

Микробиологическая безопасность меда

Куш Ирина Вячеславовна

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11

E-mail: i.kusch@mail.ru

Ваннер Наталья Эдуардовна

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

Адрес: 123022, город Москва, Звенигородское ш., дом 5

E-mail: vanner.natalia@gmail.com

Удавлив Дамир Исмаилович

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

Адрес: 125080, Москва, Волоколамское шоссе, дом 11

E-mail: udavlievdi@mgupp.ru

Мурадова Мая Дурдымурадовна

Туркменский сельскохозяйственный университет имени С. А. Ниязова

Адрес: 744000, город Ашхабад, ул. Гёроглы, дом 62, Туркменистан

E-mail: mouradovamd@gmail.com

Проведено микробиологическое исследование пчелиного меда реализуемого на рынках Москвы в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (бактерии рода *Salmonella*, *Shigella*, общая микробная обсемененность (КМАФАнМ), бактерии группы кишечной палочки (БГКП), плесневых грибов, осмофильных дрожжей, *S. aureus*). Дополнительно были проведены органолептические (внешний вид, аромат, вкус) и физико-химические (определение массовой доли сахарозы, фруктозы и глюкозы, гидроксиметилфурфурала, кислотности, электропроводность и т.д.) исследования для исключения фальсификации продукта. Микробиологические, органолептические и физико-химические исследования проводились в испытательной лаборатории соответствующей требованиям ГОСТ ISO/EC 17025-2019. Исследованию были представлены 221 образец меда, отобранные с 13 рынков Москвы на наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. По результатам исследований в 37 образцах (16,7 %) были обнаружены *Escherichia coli*, в 18 образцах (8 %) – бактерии группы кишечной палочки (БГКП), 53 образцах (23,9 %) – *S. aureus*, КМАФАнМ – 25 (11,3 %), осмофильные дрожжи – 3 (1,3 %), несоответствие по физико-химическим показателям обнаружено в 45 (20,3 %) образцах. Рассмотрены российские и международные требования к микробиологической безопасности меда в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Проведен анализ и сравнительная характеристика показателей и их значений.

Ключевые слова: мед, микробиологическая безопасность, международные требования, патогенные, условно-патогенные микроорганизмы

Введение

Мёд - продукт пчеловодства растительного происхождения, содержащий значительное количество полезных веществ для организма человека (углеводы, витамины, аминокислоты, минеральные вещества и прочее). При этом мёд обладает отличными вкусовыми, питательными и диетическими

свойствами, что делает данный продукт востребованным на внутреннем и внешнем продовольственном рынке многих стран мира. Пчелиный мед является одним из важных продуктов питания, а также играет большую роль в выполнении программы Доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации, положения которой определяются тем, что пчёлы играют активную роль как опылители сельскохозяйственных куль-

тур. Кроме того, пчеловодство дает ценные продукты питания и сырье. Продукты пчеловодства: мёд, перга (пыльца), маточное молочко, прополис, пчелиный яд, используются как диетические и лечебные средства, а воск находит применение более чем в 40 отраслях промышленности. Поэтому здоровью пчёл и ветеринарно-санитарной экспертизе мёда пчелиного и других продуктов пчеловодства придается в нашей стране особое внимание (Бутко, 2019). В Российской Федерации (РФ) к натуральному меду ветеринарно-санитарные требования установлены в Техническом Регламенте Таможенного союза (ТР ТС) 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», решение Комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 г. N 299 «О применении санитарных мер в Евразийском экономическом союзе», решении Комиссии Таможенного Союза от 18.06.2010 N 317 «О применении ветеринарно-санитарных мер в Евразийском экономическом союзе» и ГОСТ 19792-2017 (замена ГОСТ Р 54644-2011). В перечисленных законодательных документах натуральный мёд исследуют на органолептические (внешний вид, аромат, вкус), физико-химические показатели (определение массовой доли сахарозы, фруктозы и глюкозы, гидроксиметилфурфурала, кислотности, электропроводность и т.д.), присутствие лекарственных препаратов, пестицидов, тяжелых металлов, радионуклеидов, а информация по определению микробиологической загрязненности мёда и других продуктах пчеловодства отсутствует.

Возможно, причина в том, что существует мнение, что мёд — безопасный продукт и в нем не могут присутствовать патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, дрожжи и плесени, из-за концентрированного раствора сахаров с высоким осмотическим давлением. Натуральный мёд не подвергается термической обработке и употребляется в пищу в сыром виде, что увеличивает возможность присутствия в нем микробиологических патогенных агентов и их продуктов распада, как и в любом другом сырье растительного или животного происхождения. Так, первичными источниками контаминации мёда могут являются пыльца, пищеварительный тракт медоносных пчел, почва, вода, воздух и нектар; вторичные - связаны с переработкой, обработкой, тарой и хранением мёда и продуктов пчеловодства.

Данная работа посвящена изучению патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в мёде для дальнейшего изучения их. Полученные данные позволят нам в будущем минимизировать обсеменение продукта, если таковое имеется, а также узнать о санитарно-гигиенических нарушениях при работе с мёдом.

В исследованиях проведенными зарубежными учёными было установлено, что в пчелином мёде способны выживать патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, которые не обладают репродуктивной способностью. Несмотря на временное приостановление репродуктивной функции - микроорганизмы могут быть опасны для потребителей, в особенности людей с ослабленным иммунитетом, детей и пожилых людей (Fernández, 2016).

Осмофильные дрожжи и плесневые грибы сохраняют свою способность размножению (вегетативное размножение). Рост плесневых грибов сопровождается выработкой микотоксинов являющимися вторичными метаболитами нитевидных грибов и токсичны для человека и животных. Основными продуцентами микотоксинов являются грибы рода *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* и *Penicillium*. Наиболее часто встречаются *Aspergillus spp.* и *Penicillium spp.*, исследования на эту тему проводили в Великобритании, Италии, Бразилии и Пакистане (Silva, 2017). Несмотря на то, что мёд является неблагоприятной средой для развития микотоксинов, плесневые грибы все же могут вызывать аллергические реакции, ослабление иммунитета и астму. Наиболее опасным патогенным являются *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* и *Aspergillus niger* (Liu, 2019). В мёде из дрожжей выявляли *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Aureobasidium pullulans*, *Schizosaccharomyces plumbe*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Cryptococcus uzbekistanensis* (Hocine, 2018). Однако патогенным для человека является вид *Cryptococcus* и способны вызывать поражение центральной нервной системы (Gomes, 2010).

