

Mikrobiološka analiza meda s identifikacijom plijesni



M. Kiš*, S. Furmeg, V. Jaki Tkalec, J. Sokolović, M. Zadravec, D. Majnarić i Ž. Cvetnić

Sažetak

Cilj rada je istražiti mikrobiološku kvalitetu uzoraka meda, uzorkovanih na području sjeverozapadne Hrvatske. Tijekom 2018. godine uzorkovano je ukupno 40 uzoraka različitih vrsta meda te je provedena analiza aerobnih mezofilnih bakterija, bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*, sulfitreducirajućih klostridija te kvasaca i plijesni prema kriterijima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu. Od ukupnog broja pretraženih uzoraka, prisutnost kvasaca utvrđena je u 25,0% uzoraka meda, dok je u 27,5% uzoraka utvrđena prisutnost plijesni u koncentraciji od 10 do 100 cfu/g. Na izdvojenim izolatima

plijesni koji su bili nesukladni u odnosu na preporučeni kvantitativni kriterij (10 cfu/g), provedena je daljnja identifikacija, čime je u uzorcima meda utvrđena prisutnost sedam rodova plijesni: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Acremonium*, *Paecilomyces* i *Pestalotiopsis*. Iako se rodovi plijesni izdvojeni u ovom istraživanju smatraju čestim onečišćivačima pčelinjih proizvoda, njihova prisutnost upućuje na nužnost proizvodnje sukladno pravilima dobre pčelarske prakse uz sustavno provođenje mikrobiološke kontrole meda i drugih pčelinjih proizvoda.

Ključne riječi: med; mikrobiološka analiza; plijesni; identifikacija

Uvod

Med je prirodni pčelinji proizvod koji se od davnina koristio kao hrana, sredstvo za konzerviranje te u terapeutske svrhe. Prema kemijskom sastavu, med je složena smjesa ugljikohidrata i vode uz nizak sadržaj organskih kiselina, aminokiselina, proteina, minerala, lipida i vitamina (White i sur., 1962.). Prirodni sastojci prisutni u medu odgovorni su za široki spektar antimikrob-

nog (antibakterijskog, antifungalnog i antivirusnog) djelovanja (Almasaudi i sur., 2017.). Prisutnost specifičnih tvari (poput fenola, flavonoida, aromatskih kiselina), kiselost, osmotalnost i enzimsko stvaranje vodikovog peroksida u medu inhibiraju rast i umnažanje patogenih bakterija i uzročnika kvarenja hrane. Sastav i svojstva meda ovise o botaničkom podrijetlu i sadržaju aktiv-

Maja KIŠ*, mag. ing. bioproc., mag. ing. agr., (dopisni autor, e-mail: kis.vzk@veinst.hr), stručna suradnica, Sanja FURMEG, dipl. sanit. ing., stručna suradnica, dr. sc. Vesna JAKI TKALEC, dr. med. vet., znanstvena suradnica, Jadranka SOKOLOVIĆ, dr. med. vet., stručna suradnica, Veterinarski zavod Križevci, Hrvatski veterinarski institut, Hrvatska; dr. sc. Manuela ZADRAVEC, dr. med. vet., znanstvena suradnica, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Darko MAJNARIĆ, dr. med. vet., znanstveni suradnik, dr. sc. Željko CVETNIĆ, dr. med. vet., akademik, Veterinarski zavod Križevci, Hrvatski veterinarski institut, Hrvatska

nih komponenti biljaka na koje mogu utjecati različiti okolišni čimbenici (npr. godišnje doba, kemotip, klimatski uvjeti). Iako med posjeduje karakteristična svojstva koja onemogućuju rast i razmnožavanje većine mikroorganizama, postoje mikroorganizmi koji mogu preživjeti u medu i time utjecati na stabilnost i kvalitetu proizvoda. Tijekom proizvodnje meda može doći do onečišćenja iz dva izvora. Primarno onečišćenje povezano je uz probavni sustav pčele, prašinu, tlo, pelud, nektar i zrak. Mikrofloru koja je povezana uz pčele i njihovu hranu (šećerno medna pogača, pelud) čine pleomorfne bakterije, plijesni (iz rodova *Penicillium*, *Mucor* i *Aspergillus*), bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae*, sporiformne bakterije (većinom *Bacillus* spp.) i kvasci (Gilliam, 1997.). Sekundarni izvori onečišćenja nastaju tijekom tehnološkog procesa proizvodnje meda i čuvanja. Primarnu mikrofloru meda je vrlo teško kontrolirati, dok se sekundarni izvori onečišćenja kontroliraju primjenom dobre proizvodjačke prakse (Grabowski i Klein, 2015., Salgado Silva i sur., 2017.).

