

МИКРОБИОЛОГИЧНИ ОПАСНОСТИ ПРИ ПРОИЗВОДСТВОТО НА ЦВЕТЕН  
ПЧЕЛЕН ПРАШЕЦ. I. ОБЩ БРОЙ МИКРООРГАНИЗМИ ОТ СЕМ.  
*ENTEROBACTERIACEAE*

Динко Динков

MICROBIOLOGICAL HAZARDS OF FLOWER BEE POLLEN PRODUCTION.  
I. TOTAL COUNT OF MICROORGANISMS FROM ENTEROBACTERIACEAE FAMILY  
Dinko Dinkov

Department of Hygiene and Technology of Animal Foodstuffs,  
Veterinary legislation and management, Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University,  
6000 Stara Zagora, Bulgaria; E-mail: [dinkodinkov@abv.bg](mailto:dinkodinkov@abv.bg)

ABSTRACT

The total counts of microorganisms from the *Enterobacteriaceae* family were determined in dried and raw flower bee pollen from 8 regions of Bulgaria after one-year vacuum-packed cold storage (0-4 °C and -18 °C). Higher microbial counts were established for raw pollen ( $1.32 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  CFU/g) than for dried pollen ( $7.5 \times 10^2 - 8.5 \times 10^3$  CFU/g). Additional research on the species-level differentiation of the *Enterobacteriaceae* microflora and objective assessment of the risk for consumers is recommended.

**Key words:** flower bee pollen, microorganisms, *Enterobacteriaceae*

**Въведение**

За разлика от другите добре познати пчелни продукти като пчелния мед и восък Polenът не се произвежда от пчелите, а се събира от тях от растенията. Той представлява важен източник за пчелите за осигуряване на въглехидрати, протеини, аминокиселини, липиди, витамини, микро и макроеlementи (Bastos et al., 2004), полифенолни и други биологичноактивни субстанции (Bogdanov et al., 2014).

Поради съдържанието на хранителни вещества и в частност на енергия събираният от пчелите Polen е известен и като храна за хората (Campos et al., 2008). Освен като храна пчелният прашец е използван и за терапевтични цели (Kasaniouva et al., 2011). България и някои други страни като Бразилия, Полша и Швейцария имат въведени нормативни изисквания към пчелния прашец (Campos et al., 2008). В нормативните документи, регламентиращи изискванията към цветния пчелен прашец у нас (Централен кооперативен съюз, 1991; Наредба № 9, 2005), не се посочват специфични микробиологични критерии към този продукт. В световен мащаб все още липсват утвърдени специфични критерии и стандарти за микробиологичен анализ на цветния пчелен прашец, предназначен за консумация от човека.

За да се гарантират желаните от потребителите безопасност и качество на предлагания на пазара, произведен при изискванията за биопроизводство цветен пчелен прашец през 2014 г. в нашата страна бяха предложени редица допълнителни изисквания към неговото производство като бе акцентирано върху основните микробиологични опасности (Stratev et al., 2014). Впоследствие бяха представени и изисквания към производството на цветен пчелен прашец от несертифицирани по изискванията за биопроизводство пчелини (Parvanov et al., 2014).

В световен мащаб са извършвани оскъден брой проучвания за констатиране на микроорганизми в цветния пчелен прашец, предназначен за консумация от човека. Според някои автори в него могат да се установят микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae*, които се счита, че попадат в продукта от външната среда (вода, почва и др.). Поради факта, че част от тези микроорганизми се съдържат в чревния тракт на животните и човека се счита, че те могат да попаднат в непреработените термично храни, какъвто е и пчелния прашец, поради което микроорганизмите от това семейство се определят като важен индикатор за вторично замърсяване на храните с фекални микроорганизми (Bouriche et al., 2011). Наличието на колиформи в храните се свързва с възможната фекална контаминация, която би могла да доведе до редица чревни заболявания при човека (Shanthi et al., 2012).

Имайки пред вид нарастващият интерес към цветния пчелен прашец като храна за човека, която в голяма степен отразява и замърсеността на околната среда, неговата безопасност за

консуматорите и чистота по отношение на липсата на замърсявания от околната среда се разглежда от все повече специалисти.

Цел на настоящото проучване бе, да се извърши определяне на броя на микроорганизмите от сем. *Enterobacteriaceae* в неизсушен и изсушен цветен пчелен прашец от 8 региона на България, след период на едногодишното съхранение на пробите във вакуумирно състояние при ниски температури.

