

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Filip Jaman

Preddiplomski sveučilišni studij zootehnika

**Prisutnost spora nozemoze (*Nosema sp.*) kod radilica medonosne
pčele (*Apis mellifera*) iz različitih oplodnjaka**

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Filip Jaman

Preddiplomski sveučilišni studij zootehnika

**Prisutnost spora nozemoze (*Nosema sp.*) kod radilica medonosne
pčele (*Apis mellifera*) iz različitih oplodnjaka**

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Filip Jaman

Preddiplomski sveučilišni studij zootehnika

**Prisutnost spora nozemoze (*Nosema sp.*) kod radilica medonosne
pčele (*Apis mellifera*) iz različitih oplodnjaka**

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. dr. sc. Marin Kovačić, mentor
2. prof. dr. sc. Zlatko Puškadija, član
3. prof. dr. sc. Tihomir Florijančić, član

Osijek, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski sveučilišni studij zootehnika

Završni rad

Filip Jaman

Prisutnost spora nozemoze (*Nosema sp.*) kod radilica medonosne pčele (*Apis mellifera*) iz različitih oplodnjaka

Sažetak:

Nozemoza je jedna od najznačajnijih zaraznih bolesti pčela koja se širi najčešće preko invadiranih pojilica, nečistih okvira i nestručnim rukovanjem samog pčelara. Uzrokovana je dvjema vrstama jednostaničnih parazita, *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost spora nozemoze kod radilica i matica iz oplodnjaka koji su othranili prvu, drugu i treću generaciju matica. Ukupno je korišteno 45 uzoraka, po 15 iz svake generacije. Radilice iz treće generacije imale su najveći broj spora, dok su radilice iz druge generacije imale najmanji broj spora. Matice su bile bitno manje zaražene i nije bilo razlika između skupina. Detaljnija istraživanja su potrebna kako bi se utvrdila brzina prijenosa bolesti unutar oplodnjaka.

Ključne riječi: medonosna pčela, matica, nozemoza, broj spora, laboratorijska pretraga

27 stranica, 6 tablica, 18 grafikona i slika, 13 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen: u Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate university study Agriculture, course Zootechnique

BSc Thesis

Filip Jaman

The presence of spores nosemosis (*Nosema sp.*) in worker bees (*Apis mellifera*) from different fertilisers

Summary:

Nosemosis is one of the most significant bee diseases that commonly spreads through invaded feeders, frames and unskilled handling of the beekeepers. This disease is caused by two types of parasites, *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. The goal of this research was to determine the presence of the *Nosema* spores in worker bees and queen bees from the mating nucs which have produced first, second and third generation of queens. In total 45 samples were collected, 15 from each generation. The worker bees from the 3rd generation had the most spores, while the 2nd generation bees had the fewest number. The queen bees were less affected and the difference between the groups was not significant. More in depth research is required to determine the disease transmission rate in small hives like mating nucs.

Keywords: honeybee, queen bee, nosemosis, number of spores, laboratory test

27 pages, 6 tables, 18 figures, 13 references

BSc Thesis is archived: in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Osnovne značajke zdravog legla.....	3
1.2. Najznačajnije bolesti medonosne pčele	6
1.3. Nozemoza kod pčela.....	9
1.3.1. Uzročnici nozemoze.....	11
1.3.2. Nozemoza uzrokovana nametnikom <i>Nosema apis</i>	11
1.3.3. Nozemoza uzrokovana nametnikom <i>Nosema ceranae</i>	12
1.4. Nozemoza i sindrom nestanka pčelinjih zajednica	14
2. MATERIJAL I METODE.....	15
2.1. Laboratorijska pretraga	16
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	19
3.1. Broj spora kod radilica.....	19
3.2. Matice	21
3.3. Korelacije.....	24
4. ZAKLJUČAK.....	25
5. LITERATURA.....	26