Istraživanja zdravstvene ispravnosti meda većinom su usmjerena prema bakterijskom onečišćenju. Med je kao izvor slobodnih aminokiselina, šećera i minerala, prikladan medij za umnažanje kvasaca i plijesni, posebice zbog neprikladne manipulacije tijekom proizvodnje i nepovoljnih uvjeta skladištenja. Prisutnost kvasaca i plijesni u medu je česta i neizbježna. Plijesni s terminalno rezistentnim sporama imaju veliku sposobnost preživljavanja u okolišu, pčele ih sakupljaju zajedno s nektarom, a povezane su uz košnicu, ispašu i probavni sustav pčele (Kačaniova i sur., 2009.). Rast i sporulacija plijesni ovisi o okolišnim uvjetima, najviše o aktivitetu vode i temperaturi. Ukoliko med sadrži više od 17% vode, njegova stabilnost ovisi o sadržaju mikroorganizama (Snowdon i Cliver, 1996.). Prema zahtjevima

Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu (2011.), maksimalno dopuštena koncentracija (MDK) za aerobne mezofilne bakterije iznosi 10^3 cfu/g, dok je za *Enterobacteriaceae*, sulfitreducirajuće klostridije te kvasce i plijesni maksimalno dopuštena koncentracija 10 cfu/g.

Zbog promjene prehrambenih navika i svijesti potrošača prema zdravoj i kvalitetnoj hrani, potrošnja meda i ostalih pčelinjih proizvoda u Hrvatskoj je u porastu. Osim zabrinutosti potrošača vezanih uz problem patvorenja meda, vrlo je važno osigurati da med i pčelinji proizvodi prisutni na tržištu budu mikrobiološki ispravni. S obzirom na uvriježeno mišljenje o mikrobiološkoj čistoći meda, vrlo je malo istraživanja koja se bave prisutnošću mikroorganizama u medu, a posebice plijesnima i kvascima. U cilju proizvodnje zdravstveno ispravne hrane i zaštite zdravlja potrošača potrebna je primjena dobre pčelarske prakse tijekom svih faza procesa proizvodnje uz primjenu preventivnih postupaka samokontrole procesa. Svrha ovoga rada je određivanje mikrobiološke kvalitete meda s područja sjeverozapadne Hrvatske uz poseban naglasak na identifikaciju plijesni u nesukladnim uzorcima.

Materijali i metode

Tijekom 2018. godine ukupno je uzorkovano 40 uzoraka meda s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava i kod manjih proizvođača na području sjeverozapadne Hrvatske (Grad Zagreb - 4 uzorka, Zagrebačka županija - 7 uzoraka, Krapinsko - zagorska županija - 4 uzorka, Varaždinska županija - 8 uzoraka, Koprivničko - križevačka županija - 17 uzoraka). Uzorci su do analize čuvani u sterilnim staklenim posudama pri sobnoj temperaturi.

Mikrobiološka analiza

Mikrobiološka analiza uzoraka meda provedena je prema Vodiču

za mikrobiološke kriterije za hranu (2011.). Mikrobiološke analize vršene su na aerobne mezofilne bakterije, *Enterobacteriaceae*, sulfitreducirajuće klostridije, kvasce i plijesni. Za izdvajanje i identifikaciju mikroorganizama u medu korištene su mikrobiološke metode uzgoja na podlogama (Tabela 1).