**Материал и методи**

През м. юни 2014 г. бяха получени и изследвани общо 32 броя проби неизсушен и изсушен пчелен прашец от осем региона на страната: Странджа, Сливен, Стара Загора, Шумен, Ловеч, Враца, В.Търново и Карлово. Пробите произхождаха от пчелини, разположени в индустриално незамърсени местности отстоящи на 3 km от площи с интензивно земеделие, пътица и промишлени предприятия (Bogdanov, 2006). При някои от регионите (В. Търново, Ст. Загора и Карлово), не бяха предоставени проби преди изсушаване на пчелния прашец, с което се обяснява по-малкия брой на пробите неизсушен (n=13), в сравнение с изсушения пчелен прашец (n=19).

За установяване на микробиологичните показатели след период на едногодишно съхранение пробите бяха вакуумирани в опаковъчни полиетиленови торбички на 8-ма степен посредством вакуумираща машина miniVac (Vac-Star AG, Switzerland, available: <http://www.vac-star.com/en/p1-miniVAC.html>). До момента на анализите пробите изсушен пчелен прашец бяха съхранявани при хладилни условия (0-4°C), (Наредба № 9, 2005), а пробите неизсушен пчелен прашец в замразено състояние при (-)18°C (Dominguez-Valhondo et al., 2011).

Микробиологичните изследвания на пробите се извършиха, след тяхното едногодишно съхранение.

**Подготовка на пробите за микробиологичен анализ**

Подготвя се основно разреждане като 25 g от пчелния прашец се разреждат с 225 mL буферна пептонова вода, (Merck, Darmshtadt, Germany), след което се хомогенизират за 10 мин при 200 rpm в стомашер. Оставят се за 30 мин. на стайна температура, след което се подготвят степенни разреждания в стерилен физиологичен разтвор.

**Общ брой микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae*:** 100 µL от основното и степенните разреждания се поставяха със стерилен накрайник и автоматична пипета, след което се разстилаха на повърхността на петри с Violet Red Bile Glucose agar (VRBG Agar), (Merck, Darmshtadt, Germany). Петрите се инкубираха при 37°C и след 24 часа и се изброяваха типичните за колонии (тъмно-червени с диаметър 0,5 мм и повече).

Анализите бяха проведени в изпълнение на задачите по научен проект 07/2014 на ВМФ при Тракийски университет в лабораторията на катедра Хигиена, технология и контрол на хранителните продукти, ветеринарно законодателство и мениджмънт на ВМФ при Тракийски университет.

**Резултати и обсъждане**

На табл.1 са представени резултатите, получени при определяне на общия брой микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae*.

**Табл. 1. Общ брой микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* (CFU/g) в цветен пчелен прашец от 8 региона на РБългария (n=32)**

Региони	Изсушен пчелен прашец (n=19)	Региони	Неизсушен пчелен прашец (n=13)
Ловеч (n=1)	$7,5 \times 10^2$	Враца (n=2)	$1,32 \times 10^4$
Странджа (n=4)	$8,5 \times 10^3$	Странджа (n=4)	$5 \times 10^4$
Шумен (n=6)	$3,6 \times 10^3$	Шумен (n=6)	$1,4 \times 10^4$
Сливен (n=1)	$1,5 \times 10^3$	Сливен (n=1)	$3,7 \times 10^4$
Велико Търново (n=3)	$1,4 \times 10^3$	-	-

## Science & Technologies

Стара Загора (n=2)	неустановени*	-	-
Карлово (n=2)	неустановени*	-	-

неустановени \* - не е отчетен брой на микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* при директно инокулиране на 100  $\mu$ L върху VRBD агар (виж Материал и методи).

Известно е, че колиформите са грам-отрицателни, оксидаза отрицателни, неспорулиращи, аеробни и факултативно анаеробни пръчковидни бактерии. Тази група не са таксономично разделени, но се дефинират функционално като ферментиращи лактозата микроорганизми, продуциращи газ и киселина при 35°C. Тук се включват освен род *Esherichia* в частност *E.coli* и род *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Klebsiella*. Някои специалисти включват в тази група и *Serratia* и *Hafnia*. Част от колиформите се установяват като нормални обитатели на чревния тракт на животните и човека. Те се срещат и в околната среда, почвата и водата. Около 1% от колиформите, от които соновно *E.coli*, се установяват в чревния тракт на животните и човека. В сем. *Enterobacteriaceae* се включват общо около 20 рода в това число и колиформите, както и някои други доказано патогени и пренасяни чрез храните микроорганизми като тези от род *Salmonella*, *Shigella* и *Yersinia* (Tortorello, 2003).

Получените от нас резултати за общ брой микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* сочат по-високи стойности при неизсушения ( $1,32 \times 10^4$  -  $5 \times 10^4$  CFU/g), в сравнение с изсушения пчелен прашец ( $7,5 \times 10^2$  -  $8,5 \times 10^3$  CFU/g). Следва да се посочи също, че в два от обследваните региона не бяха констатирани микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* (табл.1).