В Мексике, как и в России мёд является одним из популярных продуктов, однако для Мексики мёд еще является ключевым экономическим элементом обеспечивающим ей пятое место в мире, как стране-производителю и третье, как стране-экспортеру. В Мексике разработан один стандарт NMX-036-NORMEX-2006, обеспечивающий микробиологическую безопасность мёда. Согласно данному стандарту в мёде не должны присутствовать более чем в 1000 КОЕ/г условно-патогенных микроорганизмов, в том числе осмофильных дрожжей и плесневых грибов в 100 КОЕ/г (Vázquez-Quinones, 2017).

Мексика не единственная страна разработавшая документ, который обеспечивает микробиологическую безопасность мёда. Аналогичные документы обеспечивающие микробиологическую безопасность мёда разработали в Китайской Народной Республике, в арабских странах Персидского залива и в Гонконге.

В Китайской Народной Республике действует стандарт (GB 14963—2011) «Государственный стандарт безопасности продуктов питания. Мед», представлены данные с предельным содержанием микроорганизмов. Согласно данному документу в 25 граммах меда не должны быть выявлены бактерии рода *Salmonella*, *Shigella* и *St. aureus*, количество плесневых грибов и осмофильных дрожжей не более 200 колониеобразующих единиц в грамме (КОЕ/г), бактерий группы кишечной палочки (БГКП) - 10^5 , а общее количество колоний (КМАФАнМ) не превышать 1000 КОЕ/г.

В арабских государствах Персидского залива существует единый стандарт GSO 160/2015 на «Микробиологические критерии для пищевых продуктов», в котором утверждены нормативные показатели для натурального мёда и других продуктов пчеловодства. Исследования проводят на обнаружение *Clostridium botulinum*, наличие которых не допускается; определение содержания в продукте сульфит-редуцирующих анаэробных бактерий, плесневых грибов и дрожжей – не превышать 1000 КОЕ/г.

В Гонконге существуют микробиологические рекомендации для пищевых продуктов (от 2014 г), в котором мёд исследуется на наличие бактерий рода *Salmonella*, *Shigella* и *St. aureus* и не должен быть выявлен в 25 граммах продукта.

Mercado Común del Sur (MERCOSUR) - экономическое и политическое соглашение созданное в 1985 году между Аргентиной и Бразилией, впоследствии присоединившимися к ним Уругваем и Парагваем устанавливает требования к качеству пчелиного меда, в том числе и микробиологическое. Согласно требованиям соглашения (SENASA33 резолюция 870/2006) в меде не должны присутствовать бактерии рода *Salmonella*, *Shigella*, бактерии группы кишечной палочки, дрожжи и плесневые грибы не более 100 КОЕ/г. (Fernández, 2016).

Помимо того что Бразилия входит в соглашение между Аргентиной, Парагваем и Уругваем внутри страны утверждена внутренняя инструкция №62 от 23 августа 2003 года согласно которой натуральный мед исследуют на наличие *St. aureus*, бактерии рода *Salmonella*, плесневые грибы и дрожжи (Azonwade, 2018).

В Мексике было проведено 1920 исследований меда на наличие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, в том числе дрожжей и плесеней. Из общего количества образцов было выде-

лено: факультативно аэробных микроорганизмов 17 % (327), плесневых грибов дрожжей 18,1 % (348), 2 % содержали молочно-кислые бактерии, *S. aureus* менее чем 100 КОЕ/г, бактерии рода *Salmonella* не обнаружены. Из аэробов и факультативных анаэробов выделяли такие микроорганизмы, как: *Brochothrix spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Erwinia spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp* (Vázquez-Quíñones, 2018).

В Турции в 2013 году провели крупное исследование на микробиологическую безопасность, в результате которого исследованию подверглись 500 образцов меда из Стамбула. Помимо микробиологического обсеменения образцов было также обнаружено и паразитологическое загрязнение: в 80 образцах (16 %) были обнаружены *Escherichia coli*, в 18 образцах (3,6 %) - бактерии группы кишечной палочки (БГКП), 67 образцах (13,4 %) - Золотистый стафилококк (*S. aureus*), 51 образец (10,2 %) дал положительный результат на *Ascosphaera apis*, 22 образца (4,4 %) - *Aspergillus flavus*, 32 образца (6,4 %) - *Aspergillus fumigatus*, 16 образцов (3,2 %) - *Paenibacillus larvae*, 29 образцов (5,8 %) *Melissococcus pluton* и 39 образцов (7,8 %) - *Nosema spp.* (Emek DÜMEN1, 2013).

Исследования проведенные в Мексике и Турции подтверждают присутствие патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, однако результаты исследований могут быть не верны, если предмет исследования оказался не натуральным продуктом. В России мёд входит в десятку фальсифицированных продуктов. В связи с чем отобранные образцы в первую очередь исследовались на органолептические (вкус, цвет, аромат, консистенция и кристаллизация) и физико-химические (определение массовой доли сахарозы, фруктозы и глюкозы, гидроксиметилфурфурала, кислотности, электропроводность и так далее) показатели для избежания фальсификации продукта и искажении результатов исследования¹.

Следует отметить, что мед имеет большие преимущества по сравнению с другими продуктами питания, так как он считается ценнейшим лечебно-профилактическим средством. (Жунева, 2019). Например, Нидерландах изучалась общее антимикробное свойство меда в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в организме человека, с поиском новых способов их применения (Kwakman, 2012). Аналогичное исследование проводили в США и Австралии, где сравнивали разные сорта меда и их антибактериальное дей-

¹ <https://basetop.ru/> Топ рейтинги мира «Самые подделываемые продукты питания в России» (2019)

ствие на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы (Camreau, 2014; Anand, 2019).