1. UVOD

Predmet ovog rada je utvrditi prisutnost spora nozemoze (*Nosema sp.*) kod radilica i matica medonosne pčele (*Apis mellifera*). Nozemoza je nametnička bolest koja zahvaća odrasle pčele. Radi se o kozmopolitski rasprostranjenoj bolesti, prisutnoj u tropskim i suptropskim područjima u kojima ne predstavlja veći problem, do umjerenih područja promjenjive klime u kojima čini znatna oštećenja na pčelinjoj zajednici. Ova bolest uzrokovana je dvjema vrstama jednostaničnih, obligatnih unutarstaničnih parazita, *Nosema apis* i *Nosema ceranae*, koji se razmnožavaju stvaranjem spora. Kao posljedica obolijevanja, pčele prerano postaju sakupljačice te doprinosi patološkim promjenama na epitelnim stanicama srednjeg crijeva remeteći tako probavu i metabolizam, što kao posljedicu ima neishranjenost pčela te prerano ugibanje.

Za potrebe pisanja ovog rada provedeno je istraživanje na terenu i u laboratoriju.

Medonosna pčela živi u pčelinjoj zajednici funkcionirajući kao jedna cjelina. Iz tog razloga postoji velika mogućnost prenošenja zaraznih bolesti s jedne pčele na ostale pčele unutar zajednice pa čak i na cijeli pčelinjak. U slučaju zaraze, važno je da ju pčelar primijeti na vrijeme i toj zajednici posveti potpunu pažnju kako ne bi došlo do pada prinosa meda i gubitka pčelinjih zajednica. To nije uvijek lako, posebice preko ljeta kada dolazi do mnogih prikrivenih bolesti koje je teško uočiti na vrijeme te se brzo prenose na ostale odrasle jedinke koje zbog iscrpljenosti ugibaju u prirodi.



Slika 1. Medonosna pčela

Izvor: http://www.pcela-vucjak.org/?page_id=853

Upravo zato važno je da pčelari budu upoznati sa sadržajem važećih normativnih akata vezanih uz kontroliranje i suzbijanje pčelinjih bolesti. Neki od najvažnijih su (Tlak Gajger, 2017.):

- Pravilnik o mjerama suzbijanja i iskorjenjivanja pčelinjih bolesti,
- Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju za tekuću godinu,
- Program kontrole i suzbijanja varooze i
- Program praćenja etinioze na području Republike Hrvatske.

„Budući ne postoji obvezan godišnji veterinarski pregled pčelinjaka, pčelar kao držalac životinja koje proizvode hranu je odgovoran za prepoznavanje određenih promjena na

pčelinjem leglu i/ili odraslim pčelama koje upućuju na sumnju o prisutnosti bolesti. Kod bolesti koje su u EU od posebnog značenja, a posebice u okviru međunarodne trgovine i zahtjeva prilikom izvoza (Directive 92/65/EEC), o sumnji moraju obavijestiti predstavnika ovlaštene veterinarske organizacije koji je dužan obaviti pregled pčelinjih zajednica i po potvrđivanju sumnje uzeti službene uzorke za laboratorijsku dijagnostiku“ (Tlak Gajger, 2017.).

1.1. Osnovne značajke zdravog legla

Matica počinje s razvojem pčelinjeg legla sredinom siječnja na samom početku pčelarske godine, a na slici 2 prikazana je zdrava pčelinja zajednica. Optimalna temperatura u klupku je oko 35°C, dok je pri krajevima košnice nešto manja temperatura koja doprinosi pravilnom razvoju legla. Raspuštanjem klupka, matica povećava leglo u obliku koncentričnih krugova i prelazi na susjedne okvire te se penje prema gornjem nastavku. Tek sneseno bijelo jaje promjera 1 mm stoji okomito u sredini dna stanice iz kojeg se nakon tri dana izleže ličinka. Pčela hraniteljica ju hrani 6 dana i do 8000 puta, zahvaljujući čemu ličinka naraste i do 500 puta.



Slika 2. Zdrava pčelinja zajednica

Izvor: <http://pcelari-bujstine.com/>

Kod zdrave pčelinje jedinke ličinke su bijele boje, a kolutići su dobro vidljivi. Upravo promjene tih karakteristika upućuju na bolest, stoga je pri sumnji na istu važno promatrati izgled pčele. Nakon 5 dana ličinka se počinje pružati i pčele ju pokrivaju s poklopcem od saća što je vidljivo iz slike 3. Počinje razvoj kolutićave ličinke u mladu pčelu. Nakon 21 dan iz stanice izlazi mlada pčela radilica kojoj je prva funkcija već nakon dva dana čišćenje saća i hranjenje tek izleženih pčela kao što su starije hranile i čistile njih. Tablica 1 prikazuje vrijeme razvoja pojedinih formativnih oblika pčele radilice.