Най-голям брой микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* при нашите проучвания бе установен в изсушения пчелен прашец от рег. Странджа ( $8,5 \times 10^3$  CFU/g), следван от рег. Шумен ( $3,6 \times 10^3$  CFU/g), рег. Сливен ( $1,5 \times 10^3$  CFU/g), рег. В. Търново ( $1,4 \times 10^3$  CFU/g) и рег. Ловеч ( $7,5 \times 10^2$  CFU/g). Не бяха констатирани микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* при пробите от рег. Стара Загора и рег. Карлово. Най-високи стойности на микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* при неизсушения пчелен прашец бяха установени също при пробите от рег. Странджа ( $5 \times 10^4$  CFU/g), следвани от рег. Сливен ( $3,7 \times 10^4$  CFU/g), рег. Шумен ( $1,4 \times 10^4$  CFU/g), и рег. Враца ( $1,32 \times 10^4$  CFU/g). Данните за неустановени микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* в изсушения пчелен прашец от някои региони (Ст. Загора и Карлово), (табл. 1) показват решаващата роля на хигиената на добив и своевременното изсушаване, като основни фактори, възпрепятстващи вторичната контаминация и развитието на микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae*.

Съгласно установените в литературата проекти за международни изисквания към пчелния прашец в този продукт се препорачват до 100 CFU/g микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* (Campos et al., 2008). Спрямо тези препоръки в пробите изсушен прашец от нашата страна стойностите варират от  $7,5 \times 10^2$  -  $8,5 \times 10^3$  CFU/g . При интерпретация на тези резултати следва да се има пред вид факта, че в сем. *Enterobacteriaceae* освен колиформите се включват и редица други микроорганизми, част от които са патогенни като род. *Salmonella*, *E.coli* и др., но други са широко разпространени в околната среда и са известни като опортюнистични или факултативно патогенни микроорганизми, рядко предизвикващи заболявания при хората (Sanders and Sanders, 1997). По отношение на вторите микроорганизми все още няма данни за извършването на съвременна оценка на риска от наличието, както и критерии за допустимостта или липсата им в храните, с оглед гарантиране на безопасността за консуматорите.

От друга страна научните проучвания сочат, че някои заболявания при растенията се пренасят чрез полена (Flores et al., 2005; Card et al., 2007). Известно е, че преди и по време на транспорта до кошерите пчелите намокрят полена с нектар и го поставят в кошничките, разположени по крачетата им, което го прави податлив на допълнителна микробна контаминация. Важна роля за поленовата контаминация играят замърсеността на околната среда около кошерите, чрез въздуха от мястото на растеж на растенията, от дейността на

## Science & Technologies

пчелите, които играят важна роля при опрашването на растенията, при транспортирането на прашеца от пчелите до кошерите, в резултат на човешката дейност при неговото събиране от прашецоуловителите, както и при последващата му първична обработка (пресяване, изсушаване и опаковане), (Gilliam, 1979; Serra et al., 1987; Serra and Escola, 1997). Други фактори на околната среда като вятър, дъжд, капчици роса или мъгла или пръскане за напояване на растенията също играят роля при контаминацията на пчелния прашец (Lasey and West, 2007; Venette, 2012).

Получените от нас резултати за завишен брой микроорганизми сем. *Enterobacteriaceae* в неизсушения пчелен прашец ( $1,32 \times 10^4$  -  $5 \times 10^4$  CFU/g), сочат основната роля на вторичното му контаминиране с тези микроорганизми, които биха могло да попаднат в резултат на наличието им в околната среда, по растенията, пчелите, както и при събирането на прашеца от прашецоуловителите и неговото пресяване. От друга страна данните за по-нски стойности на микроорганизмите от сем. *Enterobacteriaceae* в изсушения пчелен прашец ( $7,5 \times 10^2$  -  $8,5 \times 10^3$  CFU/g), показват важността на доброто изсушаване на продукта, с оглед подтискане развитието на микроорганизмите и постигане на приемливи нива на безопасност за консуматора. Въз основа на получените резултати, препоръчваме определянето на общия брой микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* при техния рутинен лабораторен анализ да се последва и от видовото им диференциране, с оглед обективна преценка на продуктовата безопасност.

### Заклучения

Установени са по-високи стойности на микроорганизмите от сем. *Enterobacteriaceae* при неизсушения ( $1,32 \times 10^4$  -  $5 \times 10^4$  CFU/g), в сравнение с изсушения пчелен прашец ( $7,5 \times 10^2$  -  $8,5 \times 10^3$  CFU/g). Препоръчва се извършването на допълнителни проучвания, с оглед установяване на видовете различия между намиращите се в цветния пчелен прашец микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae*, с оглед гарантиране на неговата безопасност за консуматорите.

За минимализиране на риска от вторична контаминация с микроорганизми от сем. *Enterobacteriaceae* по време на първичната обработка на цветния пчелен прашец се препоръчва неговото ежедневно събиране от прашецоуловителите и незабавно провеждане на първичната обработка в чисти и хигиенични помещения от здрави работници.