В Словакии продолжили опыты по определению действующего антимикробного вещества в меде (Busekova, 2018). Группа ученых из Португалии изучала антимикробное воздействие на кишечную палочку при лечении кожных ран, и добились успеха в данном вопросе (Oliveira, 2017). Наши коллеги из Эфиопии проводили опыты с 2017 года, в которых доказывали бактерицидное воздействие меда на *Staphylococcus aureus* (Mama, 2019). В Саудовской Аравии оценивали бактерицидные свойства импортного и отечественного меда в отношении *Staphylococcus aureus* (Almasaudi, 2017).

Из небольшого обзора видно, что интерес к меду возрастает с каждым годом. Связи с чем необходимо определять не только качественный продукт по физико-химическим показателям, но также и по микробиологическим.

Материалы и методы

Лабораторные исследования проводились в испытательной лаборатории, которая соответствует международным требованиям ГОСТ ISO/EC 17025-2019.

Первым этапом работы - это проведение органолептических и физико-химических исследований. Исследования проводились согласно ГОСТ 19792-2017 «Мед натуральный. Технические условия».

В России нет нормативного документа регулирующего микробиологическую безопасность меда, связи с чем в нашей работе проводился подбор питательных сред и методов для анализа. Пчелиный мед исследовался на такие показатели как КМАФАнМ, БГКП, *E.coli*, *S.aureus*, бактерии рода *Salmonella*, *Shigella*, осмофильные дрожжи и плесени.

Первые три месяца исследования были посвящены поискам оптимальных методов, сред и температур. Сложности в исследовании наступили на этапе титрования и определения степени исследования, например при исследовании на микробиологическую чистоту, БГКП или *S.aureus* имеет большое значение.

Вставал вопрос каким раствором титровать. Для решения этой проблемы мы использовали четыре раствора: физиологический, лимоннокислый, бро-

мистый и пептонную воду. Каждый из растворов титровался и из каждого разведения параллельно в две чашки вливалось разведение и так до 6 степени, после чего заливались питательной средой.

Определение КМАФАнМ

Для определения общей микробной обсемененности мы титровали продукт затем его заливали питательной средой. Однако в нашем распоряжении было два вида среды - это МПА (мясо-пептонный агар) и КМАФАнМ-среда. Связи с чем опыты проводимые с поиском оптимального раствора для титрования мы удваивали, чтоб в параллели наблюдать рост микроорганизмов на двух средах. После того как мы залили чашки Петри с разведениями питательной средой мы медленно и равномерно перемешиваем их круговыми движениями. После застывания среды чашки вверх дном помещали в термостат. Инкубирование микроорганизмов происходило 72 часа при температуре $(30 \pm 1^\circ \text{C})$.

Определение БГКП и *Escherichia coli*

В нашем распоряжении имелось только обогатительная среда Кесслера для изучения БГКП, но в данном случае все было не так однозначно. Необходимо было правильно подобрать концентрацию и объем среды. Например, если мы исследуем молочные продукты, то используем среду Кесслера обычной концентрации, но при этом 5 мл, если же мы говорим о колбасных изделиях, то используем Кесслер нормальной концентрации объемом 10 мл, если же это мясной продукт или овощи, то мы используем Кесслера нормальной концентрации в объеме 10 мл. Помимо определения необходимой концентрации и объема существовала еще одна важная проблема - в каком разведении должен быть образец. Для определения необходимой концентрации нужно было убедиться в присутствии БГКП, поэтому первые образцы сеялись с флакона с раствором из физиологического, лимоннокислого, бромистого и пептонной воды в пробирку с обычной концентрацией 10 мл и 5 мл, двойной концентрацией (10 мл). Инкубирование образцов составляло 48 часов при температуре $(37 \pm 1^\circ \text{C})$. После чего делались пересевы на дифференциально-диагностическую среду ЭНДО - инкубирование микроорганизмов составляло 24-48 часов при температуре $(37 \pm 1^\circ \text{C})$. Далее при необходимости следовали биохимические тесты для подтверждения микроорганизмов к бактериям группы кишечной палочки, в том числе и *E.coli*.

Определение *S.aureus*

Исследование на наличие *S.aureus* вызвало аналогичные сложности. Изначально подбирали подходящий раствор для титрования и питательные среды. Предположительное присутствие коагулазоположительных стафилококков определяли на Жиолитти-Кантони бульоне и солевом бульоне - мы добавляли по 1 мл титрованного раствора с образцом в пробирку, после чего инкубировали при температуре ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) в течение 48 часов. Затем пересев петлей на поверхность одной из дифференциальных сред: среды Байрд - Паркер, молочно-солевого агар. Инкубирование при температуре ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) в течение 24-48 ч. Посевы проводили также из пробирок, в которых нет видимых признаков роста. После чего пересев на скошенный МПБ, инкубирование при температуре ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) 24 ч и проведение биохимических тестов для подтверждения выросших микроорганизмов к *S.aureus*. Далее шел пересев на дифференциально-диагностические среды такие как Брайд Паркер агар и молочно-солевым агар.

Определение бактерий рода *Salmonella*

Исследование на присутствие бактерий рода *Salmonella* проводить было проще, мы использовали ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002) Методы выявления бактерий рода *Salmonella spp.* стандарт, данный стандарт не рассчитан для исследования меда, но все же мы решили рискнуть. Исследование происходило согласно выше перечисленному ГОСТу, 25 грамм образца мы добавили в забуферную пептонную воду (ЗПВ) (225 мл) инкубировали 18-20 часов при температуре 37°C . После инкубирования по 1 мл мы добавляли на Бульон РАППАПОРТА-БАССИ-ЛИАДИСА (далее RVS-бульон) и бульона Мюллера-Кауфмана (МК-бульон). RVS-бульон инкубировали при 41.5°C , а МК при 37°C в течение 24 ч, затем шел пересев на чашки Петри со средами: Rambach - агар, агар с бриллиантовым зеленым, XLD-агар, и Эндо.