Određivanje plijesni je provedeno na DG 18 agaru (Dichloran 18% mass fraction glycerol agar, Biokar, Francuska) prema standardnoj metodi Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni – 2. dio: Tehnika brojenja kolonija s aktivitetom manjim ili jednakim 0,95. Za identifikaciju plijesni do razine

Tabela 1. Mikrobiološke metode izolacije i identifikacije mikroorganizama

Mikroorganizmi	Hranjiva podloga	Uvjeti inkubacije	Metoda
Aerobne mezofilne bakterije	Plate Count agar (PCA agar, Biokar, Francuska)	30 °C tijekom 72 h	HRN EN ISO 4833-1:2013
<i>Enterobacteriaceae</i>	Violet Red Bile Glucose agar (VRBG agar, Biokar, Francuska)	37 °C tijekom 24 ± 2 h	HRN EN ISO 21528-2:2017
Sulfitreducirajuće klostridije	Tryptose sulphite cycloserine agar (TSC agar, Biokar, Francuska)	37 °C tijekom 24-48 h (anaerobno)	HRN ISO 15213:2004
Kvasci i plijesni	DG 18 agar (Dichloran 18% mass fraction glycerol agar, Biokar, Francuska)	25 °C tijekom 5 dana	ISO/FDIS 21527-2:2008

Tabela 2. Prikaz mikrobiološki nesukladnih uzoraka

Vrsta meda	Kvasci (cfu/g)	Plijesni (cfu/g)	Aerobne mezofilne bakterije (cfu/g)
Cvjetni 1	<10	18	<10 ³
Cvjetni 2	<10	27	<10 ³
Cvjetni 3	82	36	<10 ³
Cvjetni 4	90	<10	<10 ³
Bagrem 1	<10	18	<10 ³
Bagrem 2	27	36	<10 ³
Bagrem 3	218	27	>10 ³
Bagrem 4	36	45	<10 ³
Bagrem 5	82	<10	<10 ³
Kesten 1	<10	27	<10 ³
Kesten 2	<10	45	<10 ³
Kesten 3	18	27	<10 ³
Lipa 1	182	<10	>10 ³
Lipa 2	90	<10	<10 ³
Uljana repica 1	418	<10	>10 ³
Livada 1	<10	100	<10 ³

Tablica 3. Rezultati identifikacije plijesni

Rod plijesni	Broj izolata plijesni u različitim vrstama meda						
	Cvjetni	Bagrem	Kesten	Lipa	Uljana repica	Livada	Σ
<i>Cladosporium sp.</i>	+ (1)	+ (1)	+ (1)	-	-	-	3
<i>Penicillium sp.</i>	+ (2)	+ (1)	-	-	-	-	3
<i>Alternaria sp.</i>	-	-	+ (1)	-	-	-	1
<i>Mucor sp.</i>	-	+ (1)	-	-	-	+ (1)	2
<i>Acremonium sp.</i>	-	+ (1)	-	-	-	-	1
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	-	-	+ (1)	-	-	-	1
<i>Paecilomyces sp.</i>	-	+ (1)	-	-	-	-	1
Σ	3	5	3	0	0	1	12

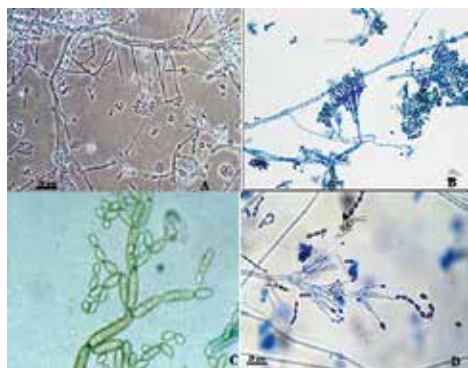
roda korišten je Czapek Yeast Extract i Malt Extract Agar Nutrition medium, a postupak je proveden prema Pitt i Hocking (2009.).