### Литература

1. Наредба №9 от 22 юни 2005 г. за условията и реда за одобряване и регистрация на предприятията за преработка на восък и производство на восъчни основи, както и на предприятията за производство и търговия с пчелен мед и пчелни продукти, Издадена от министерство на земеделието и горите (Обн., ДВ, бр. 54 от 01.07.2005 г.
2. Централен кооперативен съюз. 1991. Отраслова нормала (ОН) 2567111-91, Прашец цветен пчелен, 1-7.
3. Bastos, D. H. M., Barth, M. O., Rocha, C. I., Cunha, I. B. S., Carvalho, P. O., Torres, E. A. S., Michelin, M., 2004, Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states of Sao Paulo and Minas Gerais, Brazil. *Journal of Apicultural Research*, 43: 35-39.
4. Bogdanov, S. 2006. Contaminants of bee products, Review article, *Apidologie*, 37,1-18.
5. Bogdanov, S., 2014, Pollen: Production, Nutrition and Health: A Review: [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net).
6. Bouriche H., Karnouf N., Belhadj H., Dahamna S., Harzalah D., A. Senator, 2011. Free Radical, Metal-chelating and Antibacterial Activities of Methonolic Extract of *Capparis Spinosa* buds. *Adv. Environ. Biol.*, 5(2), 281-287.
7. Campos, M.G.R., S. Bogdanov, L.B. Almeida-Muradian, T. Szczesna, Y. Mancebo, C. Frigerio & F. Ferreira, 2008. Pollen composition and standardization of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47(2): 156-163.
8. Card, S., Pearson, M., Clover, G. R., 2007. Plant pathogens transmitted by pollen. *Australasian Plant Pathology*, 36: 455-461.

## Science & Technologies

9. Dominguez-Valhondo, D., D. B. GIL, M. T. Hernandez □ D. Gonzalez-Gomez (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (10). 2204-2211.
10. Flores, J., Gutiérrez, I., Espejo, R., 2005. The role of pollen in chalkbrood disease in *Apis mellifera*: transmission and predisposing conditions. *Mycologia*, 97: 1171-6.
11. Gilliam, M., 1979. Microbiology of pollen and bee bread: The genus *Bacillus*. *Apidologie*, 10: 269-274.
12. Kacaniova, M., Juracek, M., Chlebo, R., Knazovicka, V., Kadasi-Horakova, M., Kunova, S., Lejkova, J., Hascik, P., Marecek, J., Simko, M., 2011. Mycobiota and mycotoxins in bee pollen collected from different areas of Slovakia. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46: 623-629.
13. Lacey, M., West, J., 2007. A manual for catching and identifying airborne biological particles (pp. 15-34). Springer. Retrieved from <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/aerobiologia.pdf>.
14. Parvanov, P., Stratev D., Balkanska R., D. Dinkov, 2014. Specific requirements for processing , storage and marketing of flower bee pollen, pp.52-53, Abstracts and Program, International Scientific Conference "20 years Faculty of Veterinary Medicine at the University of Forestry, 28-30.11.2014, Yundola, Bulgaria.
15. Sanders, W.E., Jr., Sanders, C.C., 1997. Enterobacter spp.: Pathogens poised to flourish at the turn of the Century. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 220-241.
16. Serra, B. J., Escola, J. R., 1997. Nutrient Composition and Microbiological Quality of Honeybee-Collected Pollen in Spain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 725-732.
17. Serra, B. J., Gomez Pajuelo, A., and Gonell Galindo, F., 1987. Se'chage and pollen conservation. French magazine CIPA, 465, 354-355.
18. Shanthi, M., Sekar, U., Sridharan, K. S., 2012. Septic Arthritis of Hip Caused by *Salmonella typhi*: A Case Report. *Case Reports in Infectious Diseases*, 3.
19. Stratev, D., R. Balkanska, St. Mateev, D. Dinkov, 2014. Processing, storage, labeling and microbiological hazards of organic bee pollen production, "24-th International Scientific Conference, Dedicated to the 70-Anniversary of the Foundation of the Union of Scientists in Bulgaria", Science & Technologies, Volume IV, Number 5, 21-27. Animal studies & Veterinary medicine. <http://journal.sustz.com/VolumeIV/Number5/Papers/DeyanStratev1.pdf>.
20. Tortorello, M., 2003. Indicator Organisms for Safety and Quality – Uses and Methods for Detection: Minireview. *Journal of AOAC International*, 86: 1208-1217.
21. Venette, J. R., 2012. How bacteria find their hosts. In M. S. Mount and G. H. Lacy (ed.), *Phytopathogenic Prokaryotes* (pp. 18-22). Elsevier.