Определение бактерий рода *Shigella*

При выявлении бактерий рода *Shigella* мы опирались на ГОСТ 32010-2013 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Shigella*. Так как бактерии рода *Shigella* близки к бактериям рода *Salmonella* и *Escherichia coli* (*E.coli*), то исследование было схожим с выявлением бактерий рода *Salmonella*, единственным различием было, то что для вторичного обогащения культуры мы не использовали RVS-бульон и МК-бульон, а просто изменили температуру обогащения культуры с комнатной

(22°C) на 37°C и продолжили инкубирование еще 24 ч. Для идентификации использовались аналогичные среды, что и для бактерий рода *Salmonella* (Rambach - агар, агар с бриллиантовым зеленым, XLD-агар, и Эндо).

Определение осмофильных дрожжей и плесневых грибов

Исследование на осмофильные дрожжи и плесени было чем-то схоже с исследованием на КМАФАнМ, титровали пробы до 10^2 и заливались агаром с дихлораном, бенгальским розовым и хлорамфениколом (DRBC). Образцы помещали в специальный пакет для предотвращения контаминации и обсеменения термостата и ламинарного бокса спорами грибов, затем убирали в термостат на 5 суток. После чего считывали результат.

Оборудование

В данной работе использовалось проверенное и аттестованное оборудование, которое проходит все необходимые проверки в соответствии с графиком технического обслуживания.

Первичные и вторичные посевы, а также окраска по Грамму осуществлялись в боксе микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5 (год выпуска 2017 г., страна производитель Россия). Взвешивали образцы на весах BP2100S Sartorius (2008 года, производитель Германия) с максимальной массой 2000г. Для исследования мазков использовался микроскоп медицинский Микмед-6 (2008 г, производство Россия).

Для инкубирования микроорганизмов использовались разные термостаты, т.к. температурные режимы у них разные. Для исследования на БГКП, *S.aures*, бактерии рода *Salmonella*, *Shigella* использовали термостат электрический сухо-воздушный TC-200 СПУ (2016г, производство Россия) с температурой в 37°C . Для исследования на КМАФАнМ использовали Сушильный шкаф Binder с естественной конвекцией ED 115 (производство Германия, 2008г.) температурный режим $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Для исследования на осмофильные дрожжи и плесневые грибы мы использовали отдельный термостат для предотвращения заражения оборудования Термостат с охлаждением Binder KB 53 (производство Германия, год ввода в эксплуатацию 2008). Для исследования на осмофильные дрожжи и плесени использовали Ламинарный бокс II класса защиты AC2-4E1 (2008г, производство Сингапур).

Питательные среды хранились в холодильнике

фармацевтическом Sanyo MPR-331 D (2008 г, производство Япония) при температуре от 4 до 8 °С. Питательные среды топились на водяной бане (без перемешивания) SUB Agua PRO, тип SAP 18 (2017г, производство Англия). Чашки Петри с селективной средой разогревались в термостате Binder с естественной конвекцией BD-53 (2008 г, производство Германия) при 37 °С в течение 20 минут.

После окончания исследовательской работы все оборудование обрабатывалось 70 % этиловым спиртом, все помещение обеззараживалось рециркулятором УФ-бактерицидным двухламповым с принудительной циркуляцией воздушного потока РБ-07-Я-ФП (2008г, производство Россия) в течение 60 минут.

Результаты исследований

Основной целью нашего исследования было определить микробиологическую чистоту меда на примере меда, реализуемых на московских рынках. Исследованию подверглись 221 образец, упакованный в различные упаковки.

Первым этапом работ было определение натурального меда, соответствующего требованиям ГОСТ 19792-2017 (Мед натуральный. Технические условия). Проведенные нами физико-химические и органолептические исследования позволили нам исключить фальсифицированный продукт. И, как следствие, искажение результатов. Итого, из 221 образца меда не соответствовали физико-химическим показателям 45 проб, что составляет 20,3 % от общего числа. Согласно результатам исследования 176 образцов меда соответствуют ГОСТ 19792-2017 по физико-химическим и органолептическим показателям и считаются натуральным медом.

Вторым этапом работ являлось определение микроорганизмов в натуральном меде. Общая микробная загрязненность меда присутствовала в 75 пробах, однако 45 проб являются не натуральным медом. Так как микробная чистота это особый показатель указывающий на загрязнение продукта, на несоответствующие условия хранения, на транспортировку и отбор проб.

Бактерии группы кишечной палочки присутствуют в 18 образцах, что от общего количества меда составило 8 %. Так как мед разделен на натуральный и фальсифицированный, то результаты немного изменились, в натуральном меде количество положительных образцов 13, что составляет от общего количества пчелиного меда 7,4 %.

Escherichia coli присутствовала в 37 отобранных образцах (16,7 %). В пчелином меде положительных проб 29, что процентном соотношении составляет 16,4 %.

В исследованиях на выявление *S.aureus* получен положительный результат у 53 образцов, что составляет 29,3 % от общего количества проб. Однако согласно результатам исследования из 53 общих положительных образцов на натуральной мед пришлось 47 проб со *S.aureus*, что составило 26,7 % от общего количества проб пчелиного меда.

Положительных образцов не выявлено при исследовании на наличие бактерий рода *Salmonella* и *Shigella*.

Обсуждение результатов

В своих опытах мы не стали отбраковывать фальсифицированный мед и подвергли его микробиологическому анализу. Как итог, были выявлены образцы загрязненные условно-патогенными микроорганизмами. Результаты исследований натурального и фальсифицированного меда схожи по микробиологическим параметрам, что может служить подтверждением неправильного хранения, транспортировки, отбора меда (Sereia, 2017).

Проводя свои опыты, мы сталкивались с некоторыми трудностями, начиная от выбора среды для титрования и заканчивая температурными и временными диапазонами. Данное обстоятельство значительно прибавило времени для исследования.