Rezultati

Tijekom naših istraživanja mikrobiološkom analizom meda u 16 (40,0%) uzoraka utvrđena je prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija, kvasaca i plijesni. Uzorci ne udovoljavaju zahtjevima Vodiča za mikrobiološke kriterije za hranu. Prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija iznad propisane maksimalne koncentracije utvrđena je

u 3 (7,5%) uzorka, prisutnost kvasaca utvrđena je u 10 (25,0%) uzoraka meda, dok je u 11 (27,5%) uzoraka utvrđena prisutnost plijesni u koncentraciji od 10 do 100 cfu/g. Istovremeno onečišćenje kvascima i plijesnima utvrđeno je u 5 (12,5%) uzoraka (Tabela 2).

U ovom istraživanju je u 11 uzoraka koji su nesukladni zbog prisutnosti plijesni provedena njihova daljnja identifikacija do razine roda, pri čemu je dobiveno 12 izolata plijesni (Tablica 3). Utvrđeno je da izolati pripadaju rodovima *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Acremonium*, *Paecilomyces* i *Pestalotiopsis* (Slika 1).



Slika 1. Prikaz mikrobioloških preparata identificiranih rodova plijesni A) *Acremonium sp.* B) *Penicillium sp.* C) *Cladosporium sp.* D) *Paecilomyces sp.*

Rasprava

Zbog svojih fizikalnih svojstava i složenog kemijskog sastava, med je nepovoljna sredina za rast mikroorganizama. Visoka koncentracija šećera, niska pH vrijednost, niski aktivitet vode, prisutnost vodikovog peroksida i drugih specifičnih tvari u medu imaju inhibitorni učinak na rast i razmnožavanje mikroorganizama (Velasquez Giraldo i sur., 2013., Gradvol i sur., 2015.). Mikroorganizmi koji mogu preživjeti u tim uvjetima u medu su primarno kvasci i plijesni te sporoformne bakterije (Gradvol i sur., 2015.).

Aerobne mezofilne bakterije česti su uzročnici kvarenja hrane te se koriste kao indikator starosti i smanjene mikrobiološke kakvoće. Dio su normalne flore probavnog sustava pčela, a do onečišćenja meda može doći i tijekom proizvodnje i skladištenja proizvoda (Kačaniova i sur., 2009.). Bakterije se u uvjetima kakvi vladaju u medu ne mogu razmnožavati pa visoke koncentracije vegetativnih bakterijskih stanica mogu upućivati na onečišćenje iz sekundarnih izvora (Snowdon i Cliver, 1996.). Prisutnost sulfitreducirajućih klostridija u medu indikator je onečišćenja. Spore *Clostridium botulinum* su zbog svoje otpornosti česte tijekom svih faza proizvodnje, a u niskim koncentracijama se mogu naći i u krajnjem proizvodu. Prisutnost *C. botulinum* u medu može dovesti do nastanka botulizma, bolesti koja je naročito opasna za dojenčad i malu djecu (Kačaniova i sur., 2009.). Prema rezultatima ovog istraživanja, prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija iznad MDK vrijednosti (10^3 cfu/g) ustvrđena je u tri uzorka, dok bakterije iz porodice *Enterobacteriaceae* i sulfitreducirajuće klostridije nisu nađene ni u jednom uzorku meda. Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem koje je proveo Gradvol i sur. (2015.), a u kojem *Enterobacteriaceae* i *Clostridium* spp. nisu nađene u uzorcima meda. Prema njihovom istraživanju, aerobne mezofilne bakterije su nađene u svim vrstama meda, a najveća koncentracija zabilježena je u medu amorfe (93 cfu/g).

Prisutnost osmotolerantnih kvasaca u medu može izazvati fermentacijske procese. Mogu rasti i razmnožavati se u uvjetima niskog pH i visoke koncentracije saharoze, a posebice pri visokom aktivitetu vode u uzorku. U povoljnim uvjetima u medu se mogu razviti do visoke koncentracije i započeti fermentaciju glukoze i fruktoze u alkohol i ugljikov dioksid. U prisutnosti kisika, alkohol se prevodi u octenu kiselinu čime se povećava kiselost fermentiranom

medu te takvi proizvodi nisu prikladni za ljudsku konzumaciju (Ananias i sur., 2012.). Mogući izvori kvasaca u medu su nektar, tijelo pčele, košnica, tlo i oprema koja se koristi u proizvodnji (Kačaniova i sur., 2009.).

