

EFFETTO DELL'ADDIZIONE DI POLLINE D'API BIOLOGICO ESSICCATO SULLO SVILUPPO DI MICRORGANISMI PATOGENI IN LATTE

Filippo FRATINI¹, Barbara TURCHI^{*}, Emanuel GAMÒ¹, Fabrizio BERTELLONI¹, Alessia GALIERO¹, Francesca PEDONESE¹, Roberta NUVOLONI¹, Domenico CERRI¹

RIASSUNTO - Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'effetto dell'addizione di una sospensione di polline d'api biologico essiccato sullo sviluppo in latte di alcuni microrganismi patogeni. Il polline utilizzato è stato raccolto da api allevate in provincia di Lucca (Toscana, Italia) nell'anno di vegetazione 2013 ed è stato utilizzato per preparare una sospensione da aggiungere in ragione dell' 1%, 2%, 4% (v/v) a Skim Milk inoculato con ceppi patogeni di riferimento in cariche pari a 10⁶ UFC/mL. I ceppi indagati sono stati *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enterica* sv. Thyphimurium ATCC 14028. Lo sviluppo dei microrganismi è stato monitorato dopo 24 e 48 ore dall'inoculo in campioni mantenuti a temperatura di refrigerazione e a temperatura ottimale di crescita. E' stato inoltre valutato il profilo microbiologico del polline impiegato. Il polline utilizzato presentava una carica batterica mesofila pari a 4,9 log UFC/g, con cariche in *Enterobacteriaceae* e *Lactobacillus* spp. pari a 3,7 log UFC/g e 4,9 log UFC/g, rispettivamente. Muffe e lieviti presentavano una carica di 5,5 log UFC/g. Variazioni nelle conte in latte sono state rilevate solamente dopo incubazione a temperatura ottimale di sviluppo. A 48 h di incubazione *E. faecalis* in latte al 4% di polline ha mostrato una diminuzione delle cariche pari a 1 log UFC/mL; *S. aureus* è diminuito di 2 log ufc/ml in latte al 2% e 4% di polline; *L. monocytogenes* è diminuita di quasi 4 log UFC/mL, sempre in latte al 4% di polline. Infine, *S. enterica* ha mostrato ben 6 log UFC/mL di diminuzione dopo 48 ore in latte al 4% di polline. Analisi ulteriori sono necessarie al fine di valutare in quale entità le diminuzioni riscontrate siano dovute ai composti antimicrobici presenti nel polline o piuttosto ad un effetto di competizione biologica esercitato dalla microflora naturalmente presente nel polline.

Parole chiave: polline d'api, attività antimicrobica, latte

SUMMARY - Effect of the addition of dried organic bee-pollen on the growth of pathogen bacteria in milk - The aim of the present work was to assess the effect of the addition of different percentages of dried organic bee-gathered pollen on the growth of some pathogen bacteria in milk. Different percentages (1%, 2%, 4% v/v) of dried organic pollen gathered from bees in vegetation year 2013 in Lucca Province (Tuscany, Italy) were added in Skim Milk deliberately contaminated with a concentration of 10⁶ CFU/mL of some reference

* Corrispondenza ed estratti: barbara.turchi@for.unipi.it, tel. 050-2216959

¹ Dipartimento di Scienze Veterinarie, Viale delle Piagge 2, Università di Pisa, Italia

pathogenic bacterial strains. The studied reference strains were *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enterica* sv. Thyphimurium ATCC 14028. Growth of microorganisms was monitored after 24 and 48 hours after inoculation in samples incubated at refrigerated condition and optimal growth temperature. Microbiological profile of pollen was also evaluated. Pollen employed showed a total mesophilic bacterial count of 4.9 log CFU/g; *Enterobacteriaceae* and *Lactobacillus* spp. counts were 3.7 log CFU/g and 4.9 log CFU/g, respectively; molds and yeasts count was 5,5 log cfu/g. Changes in microbial loads were shown after 48 h of incubation at optimum temperature. *E. faecalis* counts in milk with 4% of pollen suspension were 1 log CFU/mL lower than those of control samples; *S. aureus* decreased by 2 log CFU/mL in milk with 2% and 4% of pollen; *L. monocytogenes* decreased by almost 4 log CFU/mL in milk with 4% of pollen. Finally, *S. enterica* showed a decrease of 6 log CFU/mL after 48 hours in milk with 4% of pollen. No changes were detected for samples stored at refrigeration conditions. Further researches are needed in order to assess whether the observed decreases were due to antimicrobial compounds in pollen or rather to the effect of biological competition exerted by the microflora in dried pollen.