Для титрования нам подошли два раствора - физиологический и пептанная вода, при использовании которых в дальнейшем шел рост микроорганизмов. Титровали мы преимущественно до разведения 10^3 , в некоторых случаях до 10^6 . Редкими случаями нашего разведения образцов являлись выявления положительных проб, но как показала практика, в этом нет необходимости, т.к. рост колоний ограничивался в разведениях 10^3 . Для исследования на общую микробную обсемененность мы использовали 2 среды МПА (мясо-пептонный агар) и КМАФАнМ. Обе среды показали отличный результат. Рост колоний присутствовал на чашках со средой КМАФАнМ и МПА с флакона (10^1) с разведения 10^2 и 10^3 . Однако на среде МПА наблюдался рост плесеней, идентификацию которых мы не проводили, т.к. это не было основной целью исследования. Также сказалась ограниченность ресурсов для данного исследования. Следует отметить, что рост осмофильных дрожжей и плесневых грибов ожи-

дается на элективных средах с содержанием медового агара-70 % ².

При исследовании на БГКП и *E.coli* наиболее удачным была среда Кесслер обычной концентрации 10 мл. Для исследования мы использовали разный объем и концентрацию среды Кесслера (5 мл обычной концентрации, 10 мл двойной концентрации и 10 мл обычной концентрации). Помутнение столбика и газообразование наблюдалась в концентрациях: 0.1, 0.01 и 0.001 г. Пересев на чашку Петри с дифференциально-диагностической питательной средой Эндо. На среде Эндо *E.coli* образуют колонии от бледно-розового до темно-красного цвета часто с металлическим блеском, бактерии группы кишечной палочки на среде Эндо образуют типичные колонии колиформных бактерий от розового до красного цвета, часто с металлическим блеском. Проведены были биохимические тесты подтверждающие рост *E.coli* (окраска по Грамму – граммотрицательные палочки; определение отсутствия оксидазы – оксидазоотрицательные; определение образования индола – образует индол; определение образования ацетона – не образует ацетон – реакция Фогес-Проскауэра отрицательная; определение утилизации цитрата – не утилизирует цитрат; определение образования сероводорода – не образует сероводород; определение интенсивности ферментации углеводов – интенсивно ферментирует углеводы; определение ферментации сорбита, глюкозы и лактозы – ферментирует) и бактерий группы кишечной палочки (окраска по Грамму – граммотрицательные палочки; определение отсутствия оксидазы – оксидазоотрицательные; определение ферментации лактозы – ферментируют лактозу с образованием кислоты (цвет среды меняется) и газа).

Исследование на наличие *S.aureus* подтвердили их наличие. Рекомендованная нами среда для исследования – МПБ с 6 % NaCl. На дифференциально-диагностической среде Байрд-Паркер агар с кроличьей плазмой и бычьим фибриногеном *S.aureus* образуют черные или серые, или ровные белые мелкие колонии, окруженные зоной преципитации, указывающей на коагулазную активность, а на молочном агаре – колонии круглые, слегка возвышающиеся над поверхностью агара, с ровными краями, окрашены в желтый, золотистый, лимонно-желтый, кремовый, палевый или белый цвет. Также было проведено биохимическое подтверждение *S.aureus* (окраска по Грамму – грамположительные, имеют шарообразную форму, клетки диаметром 0,6-1,0 мкм, располагающиеся

чаще (но не всегда) в виде скоплений, напоминающих гроздь винограда; определение каталазы – каталазоположительные; образует ацетон (реакция Фогес – Проскауэра) – образует; ферментация мальтозы – ферментирует мальтозу в аэробных условиях с образованием кислоты (цвет среды Гисса меняется).

Исследования на осмофильные дрожжи и плесени были относительно удачными. Рост колоний наблюдался на чашках с флакона (10¹) с разведения 10² у трех образцов, что составило 1.3 % от общего числа проб.

При исследовании на бактерии рода *Salmonella* положительных образцов не обнаружено было. Причина может крыться в неподходящей методике, средах, либо в их выживаемости в меде. Исследования, проводимые Дальневосточным университетом утверждают, что бактерии рода *Salmonella* выживают в меде в течение 14 дней, подтвердить или опровергнуть этот факт мы не смогли (Салимов, 2008). Следует отметить, что данный вопрос не смогли решить наши зарубежные исследователи. Однако мед исследуют на наличие бактерий рода *Salmonella* и *Shigella* в Китайской Народной Республике, странах Персидского залива, Бразилии и Мексике. Предполагаем, что если ведется мониторинг этих бактерий, то и выживаемость и опасность для потребителя существует. В будущем стоит уделить особое внимание бактериям рода *Salmonella* и *Shigella* и протестировать зарубежные методики и среды.

Аналогичная ситуация была выявлена с бактериями рода *Shigella*. Положительных образцов меда не обнаружено. Возможно, причина кроется в том, что бактерии рода *Salmonella* и *Shigella* являются близкими родами, что может косвенно подтверждать непродолжительность выживаемости этих бактерий в меде. Хотя, бактерии рода *Salmonella* и *Shigella* также близки с *E. coli*, что может также опровергать нашу мысль, описанную ранее.

В будущем мы планируем заражать натуральный мед бактериями рода *Salmonella* и *Shigella* для определения выживаемости их, а также подтверждения или опровержения выдвинутых нами теорий.

Заключение

Проведенное нами исследование подтвердило присутствие патогенных и условно-патогенных

² www.biologyguide.ru «Выделение чистой культуры дрожжевых грибов»

микроорганизмов в меде, указывает на проблемы связанные со сбором, транспортировкой и хранением продукта, а также нарушением санитарно-гигиенических требований.

Обнаруженные микроорганизмы также могут передаваться от медоносных пчел, что указывает на болезни и неблагоприятные условия содержания пчел. (Gisder, 2018).

Стоит согласиться с тем, что в нашем вопросе не достаточно проработана практическая часть в отношении бактерий рода *Salmonella* и *Shigella*, однако теоретическая часть выполнена в полном объеме.

