

## Vilken roll spelar binas mjölksyrabakterier i kupan för binas hälsa?

Målsättningen med projektet var att undersöka ämnen i atmosfären i bikupor under ett helt år. Vi ville se om dessa ämnen härstammar från binas mjölksyrabakterier och om de kan vara av betydelse för binas försvar mot sjukdomar som t.ex. *Varroa* kvalster och *Nosema*. Viktigt var också att utreda om kupans ingång och ventilation påverkar atmosfären. Mjölksyrabakterierna lever i binas honungsmagar och tillsätts i honung, bibröd och bipollen av biet själv. Det är 13 olika (9 *Lactobacillus* arter och 4 *Bifidobacterium* arter) vilka uppskattas, via tidigare forskarresultat, närvara i en bikupa under säsong i ett totalantal på ca  $10^{13}$  fördelat på just honungsmagar, honung, bipollen och bibröd.

Projektet erhöll 22% av sökta medel och blev därför starkt begränsat men genomförbart i liten skala vad det gäller mätningar.

En analys av totalmängd av dessa ämnen i varje kupas atmosfär utfördes. En undersökning om t.ex. kvalster är känsliga för denna cocktail av ämnen genomförs just nu i slutet av 2012.

### *Utfört arbete 2011-2012:*

- En bigård med 8 moderna kupor av plast/styrofoam köptes in såväl som kvalsterfria bin av rasen *Apis mellifera mellifera* från en kvalsterfri zon i Jämtland.
- Kuporna målades, 4 st med brun färg och 4 st med grön färg. För kupor med brun färg tilläts bin endast ha en in/utgång genom ett litet hål under takåsen. Dessutom hade de inget bottengaller. För kupor med grön färg applicerades normalt fluster för in och utgång samt bottengaller. Bottengallret täckte dock inte hela botten utan endast ca en tredjedel var ”öppet”.
- Tre olika mätinstrument köptes in från Svenska miljöinstitutet i Göteborg, IVL. Samtliga med tillhörande tjänst av analys efter mätningar. Instrumenten mäter olika flyktiga ämnen i luft och valdes ut för att kunna mäta på ett ungefär förväntade ämnen från mjölksyrabakterier.
- Mjölksyrabakterierna odlades upp på labbet enskilt i tuber men även enskilt i tuber placerade i en sluten behållare. Bakterierna fick endast tillväxa på samma föda som de är vana vid i en bikupa dvs honung och bipollen, dock steriliserat. Med hjälp av de tre olika mätarna registrerades vilka flyktiga ämnen som bakterierna bildar under sin tillväxt under 7 dagar. Det var ämnen som lämnar den vätska de tillväxt i och vilka difunderar ut i tubens/behållarens atmosfär. En kontroll användes för att jämföra med de ämnen som difunderar från endast tillväxtmediet.
- Baserat på mätresultaten, av de på labbet odlade bakterierna och på den begränsade ekonomin, valdes en av mätarna ut för att appliceras i varje bikupa vid ett måttillfälle under varje årstid under ett år. Denna mätare mäter ättiksyra och myrsyra vilka är ämnen som redan idag används som ekologiskt bekämpningsmedel av olika sjukdomar hos bin. En andra mätare valdes ut för att appliceras som stickprov vid ett

prov tillfälle under högsäsong, sommar! Denna mätare mäter Bensen, Toluen, n-Oktan, Etylbensen, m+p-Xylen, O-xylen och n-Nonan vilka möjligtvis har en potential att inverka mot olika sjukdomar.