Prisutnost visokih koncentracija plijesni u medu upućuje na mikrobnog onečišćenje do kojeg dolazi zbog nedostatka higijene u košnici, prostorijama za vrcaenje, punjenje i skladištenje meda. Njihova prisutnost dovodi do promjena u nutritivnoj vrijednosti proizvoda te nepoželjnih promjena okusa i drugih senzornih karakteristika. Uz to, plijesni su dio normalne mikroflore pčele, a mogu se naći i unutar košnice te u tlu, peludi i biljkama tijekom ispaše (Snowdon i Cliver, 1996.). Ranija istraživanja mikrobiološke sigurnosti meda i drugih pčelinjih proizvoda pokazala su veliku raznolikost u prisutnosti različitih vrsta mikroorganizama, posebice kvasaca i plijesni (Gilliam, 1997., Kačaniova i sur., 2012., Grabowski i Klein, 2017.), što je potvrđeno i rezultatima ovog istraživanja.

Visoko selektivni stresni uvjeti u medu, specifični uvjeti okoliša i razlike u sastavu pojedinih vrsta meda mogu utjecati na mikološki profil u proizvodima. Plijesni iz rodova *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* i *Mucor*, koje su izdvojene u ovom istraživanju, smatraju se čestim onečišćivačima pčelinjih proizvoda (Gonzalez i sur., 2005., Kačaniova i sur., 2012., Kostić i sur., 2016.), a izdvojene su s različitih insekata (uključujući i pčele), biljaka, tla i unutrašnjosti košnice (Gilliam, 1997., Grabowski i Klein, 2015.). U istraživanju Felšociove i sur. (2012.) je u 66% pretražvanih uzoraka meda identificirana prisutnost plijesni iz roda *Penicillium*, pri čemu je najčešća vrsta bila *Penicillium chrysogenum*. Većina plijesni izdvojenih u ovom istraživanju pripadaju fungalnoj grupi saprofitskih organizama koji potječu iz okoliša, a razgrađuju organsku tvar biljaka i tla. Plijesni iz roda *Acremonium* su saprofiti izolirani na biljkama, u tlu i zraku za-

tvorenih prostora dok se kao česte biljne patogene poljoprivrednih kultura i šumskog drveća navode plijesni iz roda *Alternaria*. *Alternaria tenuissima* i *Cladosporium cladosporioides* povezuju se s probavnim sustavom pčela, a neke plijesni iz roda *Paecylomyces* pripadaju entomopatogenim gljivama izdvojenih s pčela. Karakterizacijom mikrobnog prijenosa na putu od okoliša košnice, probavne mikroflore pčela, do krajnjeg proizvoda, meda, Kačaniova i sur. (2009.) su zaključili da primarni izvori mikrobnih zajednica u medu potječu iz probavnog sustava pčele i iz košnice. Izdvojene plijesni iz nesukladnih uzoraka u ovom istraživanju potječu iz primarnih izvora onečišćenja.

Mikotoksini kao proizvodi sekundarnog metabolizma toksikogenih plijesni su česti onečišćivači pčelinjih proizvoda, posebice peludi. Tako je u svim pretraženim uzorcima cvjetnog praha iz Srbije potvrđena prisutnost aflatoksina B1, najtoksičnijeg predstavnika aflatoksina (Petrović i sur., 2014., Kostić i sur., 2016.). Dobiveni rezultati upućuju na to da je primjena dobre proizvođačke prakse u svrhu proizvodnje zdravstveno ispravne hrane nužna i mora se provoditi tijekom sakupljanja, sušenja i pakiranja cvjetnog praha. U prostorijama koje se koriste za proizvodnju pčelinjih proizvoda potrebno je osigurati odgovarajuće higijenske uvjete, uključujući i prevenciju reapsorpcije vlage na zidovima i nastanka plijesni. Prema podacima iz literature, plijesni koje su prisutne u medu u takvom specifičnom okruženju nemaju povoljne uvjete za proizvodnju mikotoksina (Salgado Silva i sur., 2017.). Čak i ukoliko dođe do onečišćenja meda s *Aspergillus flavus*, vrlo toksikogenom plijesni, uvjeti za proizvodnju aflatoksina nisu povoljni (Kačaniova i sur., 2012.). Unatoč tome, pojedine vrste plijesni izolirane iz meda u povoljnim uvjetima mogu biti potencijalni proizvođači mikotoksina. Izolati *Penicillium* sp. iz meda mogu proizvoditi različite vrste mikotoksina, poput citrini-

na, ciklopiazonične kiseline, griseofulvina, patulina, penitrem A i rokefortina C (Kačaniova i sur., 2012.).