Key words: bee-pollen, antimicrobial activity, milk

INTRODUZIONE

Il polline d'api è il risultato dell'agglutinazione dei pollini del fiore con nettare, miele, sostanze salivari, mandibolari, ipofaringeeali delle api mellifere [1]. E' costituito da carboidrati (15%-53%); proteine (10%-40%); fibra grezza (0,3%-20%) e lipidi (1%-10%) [2]. Dopo la Seconda Guerra Mondiale il polline d'api ha iniziato ad essere utilizzato nella dieta umana in virtù delle innumerevoli proprietà curative e nutrizionali riconosciute: buon contenuto in proteine, vitamine, amminoacidi e minerali; azione stimolante nei confronti del sistema immunitario, attività antiossidante, anticancerogena, in modo particolare nei confronti del tumore alla prostata, e azione terapeutica contro le prostatiti ed i disturbi urinari [3-5].

Un'ulteriore attività che è stata riconosciuta al polline è quella antimicrobica nei confronti di microrganismi patogeni ed alternanti. Tale azione è attribuita principalmente ai composti fenolici che esso contiene [6].

In virtù delle proprietà benefiche del polline, recentemente è stato prospettato il suo utilizzo nella preparazione di diversi tipi di alimenti. In letteratura sono presenti alcuni studi nei quali il polline d'api è stato impiegato per la produzione di birra, biscotti

e polpette di carne [7-9].

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare lo sviluppo di alcuni microrganismi patogeni in latte addizionato con diverse percentuali di una sospensione di polline d'api biologico (1%, 2%, 4%).

MATERIALI E METODI

Il polline utilizzato è stato raccolto da api allevate in provincia di Lucca (Toscana, Italia) nell'anno di vegetazione 2013 ed è stato utilizzato per preparare una sospensione in latte addizionata in ragione dell'1%, 2%, 4% (v/v) a Skim Milk (Oxoid, Milano, Italia) inoculato con alcuni ceppi patogeni di referenza in cariche pari a 10⁶ UFC/mL. I ceppi indagati sono stati *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella enterica* sv Thyphimurium ATCC 14028. Lo sviluppo dei microrganismi è stato monitorato dopo 24 e 48 ore dall'inoculo in campioni mantenuti a temperatura di refrigerazione e a temperatura ottimale di crescita. *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* sv Thyphimurium sono stati enumerati rispettivamente su Kanamicina Aesculina Azide Agar con incubazione a 44°C

per 48 ore (Oxoid), e su Baird Parker con egg yolk tellurite supplement (Oxoid), Agar Listeria Ottaviani-Agosti (Biolife, Milano, Italia) e Brilliant Green Agar (Oxoid), tutti con incubazione a 37°C per 24-48 ore. Inoltre, è stato valutato il profilo microbiologico del polline, in particolar modo sono state enumerate le seguenti categorie microbiche: carica batterica mesofila totale in Plate Count Agar incubato a 30°C per 72 ore, *Enterobacteriaceae*, in VRBGA incubato a 37°C per 24 ore, *Lactobacillus* spp., in MRS agar incubato a 37°C per 72 ore in anaerobiosi, *Pseudomonadaceae*, in Pseudomonas agar con CFC supplement incubato a 30°C per 48 ore, muffe e lieviti in Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (BD Difco, Milano Italia), incubato a 25°C per 5 giorni. Per enterococchi e stafilococchi coagulasi positivi e negativi sono state applicate le metodiche sopra riportate. E' stata inoltre effettuata la ricerca qualitativa di *Salmonella* spp. (UNI EN ISO 6579, 2004) e di *Listeria monocytogenes* (UNI EN ISO 11290-1, 2005).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il polline impiegato presentava una carica batterica mesofila totale pari a 4,9 log UFC/g. Tra le diverse categorie microbiche, le *Enterobacteriaceae* erano presenti in cariche pari a 3,7 log UFC/g e *Lactobacillus* spp. in cariche