## Resultat

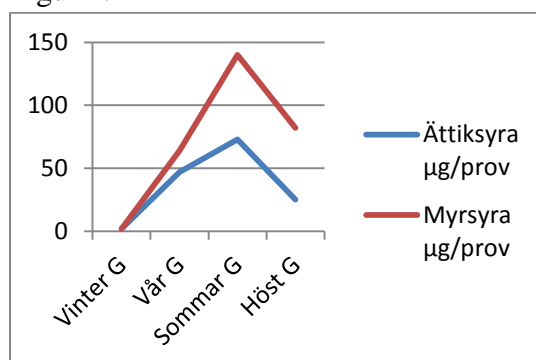
Ämnen bildade av mjölksyrabakterier:

- Av de bakterier som odlats upp på labbet under mättillfället var totalantalet bakterier av de 13 olika tillsammans ca  $10^{10}$ . Från dessa uppmättes en totalmängd av >3.2 milli gram ättiksyra och >0.18 milli gram myrsyra. (Enligt IVL betyder ”>” en risk för att mängderna är underskattade och dessutom menar de att alla myrsyrahalter är osäkra p.g.a. att ättiksyrahalten är så hög). Detta innebär att mer ämnen har bildats än vad mätarna i vissa fall klarar av och att halten av myrsyra bör vara högre i verkligheten. Vi vet av tidigare mätningar att bakterierna även bildar en tredje organisk syra, mjölksyra vilken dock inte är flyktig utan stannar förmodligen i honung och bibröd. Mjölksyra används också som organiskt/ekologiskt bekämpningsmedel i bikupor men i detta projekt mäts bara flyktiga syror och alltså inte mjölksyra. Däremot har vi tidigare mätt just mängden mjölksyra som dessa bakterier bildar vilket är ca 3 gånger så mycket som halten ättiksyra. Andra uppmätta substanser ses i figur 3 nedan.

Uppmätta ämnen från bikupor:

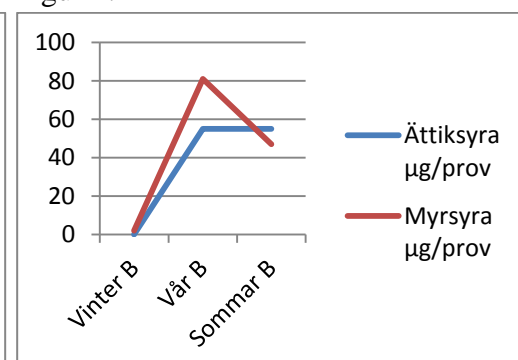
- Resultaten mellan normala kupor med bottengaller (fig. 1.) och ”täta” kupor med endast ett litet ingångshål i toppen av kupan (fig. 2.) skiljde sig inte så mycket. Toppvärdet för snittet för alla kupor sammantaget uppmätt under en månad var för Myrsyra ca 110  $\mu\text{g}$ , och för ättiksyra ca 65  $\mu\text{g}$ .

Figur 1.



Snitt för normala kupor

Figur 2.



Snitt för ”Täta kupor”

- Andra uppmätta substanser ses i figur 3 nedan. Förhållandevis små mängder bildas på labbet och dessutom ännu mindre mängder i fält.

## Slutsats

### *Ämnen bildade av mjölksyrabakterier:*

- Bakterierna tillväxer ”färdigt” på labbet i en tub på 3 dagar och bildar inte så mycket mer ämnen efter det. Mätningarna varade dock i 7 dagar men resultatet är alltså från ca 3 dagars växt. Under en säsong med full bistryka kan bakterierna i en kupa tillväxa bra i minst 100 dagar men bildar ämnen under hela året vilket vi uppskattar till en faktor gånger ca 50. Och i en kupa finns det 1000 ggr fler mjölksyrabakterier än i dessa tuber på labbet. Sammanlagt kan man teoretiskt multiplicera resultaten från labbet med en faktor gånger 50.000. Teoretiskt finns det då en kapacitet per kupa att bilda runt 151 gram koncentrerad ättiksyra och 450 g mjölksyra samt runt 9 gram myrsyra (även om denna mängd myrsyra kan vara kraftigt underskattad enligt IVL). Halten mjölksyra som kan bildas i en bikupa är ca 450 g men återigen mättes inte denna syra i bikuporna.
- Tyvärr var de uppmätta halterna av myrsyra och ättiksyra i kuporna ganska små per kupa och månad, drygt 0.1 g ättiksyra och knappt 0.1 g myrsyra. Dock var det tydligt att dessa flyktiga syror bildas och ökar från vinter till sommar (fig. 1 och 2.). Det verkar generellt inte vara någon skillnad i halterna myrsyra och ättiksyra i de båda kupertypernas atmosfär. Med andra ord verkar inte de flyktiga syror vädras ut mer i en kupa med vanligt fluster nedtill och med bottengaller jämfört med en tät kupa med endast ett lite ingångshål upptill. Det kan finnas många förklaringar till att de uppmätta ämnena i kuporna var små. En sådan kan vara att stora mängder av de bildade syror binds upp i honung och bibröd vilket blir föremål för framtida undersökning. Under försöket vid tidig sommar lämnade många bisvärmar från samtliga bisamhällen vilket var en följd av att bina fick klara sig själv utan inverkan. De uppstaplade våningarna i respektive samhälle blev ganska tomma då bistrykan reducerades till kanske bara 30%. När ett samhälle blir av med 1-2 svärmar så tar dessa svärmar även med sig betydande mängder honung. De relativt tomma kuporna kan såklart ha påverkat mätresultaten negativt då plötsligt mindre organiska syror producerades och vilka spreds i en allt för stor atmosfärsvolym. Dessutom satt mätarna i bikupans topp av praktiska skäl och den kritiska massan med bin satt efter svärmavgångar i botten av kuporna.