Zaključak

Iako je med namirnica s niskim rizikom od mikrobiološkog onečišćenja jer posjeduje antimikrobna svojstva, pojedini mikroorganizmi imaju sposobnost preživljavanja u medu čime utječu na stabilnost i kvalitetu proizvoda. S obzirom na dobivene rezultate možemo zaključiti da ispitivani uzorci u velikoj mjeri zadovoljavaju mikrobiološke kriterije. Ipak, prilikom vrcanja, rukovanja i skladištenja meda nužna je primjena dobre higijenske prakse uz primjenu preventivnih postupaka samokontrole procesa proizvodnje. Utvrđivanjem prisutnosti kvasaca i identificiranih plijesni u određenim uzorcima meda vidljivo je da onečišćenje proizlazi iz primarnih izvora primjerice: probavnog sustava pčele, prašine, tla, peluda, nektara zraka. Zbog malog broja podataka u literaturi o identifikaciji plijesni u medu i pčelinjim proizvodima te mogućnosti pojave mikotoksina u proizvodima poput cvjetnog praha, ukazuje se potreba za daljnjim istraživanjama prisutnosti toksikogenih vrsta plijesni i provođenjem sustavne mikrobiološke kontrole meda i ostalih pčelinjih proizvoda.

Literatura

1. ALMASAUDI, S. B., A. A. M. AL-NAHARI, E. S. M. ABD EL-GHANY, E. BARBOUR, S. M. AL MUHAYAWI, S. AL-JAOUNI, E. AZHAR, M. QARI, Y. A. QARI and S. HARAKEH (2017): Antimicrobial effect of different types of honey on *Staphylococcus aureus*. Saudi J. Biolog. Sci. 24, 1255-1261.
2. ANANIAS, K. R., A. A. MACHADO DE MELO and C. JOSE DE MOURA (2013): Analysis of moisture content, acidity and contamination by yeast and molds in *Apis mellifera* L. honey from central Brazil. Braz. J. Microbiol. 44, 679-683.
3. FELŠOCIOVA, S., M. KAČANIOVA, L. HLEBA, J. PETROVA, A. PAVLEKOVA, M. DZUGAN and D. GRABEK-LEJKO (2012): Microscopic fungi isolated from Polish honey. J. Microb. Biotech. Food Sci. 2, 1040-1049.