pari a 4,9 log UFC/g. Per quanto riguarda enterococchi, *Pseudomonadaceae* e stafilococchi, le cariche sono risultate essere inferiori a 2 log UFC/g. La flora microbica presente in maggior numero è risultata essere rappresentata da muffe e lieviti, con cariche pari a 5,5 log UFC/g. E' stato possibile evidenziare, inoltre, l'assenza di *Salmonella* spp e di *Listeria monocytogenes*.

Gli esperimenti condotti inoculando diverse percentuali di sospensione di polline a Skim Milk contaminato con i microrganismi oggetto di studio hanno rivelato un diverso andamento delle cariche batteriche, a seconda della temperatura di incubazione dei campioni stessi. Per quanto riguarda i campioni incubati a temperatura di refrigerazione, la crescita dei patogeni nei campioni di controllo e quella dei campioni contenenti polline sono risultate sovrapponibili (Tab. 1).

Quando invece i campioni sono stati incubati alle temperature ottimali di crescita per i microrganismi studiati, sono state rilevate in alcuni casi differenze non trascurabili tra i valori relativi ai campioni di controllo e quelli contenenti polline (Tab. 2). Tali differenze sono risultate sempre superiori ad un logaritmo nel caso di polline al 4% con incubazione di 48 ore rispetto al controllo.

In maggiore dettaglio, relativamente a *E. faecalis*, dopo 24 ore dall'inoculo è stato

Tabella 1 - Valori medi relativi alle cariche di *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* sv. Thyphimurium (log ufc/ml±ds) in latte addizionato con diverse percentuali di polline (1%, 2%, 4%) e nel controllo mantenuti a temperatura di refrigerazione per 24 e 48 ore

Table 1- Mean values of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Thyphimurium counts (log ufc/ml±ds) in milk added with different percentages of pollen (1%, 2%, 4%) and control samples kept at refrigerated temperature for 24 and 48 hours

Ceppi-Strains	Tempo-Time (h)	Controllo-Controls (log UFC/mL±ds) (log CFU/mL±sd)	1% polline-pollen (log UFC/mL±ds) (log CFU/mL±sd)	2% polline-pollen (log UFC/mL±ds) (log CFU/mL±sd)	4% polline-pollen (log UFC/mL±ds) (log CFU/mL±sd)
<i>E. faecalis</i>	24	5,79±0,01	5,32±0,65	5,67±0,28	6,00±0,56
	48	6,82±0,1	6,17±0,81	6,60±0,09	6,64±0,23
<i>S. aureus</i>	24	5,78±0,02	5,80±0,08	5,73±0,06	5,64±0,01
	48	5,85±0,01	6,04±0,5	5,82±0,07	5,74±0,02
<i>L. monocytogenes</i>	24	6,56±0,2	6,61±0,01	6,49±0,02	6,45±0,3
	48	7,38±0,14	7,39±0,12	7,37±0,06	7,14±0,05
<i>S. Thyphimurium</i>	24	5,88±0,13	5,97±0,2	5,93±0,02	5,87±0,09
	48	6,59±0,13	6,51±0,24	6,45±0,20	6,42±0,16

Tabella 2 - Valori medi relativi alle cariche di *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* sv. Thyphimurium (log ufc/ml±ds) in latte addizionato con diverse percentuali di polline (1%, 2%, 4%) e nel controllo mantenuti a temperatura ottimale di crescita per i diversi microrganismi per 24 e 48 ore