Det finns vetenskapliga artiklar (1, 2) som beskriver att det, i snitt av 7 olika honungstyper producerade under hela säsongen, finns ca 0.55 g myrsyra, ca 0.46 g ättiksyra och 0.34 g mjölksyra per kilo honung. Det är med stor sannolikhet binas egna mjölksyrabakterier som bildar dessa syror. Om ett samhälle tilläts invintra på 10 kg av sin egen honung skulle det finnas ca 5.5 g myrsyra, 3.4 g mjölksyra och 4.6 g ättiksyra som sannolikt gradvis kan användas under vinterhalvåret vid konsumtion av bina. Som en parallell ges vid ekologisk korttidsbehandling av myrsyra mot *Varroa* ca 12 g myrsyra. Ett bisamhälle producerar sammanlagt ca 40 kg honung till biodlaren som innehåller bunden myrsyra (ca 22 g), bunden mjölksyra (ca 13.6 g) och bunden ättiksyra (ca 18.4 g) vilka dock avlägsnas från bikupan och bina vid honungsskörd. Bina har även utöver dessa 40 kg honung producerat honung som de konsumerar under vår och sommar vilken innehåller en del mängder bundna syror. Det kan även

finnas betydande mängder av dessa syror bundna i bibröd vilket måste undersökas. Även om mjölksyra inte uppmättes i kupornas atmosfär i detta försök då den inte är flyktig så är det viktigt att påpeka att även denna syra används vid ekologisk bekämpning av Varroa. Totalhalten mjölksyra som används per behandling är ca 10 g koncentrat. Mjölksyabakterierna har en kapacitet att bilda ca 450 g per samhälle och år.

*Sammanfattade resultat med slutsats:*

Figur 3.

Ämnen koncentrat	Teoretisk mängd ämnen bildade i kupan baserat på labbresultat.	Ämnen i ca 40 kg honung /bikupa enligt litteratur.	Uppmätta halter ämnen i snitt från en kupas atmosfär per månad	Halter av ämnen använda vid ekologisk bekämpning per behandling
Myrsyra	>9 g	22 g	0.11 g	12 g (Varroa)
Ättiksyra	151 g	18.4 g	0.065 g	60 g (Nosema)
Mjölksyra	450 g	13.6 g	Ingick inte i mätningar	10 g (Varroa)
Bensen	0.14 g	-	0.0050 µg	-
Toluen	0.70 g	-	0.017 µg	-
N-Oktan	0.65 g	-	0.013 µg	-
Etylbensen	0.02 g	-	0.010 µg	-
M+p-xylen	1.2 g	-	0.0051 µg	-
O-xylen	0.13 g	-	0.0033 µg	-
Nonan	0.27 g	-	0.0033 µg	-
3-Metylbutanal	0.38 g	-	-	-