4. GILLIAM, M. (1997): Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiol. Lett.* 155, 1-10.
5. GONZALEZ, G., M. J. HINOJO, R. MATEO, A. MEDINA and M. JIMENEZ (2005): Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 1-9.
6. GRABOWSKI, N. T. and G. KLEIN (2017): Microbiology and foodborne pathogens in honey. *Cri. Rev. Food Sci. Nut.* 57, 1852-1862.
7. GRADVOL, V., N. ATLABAN, L. LENART and H. PAVLOVIĆ (2015): Microbiological quality and inhibitory potential of selected Croatian apiary honeys. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 7, 40-46.
8. HRN ISO 15213:2004. Mikrobiologija hrane i stočne hrane – Horizontalna metoda za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima.
9. HRN EN ISO 21528-2:2017. Mikrobiologija u lancu hrane – Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja Enterobacteriaceae – 2. dio: Postupak određivanja broja kolonija.
10. HRN EN ISO 4833-1:2013. Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama – 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30°C tehnikom zaljevanja podloge.
11. ISO/FDIS 21527 2:2008. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni – 2. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom manjim ili jednakim 0,95.
12. KAČANIOVA, M., S. PAVLIČOVA, P. HAŠČIK, G. KOCIUBINSKI, V. KNAZOVICKA, M. SUDZINA, J. SUDZINOVA and M. FIKSELOVA (2009): Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 56, 285-295.
13. KAČANIOVA, M., V. KNAZOVICKA, S. FELŠOCIOVA and K. ROVNA (2012): Microscopic fungi recovered from honey and their toxinogenety. *J. Envir. Sci. Health, Part A*, 47, 1659-1664.
14. KOSTIĆ, A. Ž., T. S. PETROVIĆ, V. S. KRNJAJA, N. M. NEDIĆ, Ž. L. TEŠIĆ, D. M. MILOJKOVIĆ-OPSENICA, M. B. BARAC, S. P. STANOJEVIĆ and M. B. PEŠIĆ (2016): Mold/aflatoxin contamination of honey bee collected from different Serbian regions. *J. Apicult. Res.* 56, 13-18.
15. PETROVIĆ, T., N. NEDIĆ, D. PAUNOVIĆ, J. RAJIĆ, K. MATOVIĆ, Z. RADULOVIĆ and V. KRNJAJA (2014): Natural microbiota and aflatoxin B1 presence in bee pollen collected in Serbia. *Biotech. Anim. Husb.* 30, 731-741.
16. PITT, J. and A. D. HOCKING (2009): Fungi and food spoilage. New York, NY: Springer, pp. 58-263.
17. SALGADO SILVA, M., Y. RABADZHEV, M. RENON ELLER, I. ILIEV, I. IVANOVA and W. C. SANTANA (2017): Microorganisms in honey. In: *Arnaud de Toledo, V.: Honey analysis.* NY: InTech., New York, pp. 233-245.
18. SNOWDON, J. A. and D. O. CLIVER (1996): Microorganisms in honey. *Int. J. Food Microbiol.* 31, 1-26.
19. VELASQUEZ GIRALDO, A. M., L. M. VELAZ ACOSTA and R. ZULUAGA GALLEGO (2013): Physicochemical and microbiological characterization of *Apis mellifera* sp. honey from southwest of antioquiain Columbia. *Ing. Cienc.* 9, 61-74.
20. Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (3. izmijenjeno izdanje) (2011).
21. WHITE, J. W. (1975): Composition of honey. In: *Crane, E.: Honey, A Comprehensive Survey.* UK, Heinemann, London, UK (157-206).

Microbiological analysis of honey with mould identification

Maja KIŠ, Mag. Ing. Bioproc., Mag. Ing. Agr., Expert Associate, Sanja FURMEG, BSc, Expert Associate, Vesna JAKI TKALEC, DVM, PhD, Scientific Associate, Jadranka SOKOLOVIĆ, DVM, Expert Associate, Croatian Veterinary Institute, Veterinary Department Križevci, Croatia; Manuela ZADRAVEC, DVM, PhD, Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute Zagreb, Croatia; Darko MAJNARIĆ, DVM, PhD, Scientific Associate, Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Academician, Croatian Veterinary Institute, Veterinary Department Križevci, Croatia

The aim of this study was to examine the microbiological quality of honey sampled in the northwest region of Croatia. During 2018, a total number of 40 honey samples were taken and analysed for the number and/or presence of aerobic mesophilic bacteria, bacteria from the *Enterobacteriaceae* family, sulphite-reducing clostridia, yeasts and moulds, according to Croatian National Guidelines on microbiological criteria for foodstuffs. Out of the total number of analysed honey samples, the presence of yeasts was noted in 25% of the samples, whereas moulds were determined in 27.5% of the samples, ranging from 10 to 100 cfu/g. Isolated moulds that were unsuitable

according to the recommended quantitative criterion (10 cfu/g) were singled out and subjected to further identification, whereby seven genera of moulds were recovered: *Cladosporium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Acremonium*, *Paecylomyces* and *Pestalotiopsis*. Although the majority of moulds isolated in this study are common contaminants of bee products, their presence indicates the need for production according to the guidelines for good beekeeping practices with systematic microbiological controls of honey and other bee products.

Key words: honey; microbiology analysis; moulds; identification