Table 2 - Mean values of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Thyphimurium counts (log ufc/ml±ds) in milk added with different percentages of pollen (1%, 2%, 4%) and control samples kept at optimal growth temperatures for 24 and 48 hours

Ceppi-Strains	Tempo-Time (h)	Controllo-Controls (log UFC/mL±ds) (log CFU/mL±sd)	1% polline-pollen (log UFC/mL±ds) (log CFU/mL±sd)	2% polline-pollen (log UFC/mL±ds) (log CFU/mL±sd)	4% polline-pollen (log UFC/mL±ds) (log CFU/mL±sd)
<i>E. faecalis</i>	24	8,08±0,11	8,21±0,82	8,72±0,04	8,70±0,13
	48	8,14±0,13	8,40±0,24	7,79±0,19	7,10±0,07
<i>S. aureus</i>	24	8,05±0,01	8,06±0,57	8,40±0,41	7,91±0,05
	48	8,07±0,01	7,23±0,19	5,98±0,05	6,29±0,14
<i>L. monocytogenes</i>	24	8,11±0,11	7,94±0,15	7,46±0,05	6,80±0,15
	48	8,43±0,06	6,19±0,06	6,32±0,16	4,71±0,11
<i>S. Thyphimurium</i>	24	8,03±0,50	8,41±0,17	8,40±0,12	8,92±0,07
	48	8,45±0,14	6,72±0,14	6,43±0,22	2,46±0,02

possibile osservare un lieve incremento delle cariche microbiche per i campioni di latte addizionati con 2% e 4% di sospensione di polline. Dopo 48 ore dall'inoculo, tuttavia, è stato rilevato, sempre in merito agli stessi campioni, un decremento delle cariche. In particolar modo il campione di latte addizionato al 4% ha presentato una diminuzione approssimativamente pari ad 1 log UFC/mL.

Per quanto riguarda *S. aureus*, dopo 24 ore dall'inoculo nessun campione ha presentato variazioni degne di nota. E' risultata, invece, di particolare interesse la situazione osservata dopo 48 ore dall'inoculo. Mentre nel campione di controllo, infatti, le cariche si sono mantenute nell'ordine di 8 log UFC/mL, in tutti gli altri campioni (1%, 2%, 4%) è stato rilevato un apprezzabile decremento, pari all'incirca ad 1 log UFC/mL per il campione addizionato all'1% di sospensione pollinica e a 2 log UFC/mL per i campioni al 2% e 4%.

Anche per quanto riguarda *L. monocytogenes* si è assistito ad una notevole riduzione delle cariche già a partire da 24 ore dall'inoculo nei campioni contenenti il 2% e il 4% di sospensione di polline con una diminuzione di 0,65 log UFC/mL e di 1,31 log UFC/mL, rispettivamente. Per riguarda quanto lo sviluppo microbico dopo 48 ore dall'inoculo, tutti i campioni addizionati con sospensione

di polline hanno presentato una diminuzione delle cariche, che si è attestata intorno a 2 log UFC/mL per i campioni all'1% e 2% di sospensione di polline, fino a quasi 4 log UFC/mL per i campioni al 4% di polline.

Infine, per quanto concerne *Salmonella* Thyphimurium, dopo 24 ore dall'inoculo è stato possibile osservare un lieve effetto di incremento della crescita batterica in tutti i campioni testati, specialmente nel campione contenente il 4% di sospensione di polline. Tuttavia, dopo 48 ore dall'inoculo è stata osservata una notevole diminuzione delle cariche microbiche: mentre il campione di controllo ha presentato una carica di 8,45 log UFC/mL, infatti, nei campioni all'1% e al 2% di polline le cariche sono risultate pari a 6,72 log UFC/mL e 6,43 log UFC/mL, rispettivamente. Di notevole rilievo è stata l'aggiunta del 4% di sospensione di polline, che ha causato una riduzione di ben 6 log UFC/mL dopo 48 ore dall'inoculo rispetto al controllo.

