.com

Ing. Martin Melich, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +421376415821, E-mail: matko7903@gmail.com

Ing. Miriam Kadási-Horáková, PhD. Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +421376415813, E-mail: mirka.kadasihorakova@gmail.com

Ing. Zuzana Barboráková, Department of Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +42137 6415812, E-mail: zuzana.barborakova@gmail.com

Ing. Ján Mareček, PhD., Department of Plant Processing and Storage, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Phone: +421376414379, E-mail: jan.marecek@uniag.sk