Från tabellen ovan kan vi se att mjölksyrabakterierna producerar en del ämnen som används idag i ekologisk bekämpning men även andra starka bioaktiva substanser. Dessa övriga ämnen förutom de organiska syrorna var också jämnt uppmätta oberoende av kupertyp. Fem av dessa ämnen (Fig. 3) är direkt toxiska och påminner i sin kemiska struktur om bensosyra de innehåller samma bensenring. Hur dessa naturliga bioaktiva ämnen från binas egna mjölksyrabakterier påverkar Nosema återstår att undersöka. Dessutom så kan Toluen och Xylen medföra nervskador och det finns opublicerad forskning om Varroa kvalstrets känslighet vid nervpåverkan.

En stor del av alla dessa ämnen kan ha bundits i kupan på något sätt t.ex. i honung och bibröd men de kan också ha använts, brutits ned, omvandlats till andra ämnen eller vädrats ur. Många faktorer kan också förändra mjölksyrabakteriernas antal och kapacitet att producera uppmätta ämnen vilket i sin tur påverkar binas förmåga att hålla sig friska. När största delen honung tas bort från bikupan av biodlaren försvinner en hel del ämnen som möjligtvis är lagrade i honungen för att på något sätt kanske senare hjälpa till med försvaret av bina. Mjölksyrabakterierna lever i binas

honungsmage under hela året och även under vintern. Vi vet idag att mjölksyrabakterierna inte kan tillväxa eller tillverka viktiga ämnen på bordssocker men väldigt bra på honung. Det innebär att mjölksyrabakterierna som finns hos de honungsbin som har fått endast bordssocker att leva på under vintern istället för honung inte tillväxer och/eller tillverkar viktiga ämnen när bina konsumerar sockret. Utan bakterietillväxt kan inga organiska syror bildas och den delen av försvaret ligger nere under halva året. Vi har anledning att omvärdera om det faktiskt är så att största delen av dessa flyktiga ämnen faktiskt stannar under en längre tid i honung och bibröd än förväntat. Dessa ämnen kan också ha en viktig roll under vinterhalvåret då kupans temperatur är mycket lägre vilket medför att antalet mjölksyrabakterier är lägre än på sommaren (opublicerad studie). Vi har också anledning att tro att en konsumtion av honung av bina under vintern kan stötta halten ämnen som ett mindre antal mjölksyrabakterier nu inte kan leverera. En konsumtion av honung kontra bordssocker kan förmodligen göra stor skillnad mot Nosema vad det gäller både redan befintliga ämnen i honung samt ämnen som tillverkas av mjölksyrabakterierna under biets konsumtion av honung.

#### *Fortsättning av projektet:*

Det finns skäl att anta att den sammanlagda mängden av olika verksamma substanser, bildade av binas mjölksyrabakterier i en bikupa, kan utgöra ett försvar mot olika fientliga organismer hos bina som t.ex. Varroa och Nosema. Försöken kommer därför att fortsätta men i mindre skala då det inte verkade mer fördelaktigt med mer täta kupor. Fortsättningsvis används bara kupor med nätbotten som täcker en tredjedel av bottenytan och med normalt fluster vilket ungefär är förenligt med dagens biodling. Vidare används bara en enda ”låda” under hela säsongen istället för att bygga på med 2-3 lådor till under sommarhalvåret. Detta för att hela tiden ha en kupa full med bin under mätningarna även om svärmar lämnar kupan. Dessutom påminner detta trånga utrymme mer om det mindre utrymme som ett bisamhälle har när de lever naturligt i ihåliga trädstammar.

Vidare kommer tester att utföras på labbet på hur Varroa kvaliteten påverkas av de flyktiga ämnen som mjölksyrabakterierna producerar ut i en bikupas atmosfär.

#### **Referenser**

1. Gaëlle Daniele\*, Dany Maitre and Hervé Casabianca. Identification, quantification and carbon stable isotopes determinations of organic acids in monofloral honeys. A powerful tool for botanical and authenticity control. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2012, 26, 1993–1998 (wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.6310.
2. E. K. Nelson and H. H. Mottern. Some organic acids in honey. Industrial and engineering chemistry. March. 1931.