Tablica 1. Razvoj pčele radilice

Stadij razvoja	Broj dana razvoja
Jaje	3 dana
Savijena ličinka	5-6 dana
Ispružena ličinka	2-3 dana
Kukuljica	10 dana
Ukupno	21 dan

Izvor: Belčić i sur. (1982.)

Matica se razvija brže te je potrebno tek 16 dana za razvoj, dok je kod truta potrebno 24 dana. Budući da je kod odraslih pčela teško uočiti bolest, one u pravilu ugibaju izvan košnice. Dobra matica njihov gubitak pokriva dodatnim zalijeganjem jaja što u prevelikoj invadiranosti bolesti obično ne bude dostatno te broj pčela u pčelinjoj zajednici opada. Ukoliko pčelar primijeti opadanje broja pčela u zajednici, važno je poslati uzorke u veterinarski laboratorij za dijagnosticiranje bolesti kako bi se ista utvrdila prije nego je prekasno.



Slika 3. Životni ciklus pčele

Izvor: <https://blog.dnevnik.hr/apikultura/2013/02/1631508163/zivotni-ciklus-pcele-medarice.html>

Kod dobro razvijenih proizvodnih pčelinjih zajednica pri vrhuncu razvoja nalazi se i do 40000 pčela radilica. Mlade pčele počinju s poslom čišćenja saća, nakon čega pripremaju hranu od meda i peludi za pčele starije od 3 dana. Od šestog do dvanaestog dana pčele počinju lučiti mliječ kojom hrane najmlađe ličinke pčela i maticu. One još ne napuštaju košnicu te takve pčele nazivamo kućne pčele. Kada napuste košnicu nazivaju se pčele izletnice ili sakupljačice. Dobro pamte mjesto gdje se nalazi košnica. Životni vijek pčela je oko 40 dana. Prije početka zimovanja, matica nese sve manje jaja, a radilice se pripremaju za zimu. Istjeraju trutove i smještaju med za hranu tijekom zimovanja. Kada je temperatura ispod 12 °C pčele formiraju klupko što je vidljivo iz slike 4. Zimske pčele imaju puno duži životni vijek od ljetnih pčela te u pravilu dočekaju proljeće.



Slika 4. Zimovanje pčela u klupku

Izvor: <https://www.pcelarstvo.hr/index.php/radovi/pcelarska-radionica/318-termoregulacija-kosnice-ljeti-i-zimi>

1.2. Najznačajnije bolesti medonosne pčele

Varooza je bolest koju uzrokuje nametnička grinja, ektoparazit *Varroa destructor*. Ženke nametnika žive na odraslim pčelama i hrane se bjelančevinasto-masnim tkivom, dok se razvojni oblici grinja hrane u poklopljenom leglu, pa se znakovi bolesti očituju na leglu i odraslim pčelama. Kada se razvije veliki broj nametnika takva pčelinja zajednica slabi i posve propada. Grinja je vidljiva golim okom, ovalnog, plosnatog tijela i smeđe-crvenkaste boje (slika 5). Kako broj grinja u pčelinjoj zajednici raste, ona slabi te ukoliko nije tretirana može uginuti. Lijekovi za suzbijanje bolesti dodaju se obično u bezpашnom razdoblju zbog karence na med.



Slika 5. Grinja *Varroa destructor*

Izvor: <https://entomologytoday.org/2020/02/07/varroa-mites-new-guide-outlines-integrated-pest-management-options/>



Slika 6. Grinja *Varroa destructor* na pčeli s deformiranim krilima

Izvor: Kovačić, 2018.