Что касается бактерий группы кишечной палочки, *E.coli*, *S.aureus*, осмофильных дрожжей и плесеней, здесь вопрос проработан в полной мере теоретически и практически, но в дальнейшем требуются дополнительные исследования по выживаемости этих микроорганизмов в меде при длительном хранении и температурных режимах.

Говоря о плесневых грибах и осмофильных дрожжах, то здесь вопрос проработан в полной мере, но в будущем необходимы дополнительные исследования с расширением температурных режимов и добавлением питательных сред. Возможно, необходим будет подбор новой методики для более точного определения микроорганизмов.

В будущем необходимо провести исследования для составления соотношения между эпизоотической обстановкой в регионе и качеством меда. Так как мед может являться индикатором неблагоприятной обстановки в регионе, в том числе и на пасеке.

Литература

- Бутко, М. П., Герасимов, А. С., Посконная, Т. Ф., Смирнов, А. М., Ключко, Р. Т., & Попов, П. А. (2019). *Требования по обеспечению безопасности и ветеринарно-санитарная экспертиза мёда пчелиного*. Издательский дом «Научная библиотека».
- Жунева, Л. С., Семченко, М. В., & Асякина, Л. К. (2019). Анализ технологий получения сухого меда. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2, 8-23. <https://doi.org/10.36107/spfp.2019.69>
- Салимов, Р. М. (2008). Выживаемость микроорганизмов в некоторых пищевых продуктах. *Дальневосточный аграрный вестник*, 4 (8), 25-27.
- Al-Nahari, A. A. M., Almasaudi, S. B., Abd El-Ghany, E. S. M., Barbour, E., Al Jaouni, S. K., & Harakeh, S. (2015). Antimicrobial activities of Saudi honey against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5), 521-525. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.006>
- Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A., & Ansari, M. J. (2012). Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *The Scientific World Journal*, 2012, 930849. <https://doi.org/10.1100/2012/930849>
- Anand, S., Deighton, M., Livanos, G., Morrison, P.D., Pang, E. C. K., & Mantri, N. (2019) Antimicrobial activity of agastache honey and characterization of its bioactive compounds in comparison with important commercial honeys. *Frontiers in Microbiology*, 10(263), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00263>
- Augustin, J.-C., & Carlier, V. (2006). Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts. *Food Microbiology*, 23(1), 1-38. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.010>
- Boncrisiani, H., Li, J. L., Evans, J. D., Pettis, J. & Chen, Y. P. (2011). Scientific note on PCR inhibitors in the compound eyes of honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 42, 457-460. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0009-9>
- Bulgasem, B. Y., Lani, M. N., Hassan, Z., Wan Yusoff, W. M., & Fnaish, S. G. (2016). Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated From Natural Honey Against Pathogenic *Candida* Species. *Mycobiology*, 44(4), 302-309. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.4.302>
- Campeau, M. E. M., & Patel, R. (2014). Antibiofilm activity of manuka honey in combination with antibiotics. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Bacteriology*, 2014, 795281. <https://doi.org/10.1155/2014/795281>
- Chien, H.-Y., Shih, A.-T., Yang, B.-S., & Hsiao, V. K. S. (2019). Fast honey classification using infrared spectrum and machine learning. *Mathematical Biosciences and Engineering*, 16(6), 6874-6891. <https://doi.org/10.3934/mbe.2019344>
- Fernández, L. A., Ghilardi, C., Hoffmann, B., Busso, C., & Gallez, L. M. (2017). Microbiological quality of honey from the pampas region (argentina) throughout the extraction process. *Ryobiology*, 49(1), 69-72. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.010>
- Gisder, S., & Genersch, E. (2015). Special issue: honey bee viruses. *Viruses*, 7(10), 5603-5608. <https://doi.org/10.3390/v7102885>
- Gomes, S., Dias, L. G., Moreira, L. L., Rodrigues, P., &

- Estevinho, L. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 544-548. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.029>
- Hegazi, A. G., Al Guthami, F. M., Al Gethami, A. F. M., Allah, F. M. A., Saleh, A. A., Fouad, E. A. (2017) Potential antibacterial activity of some Saudi Arabia honey. *Veterinary World*, 10(2), 233-237. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.233-237>
- Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R., Nigam, P. S. (2018). Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS Microbiology*, 4(4), 655-664. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.655>
- Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2012). Antibacterial components of honey. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 64(1), 48-55. <https://doi.org/10.1002/iub.578>
- Kwong, W. K., Mancenido, A. L. & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science*, 4(2), 170003. <https://doi.org/10.1098/rsos.170003>
- Liu, Q., Lei, J., & Kadowaki, T. (2019). Gene disruption of honey bee trypanosomatid parasite, *Lotmaria passim*, by CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(126), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00126>
- Mama, M., Teshome, T., Detamo, J. (2019). Antibacterial activity of honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a laboratory-based experimental study. *International Journal of Microbiology*, 2019, 7686130. <https://doi.org/10.1155/2019/7686130>
- Matović, K., Ćirić, J., Kaljević, V., Nedić, N., Jevtić, G., Vasković, N., & Baltić, M. Z. (2019). Physicochemical Parameters and Microbiological Status of Honey Produced in an Urban Environment in Serbia. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 14148-14157. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1659-1>
- Oliveira, A., Ribeiro, H. G., Silva, A. C., Silva, M. D., Sousa, J. C., Rodrigues, C. F., Melo, L. D. R., Henriques, A. F., & Sillankorva, S. (2017). Synergistic Antimicrobial Interaction between Honey and Phage against *Escherichia coli* Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8, 664-302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02407>
- Pajor, M., Worobo, R., Milewski, S., & Szwed, P. (2018). The antimicrobial potential of bacteria isolated from honey samples produced in the apiaries located in Pomeranian voivodeship in northern Poland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(9), 2002. <https://doi.org/10.3390/ijerph15092002>
- Regan, T., Barnett, M. W., Laetsch, D. R., Bush, S. J., Wragg, D., Budge, G. E., Hight, F., Dainat, B., de Miranda, J. R., Watson, M., Blaxter, M., & Freeman, T. C. (2018). Characterisation of the British honey bee metagenome. *Nature Communications*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07426-0>
- Ruiz-Argüeso, T., & Rodríguez-Navarro, A. (1975). Microbiology of Ripening Honey. *Applied Microbiology*, 30(6), 893-896. <https://doi.org/10.1128/AEM.30.6.893-896.1975>
- Sereia, M. J., Alves, E. M., Toledo, V. A. A., Marchini, L. C., Faquinello, P., Sekine, E. S., & Wielewski, P. (2011). Microbial flora in organic honey samples of Africanized honeybees from Paraná river islands. *Food Science and Technology*, 31(2), 462-466. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000200028>
- Sereia, M. J., Perdoncini, M. R. F. G., Marçó, P. H., Parpinelli, R. S., De Lima, E. G., & Anjo, F. A. (2017). Techniques for the evaluation of microbiological quality in honey. In V. de A. A. de Toledo (Ed.), *Honey Analysis* (pp. 233-258). <https://doi.org/10.5772/67086>
- Silva, M. S., Rabadzhiev, Y., Eller, M. R., Iliev, I., Ivanova, I., & Santana, W. C. (2017). Microorganisms in Honey. In V. de A. A. de Toledo (Ed.), *Honey Analysis* (pp. 233-258). <https://doi.org/10.5772/67262>
- Tudor, L., Mitrănescu, E., Galiş, A. M., Ilie, L. I., & Ceauşi, C. (2006). Microbiological and physicochemical analysis of honey from southern Romania. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9(9), 1485-1494.
- Vázquez-Quinones, C. R., Moreno-Terrazas, R., Natividad-Bonifacio, I., Quinones-Ramírez, E. I., & Vázquez-Salinas, C. (2017). Microbiological Assessment of Honey in México. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.005>
- Vejnovic, B., Stevanovic, J., Schwarz, R. S., Schwarz, R., Aleksic, N., Mirilovic, M., Jovanovic, N. M., Stanimirovic, Z. (2018). Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 151, 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.11.003>