Allo stato attuale sono pochi gli studi incentrati sull'aggiunta di polline d'api ad una matrice alimentare [7, 8] e ancora di meno sono quelli che hanno valutato l'aspetto microbiologico dei prodotti derivati [9]. Gli studi condotti fino ad oggi sull'attività antimicrobica del polline sono concordi nel riconoscere una maggiore attività nei confronti

di germi Gram positivi (*S. aureus*, *Enterococcus* spp.) in virtù della conformazione della parete batterica [6][10][11]; tuttavia nel nostro lavoro anche la crescita in latte di *S. Thipymurium* è stata inibita dall'aggiunta di polline. Un risultato analogo è stato ottenuto recentemente da Turhan *et al* [12], i quali hanno rilevato un diminuito contenuto in coliformi in polpette di carne addizionate con polline, rispetto al controllo.

CONCLUSIONI

Questo lavoro ha evidenziato un non ottimale profilo microbiologico del polline d'api impiegato, in particolar modo relativamente a muffe e lieviti ed *Enterobacteriaceae*. Tali categorie non solo possono comprendere specie e ceppi a diverso grado dannosi per la salute umana, ma, quando in cariche elevate, pregiudicano l'impiego del polline quale ingrediente alimentare. Per quanto

concerne l'attività antibatterica, i dati ottenuti nel presente lavoro hanno messo in evidenza come la sospensione di polline abbia esercitato un notevole effetto di inibizione sulla crescita in latte dei microrganismi incubati a temperature ottimali di crescita.

Analisi ulteriori, basate sull'utilizzo di sospensioni di polline preventivamente sterilizzate, sono necessarie al fine di valutare in quale entità le diminuzioni riscontrate siano dovute ai composti antimicrobici presenti nel polline o piuttosto ad un effetto di competizione biologica esercitato dalla microflora naturalmente presente nel polline.

Ringraziamenti:

Poster presentato al 4° Congresso Lattiero-Caseario AITeL - Legnaro (PD) 12 settembre 2014 "Latte e derivati: ricerca, innovazione e valorizzazione".

BIBLIOGRAFIA

- 1) Campos MGR, Bogdanov S, Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, Ferreira F (2008) Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J Api Res* 47 (2) 154-161
- 2) Bogdanov S (2011) Pollen: Nutrition, Functional Properties, Health: A Review. Bee Product Science. <http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/PollenBook2Review.pdf>
- 3) Contessi A (2004) "Le Api - Biologia, allevamento, prodotti" Ed Edagricole, Bologna
- 4) Duclos AJ, Lee C, Shoskes DA (2007) Current treatments options in the management of chronic prostatitis. *Ther Clin Risk Manag* 3 507-512
- 5) Linksens HF, Jorde W (1997) Pollen as food and medicine. *Econ Bot* 51(1) 78-86
- 6) Morais M, Moreira L, Feas X, Estevinho LM (2011) Honey bee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem Toxicol* 49 1096-1101
- 7) Solgajová M, Ivanišvá E, Nôžová J, Francáková H, Tóth Z, Dráb S (2014) Antioxidant activity and polyphenol content of malt beverages enriched with bee pollen. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 3 281-284
- 8) Solgajová M, Nôžová J, Kadáková M (2014) Quality of durable cookies enriched with rape bee pollen. *J Cent Eur Agr* 15(1) 24-38
- 9) Abouda Z, Zerdani I, Kalalou I, Faid M, Ahami MT (2011) The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. *Res Microbiol* 6 376-384
- 10) Fatrcová-Šamková K, Nôžková J, Kacániová M, Máriássyová M, Rovná K, Stričik M (2012) Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health, Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 48(2), 133

- 11) Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X, Estevinho LM (2014) Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem Toxicol* 63 233-239
- 12) Turhan S, Yazici F, Saricaoglu FT, Mortas M, Gencelep H (2014) Evaluation of the nutritional and storage quality of meatballs formulated with bee pollen. *Korean J Food Sci An* 34 (4) 423-433