Životni vijek ženki je 2-3 mjeseca po ljeti, a zimi 6-8 mjeseci, prezimljavaju zajedno sa zimskim pčelama. Odrasle grinje nalaze se na pčelama ili u leglu (reproduktivna faza). Prije razmnožavanja, s odraslih pčela ulaze u stanicu legla neto prije zaklapanja. Grinje preferiraju

trutovsko leglo jer razvoj trutovskog legla traje 4 dana duže od razvoja radilačkog lega te se uspije razviti više potomaka. Grinjama odgovara i nešto niža temperatura za razvoj, matica trutovsko leglo obično zaliježe na krajnje okvire gdje je i temperatura nešto niža nego u središtu košnice što je jedan dodatan razlog zbog kojeg grinja značajno zaposjeda trutovsko leglo. Odlazu jaja u unutrašnjosti stanice sa savijenim ličinkama. Unutar stanice legla odvija se sparivanje između brata i sestre. Kada pčela izlazi iz stanice s njom izlaze i uspješno razvijene grinje, dok mužjak i nerazvijene grinje ostaju u stanici i ugibaju (Rosenkranz i sur., 2010.).

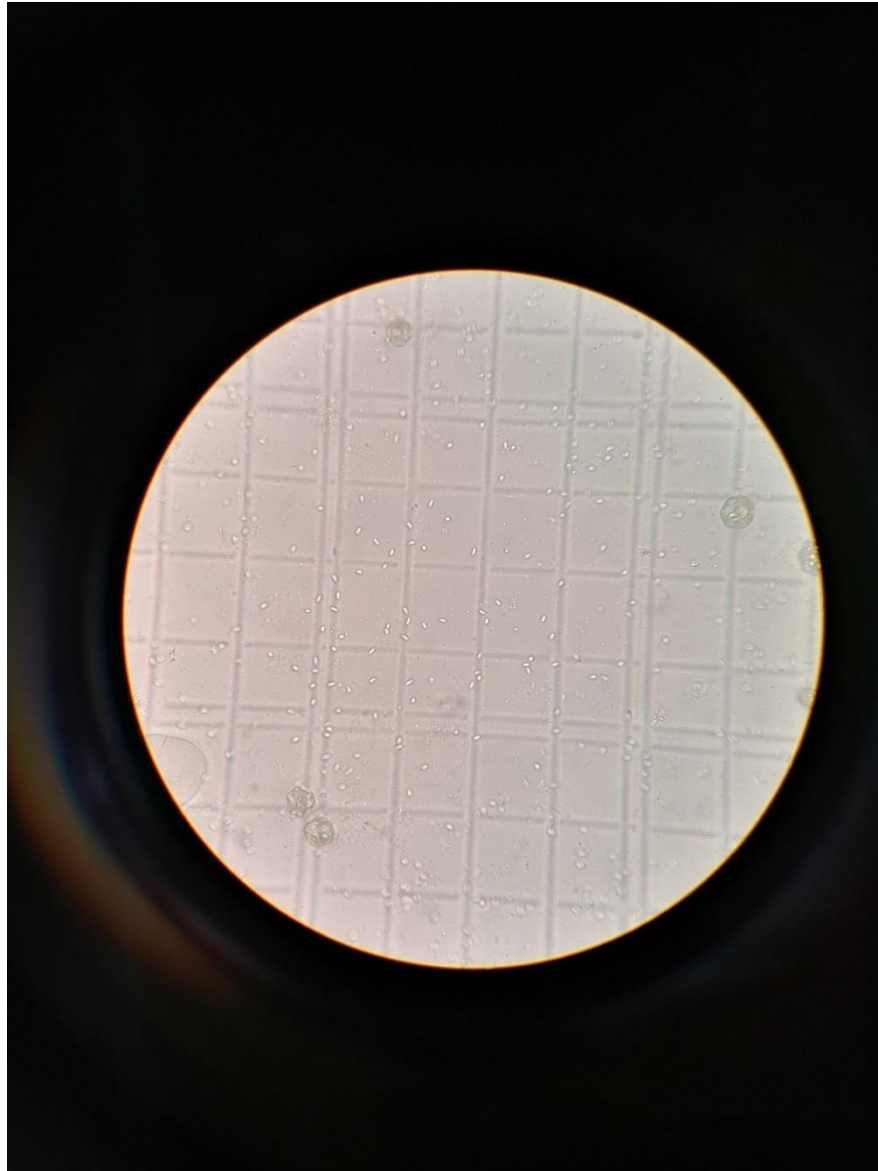
Jako su pokretljive i prelaze s jedne pčele na drugu. Čim se prihvate na pčelu pokušavajući doći do zatka. Zavlače se između kolutića, probijaju tanku membranu i hrane se bjelančevinasto-masnim tkivom. Tijekom zime ženke borave na zatku pčele ispod voštanih žlijezda. Najčešći prirodni način širenja je grabež i zalijetanje u tuđe košnice no također i pčelar nestručnim rukovanjem može znatno proširiti grinju po pčelinjaku. Varooza se proširila po svijetu prodajom rojeva.