Microbiological Safety of Honey

Irina V. Kushch

Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: i.kusch@mail.ru

Natalya E. Vanner

All-Russian Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology
- Branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Scientific Center - K. I. Skryabin, Ya. R. Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Russian Academy of Sciences»
5 Zvenigorodskoe highway, Moscow, 123022, Russian Federation
E-mail: vanner.natalia@gmail.com

Damir I. Udavliev

Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: udavlievdi@mgupp.ru

Maya D. Muradova

Turkmen Agricultural University Named after S.A.Niyazov
62 Gorogly str., Ashgabat, 744000, Turkmenistan
E-mail: mouradovamd@gmail.com

A microbiological study of bee honey sold in the Moscow markets with respect to pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms (bacteria of the genus *Salmonella*, *Shigella*, total microbial contamination (KMAFAnM), bacteria of the *E. coli* group, mold, osmophilic yeast, *S. aureus*) was carried out. Additionally, organoleptic (appearance, aroma, taste) and physicochemical (determination of the mass fraction of sucrose, fructose and glucose, hydroxymethylfurfural, acidity, electrical conductivity, etc.) were conducted to exclude product falsification. Microbiological, organoleptic and physico-chemical studies were carried out in a testing laboratory that meets the requirements of GOST ISO / EC 17025-2019. The study presented 221 honey samples taken from 13 Moscow markets for the presence of pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms. According to the results of studies, *Escherichia coli* was found in 37 samples (16.7 %), *E. coli* bacteria (BHEC) in 18 samples (8 %), *S. aureus*, 25 KMAFAnM (53 samples (23.9 %)) 11.3 %, osmophilic yeast - 3 (1.3 %), a discrepancy in physical and chemical parameters was found in 45 (20.3 %) samples. Considered Russian and international requirements for the microbiological safety of honey in relation to pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms. Analyzed the comparative characteristics of indicators and their values.

Keywords: honey, microbiological safety, international requirements, pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms

References

Butko, M. P., Gerasimov, A. S., Poskonnaya, T. F., Smirnov, A. M., Klochko, R. T., & Popov, P. A. (2019). *Trebovaniya po obespecheniyu bezopasnosti i veterinarno-sanitarnoy ekspertizy moda pchelinogo* [Requirements for ensuring safety and veterinary sanitary examination of bee honey]. Scientific Library

Publishing House

Zhuneva, L. S., Semchenko, M. V., & Asyakina, L. K. (2019). Analysis of technologies for obtaining dry honey. *Khraneniye i pererabotka sel'khozsyrya* [Storage and processing of agricultural raw materials], 2, 8-23. <https://doi.org/10.36107/spfp.2019.69>
Salimov, R. M. (2008). Microorganism survival in certain foods. *Dal'nevostochnyy agrarnyy vestnik* [Far

- Eastern Agricultural Bulletin], 4(8), 25-27. <https://doi.org/10.24411/1999-6837-2008-00074>
- Al-Nahari, A. A. M., Almasaudi, S. B., Abd El-Ghany, E. S. M., Barbour, E., Al Jaouni, S. K., & Harakeh, S. (2015). Antimicrobial activities of Saudi honey against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5), 521-525. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.006>
- Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A., & Ansari, M. J. (2012). Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards. *The Scientific World Journal*, 2012, 930849. <https://doi.org/10.1100/2012/930849>
- Anand, S., Deighton, M., Livanos, G., Morrison, P.D., Pang, E. C. K., & Mantri, N. (2019) Antimicrobial activity of agastache honey and characterization of its bioactive compounds in comparison with important commercial honeys. *Frontiers in Microbiology*, 10(263), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00263>
- Augustin, J.-C., & Carlier, V. (2006). Lessons from the organization of a proficiency testing program in food microbiology by interlaboratory comparison: analytical methods in use, impact of methods on bacterial counts and measurement uncertainty of bacterial counts. *Food Microbiology*, 23(1), 1-38. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.01.010>
- Boncrisiani, H., Li, J. L., Evans, J. D., Pettis, J. & Chen, Y. P. (2011). Scientific note on PCR inhibitors in the compound eyes of honey bees, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 42, 457-460. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0009-9>
- Bulgasem, B. Y., Lani, M. N., Hassan, Z., Wan Yusoff, W. M., & Fnaish, S. G. (2016). Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated From Natural Honey Against Pathogenic *Candida* Species. *Mycobiology*, 44(4), 302-309. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.4.302>
- Campeau, M. E. M., & Patel, R. (2014). Antibiofilm activity of manuka honey in combination with antibiotics. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Bacteriology*, 2014, 795281. <https://doi.org/10.1155/2014/795281>
- Chien, H.-Y., Shih, A.-T., Yang, B.-S., & Hsiao, V. K. S. (2019). Fast honey classification using infrared spectrum and machine learning. *Mathematical Biosciences and Engineering*, 16(6), 6874-6891. <https://doi.org/10.3934/mbe.2019344>
- Fernández, L. A., Ghilardi, C., Hoffmann, B., Busso, C., & Gallez, L. M. (2017). Microbiological quality of honey from the pampas region (argentina) throughout the extraction process. *Ryobiology*, 49(1), 69-72. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.010>
- Gisder, S., & Genersch, E. (2015). Special issue: honey bee viruses. *Viruses*, 7(10), 5603-5608. <https://doi.org/10.3390/v7102885>
- Gomes, S., Dias, L. G., Moreira, L. L., Rodrigues, P., & Estevinho, L. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 544-548. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.029>
- Hegazi, A. G., Al Guthami, F. M., Al Gethami, A. F. M., Allah, F. M. A., Saleh, A. A., Fouad, E. A. (2017) Potential antibacterial activity of some Saudi Arabia honey. *Veterinary World*, 10(2), 233-237. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.233-237>
- Johnston, M., McBride, M., Dahiya, D., Owusu-Apenten, R., Nigam, P. S. (2018). Antibacterial activity of Manuka honey and its components: An overview. *AIMS Microbiology*, 4(4), 655-664. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.655>
- Kwakman, P. H. S., & Zaat, S. A. J. (2012). Antibacterial components of honey. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 64(1), 48-55. <https://doi.org/10.1002/iub.578>
- Kwong, W. K., Mancenido, A. L. & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science*, 4(2), 170003. <https://doi.org/10.1098/rsos.170003>
- Liu, Q., Lei, J., & Kadowaki, T. (2019). Gene disruption of honey bee trypanosomatid parasite, *Lotmaria passim*, by CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(126), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00126>
- Mama, M., Teshome, T., Detamo, J. (2019). Antibacterial activity of honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a laboratory-based experimental study. *International Journal of Microbiology*, 2019, 7686130. <https://doi.org/10.1155/2019/7686130>
- Matović, K., Ćirić, J., Kaljević, V., Nedić, N., Jevtić, G., Vasković, N., & Baltić, M. Z. (2019). Physicochemical Parameters and Microbiological Status of Honey Produced in an Urban Environment in Serbia. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 14148-14157. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1659-1>
- Oliveira, A., Ribeiro, H. G., Silva, A. C., Silva, M. D., Sousa, J. C., Rodrigues, C. F., Melo, L. D. R., Henriques, A. F., & Sillankorva, S. (2017). Synergistic Antimicrobial Interaction between Honey and Phage against *Escherichia coli* Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 8, 664-302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02407>
- Pajor, M., Worobo, R., Milewski, S., & Szveda, P. (2018). The antimicrobial potential of bacteria isolated from honey samples produced in the apiaries located in pomeranian voivodeship in northern Poland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(9), 2002. <https://doi.org/10.3390/ijerph15092002>

- Regan, T., Barnett, M. W., Laetsch, D. R., Bush, S. J., Wragg, D., Budge, G. E., Highet, F., Dainat, B., de Miranda, J. R., Watson, M., Blaxter, M., & Freeman, T. C. (2018). Characterisation of the british honey bee metagenome. *Nature Communications*, 9(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07426-0>
- Ruiz-Argueso, T., & Rodriguez-Navarro, A. (1975). Microbiology of Ripening Honey. *Applied Microbiology*, 30(6), 893-896. <https://doi.org/10.1128/AEM.30.6.893-896.1975>
- Sereia, M. J., Alves, E. M., Toledo, V. A. A., Marchini, L. C., Faquinello, P., Sekine, E. S., & Wielewski, P. (2011). Microbial flora in organic honey samples of africanized honeybees from Paraná river islands. *Food Science and Technology*, 31(2), 462-466. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000200028>
- Sereia, M. J., Perdoncini, M. R. F. G., Março, P. H., Parpinelli, R. S., De Lima, E. G., & Anjo, F. A. (2017). Techniques for the evaluation of microbiological quality in honey. in V. de A. A. de Toledo (Ed.), *Honey Analysis* (pp.233-258). <https://doi.org/10.5772/67086>
- Silva, M. S., Rabadzhiev, Y., Eller, M. R., Iliev, I., Ivanova, I., & Santana, W. C. (2017). Microorganisms in Honey. In V. de A. A. de Toledo (Ed.), *Honey Analysis* (pp.233-258). <https://doi.org/10.5772/67262>
- Tudor, L., Mitrănescu, E., Galiş A. M., Ilie, L. I., & Ceauşi, C. (2006). Microbiological and physico-chemical analysis of honey from southern romania. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9(9), 1485-1494.
- Vázquez-Quiñones, C. R., Moreno-Terrazas, R., Natividad-Bonifacio, I., Quiñones-Ramírez, E. I., & Vázquez-Salinas, C. (2017). Microbiological Assessment of Honey in México. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.005>
- Vejnovic, B., Stevanovic, J., Schwarz, R. S., Schwarz R., Aleksic, N., Mirilovic, M., Jovanovic, N. M., Stanimirovic, Z. (2018). Quantitative pcr assessment of lotmaria passim in apis mellifera colonies co-infected naturally with nosema ceranae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 151, 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.11.003>