Nametnička grinja *V. destructor* također ima važnu ulogu pri pojavnosti i širenju drugih bolesti pčela, posebice zbog imunosupresivnog učinka na invadirane pčelinje zajednice te mogućnosti mehaničkog prijenosa uzročnika drugih bolesti pčela, a poglavito virusa kojima služi kao mehanički i/ili biološki prijenosnik i rezervoar infekcije. Utvrđivanje varooze provodi se apitehničkim radnjama i odgovarajućim laboratorijskim pretragama. Pčelar i sam nakon tretiranja može na antivaroznoj podnici izbrojati broj otpalih grinja te imati približnu sliku djelovanja lijeka i invadiranosti pčelinje zajednice. Slaba invazija grinjama, uglavnom prolazi neprimijećeno. Proporcionalno broju grinja u zajednici je također jakost zajednice odnosno na više pčela i legla biti će više grinja. U slučaju kada se ne provode mjere kontrole varooze, dolazi do jake invazije koja uzrokuje vidljive kliničke znakove bolesti. Uobičajeno se to najbolje uočava u kasno ljeto i bezpašno razdoblje. Pčelinja zajednica nije u mogućnosti pripremati se za zimovanje, skupljanje nektara i peludi što obično rezultira razočaranjem u rano proljeće odnosno pri prvom pregledu kada to temperatura dozvoljava time što obično dolazi do uginuća zajednice ili lošeg prezimljavanja što rezultira slabim zajednicama u rano proljeće.

1.3. Nozemoza kod pčela

Nozemoza je nametnička bolest odraslih pčela prouzrokovana mikrosporidijama iz roda *Nosema*, koje u nepovoljnim životnim uvjetima stvaraju spore. Uzročnici nozemoze dvije su vrste jednostaničnih, obligatnih unutarstaničnih parazita, *Nosema apis* i *Nosema ceranae*, koje se razmnožavaju sporama. Spore uzročnika bolesti ulaze u probavni sustav preko kontaminirane hrane i vode ili tijekom socijalne interakcije s ostalim članovima pčelinje zajednice. Učinak nozemoze na pčele manifestira se na način da prerano postaju sakupljačice, javlja se nedostatak kućnih pčela koje njeguju leglo, a zbog patoloških promjena na epitelnim stanicama srednjeg crijeva i poremećaja u procesima probave i metabolizma dolazi do neishranjenosti. Hrana samo prolazi kroz crijeva pčele što kao posljedicu ima glavni simptom a to je izbalegana košnica. Bolesne pčele obično ugibaju izvan košnice zbog iznemoglosti, a zbog nedostatka vidljivih znakova bolest je teško zamjetljiva. Glavni simptom nozemoze vidljiv je ukoliko su pčele zbog lošeg vremena nekoliko dana u košnici. Iz istih razloga naziva ju se „tihan ubojica“. Učinak nozemoze na pčele manifestira se na način da prerano postanu skupljačice, te značajno kraćeg životnog vijeka a zbog patoloških promjena na epitelnim stanicama srednjeg crijeva i poremećaja u procesima probave i metabolizma dolazi do neishranjenosti, te posljedično preranog ugibanja.

Najveće promjene se odvijaju na radilicama u vrijeme intenzivne aktivnosti u prirodi. Oboljele pčele stradaju izvan košnice u prirodi. To dovodi svakako do slabljenja pčelinje zajednice, pri čemu se kod visoko inficirane zajednice primjećuju uginuća, ali za posljedicu nastaju manji prinosi nektara i peludi. Spore *N. ceranae* imaju veliku sposobnost opstanka duže vremena u košnici, ali i u vanjskoj sredini, što doprinosi brzom širenju zaraze unutar košnice i unutar samog pčelinjaka. Spore nozemoze stradaju pri 70°C. Infekcija nozemozom ima negativne posljedice na odraslu populaciju pčela, dok direktnog utjecaja na pčelinje leglo nema. Pčele radilice koje unesu u svoj organizam spore nozemoze, ako su mlađe od jednog tjedna obično ne proizvode matičnu mliječ. Mlade matice koje su unijele spore nozemoze obično su zamijenjene već tijekom prvog mjeseca, a ako nema uvjeta za zamjenu matica, zajednice ostaju bez matice i slabe. Često je smanjen i prinos meda kao i posljedica sporog razvoja legla te općenito pčelinje zajednice.



Slika 7. Spore nozemoze pod mikroskopom

Izvor: Autor

1.3.1. Uzročnici nozemoze

Do sada je opisano oko 1200 vrsta iz roda *Nosema* s pretpostavkom da je to tek manji dio njihovog ukupnog broja. Kod kukaca koji sudjeluju u oprašivanju opisane su samo četiri vrste, a za pčele su najznačajnije dvije vrste, *Nosema apis* (Zander, 1909.) i *Nosema cerana* (Fries, 1996.) kao uzročnici bolesti nozemoze. (Tlak Gajger, 2010.). *Nosema apis* je otkrivena kod europske medonosne pčele i to je bio prvi mikrosporidij koji je opisan. *Nosema ceranae* je izolirana i opisana (Fries, 1996.) iz azijskih medonosnih pčela (*Apis cerana*).

1.3.2. Nozemoza uzrokovana nametnikom *Nosema apis*

Nozemoza je uzrokovana praživotinjom *Nosema apis*. Uzročnik bolesti napada i razara stanice srednjeg crijeva pčele. Oboljela pčela živi kraće, a ugiba u prirodi što pčelar teško primjećuje. Nozemoza je često opisana i kao griža ili zarazni proljev kod pčela što je vidljivo posebice za lošeg vremena kada pčele i po nekoliko dana ne izlaze iz košnice. Uzročnik nozemoze je praživotinja koja napada stanice srednjeg crijeva pčele, tu se brzo razmnožava i tvori spore kojima se bolest širi po ostalim pčelama iz zajednice što može dovesti i do oboljenja cijelog pčelinjaka. One su karakteristična ovalna oblika, duge 5 do 7 mikrometara i široke 3 do 4 mikrometra. Na saću i u prirodi spore ostaju i žive nekoliko mjeseci, ali ih kuhanje u vodi odmah ubija. Raspršene u medu ostaju i žive i do godinu dana. Izvori nozemoze su pojilišta pčela, saće uprljano izmetinama bolesnih pčela i med u koji su dospjele spore. Putovi kojima uzročnik nozemoze ulazi u zdravu pčelinju zajednicu različiti su, najčešći je prirodni, voda koju su zagadile izmetinama pčele bolesne zajednice no također i nestručnim radom pčelara. Bolest se može prenijeti i grabežom. Paraziti koji dospiju u srednje crijevo pčele razaraju nježne stanice i time remete njegovu probavnu funkciju. Ovisno o broju parazita znaci bolesti pojaviti će se prije ili kasnije. Općenito se smatra da je za uspješnu invaziju potrebno više od 100 000 spora (Belčić i Sulimanović, 1982.) Paraziti se u stanicama crijeva razmnožavaju veoma brzo i stvaraju obilje spora koje s izmetinama izlaze iz pčele. Najveći broj spora čak i do 50 milijuna nalazi se u crijevu dva tjedna nakon početka bolesti. Kod pčela koje ne mogu balegati u stražnjem se crijevu zna nakupiti i po više od 100 milijuna spora. Bolesna pčela ne može normalno probavljati hranu, pa osjeća glad. Zbog toga uzima veće količine hrane, ali ta

hrana samo prolazi kroz bolesno crijevo koje ne može obavljati svoju funkciju. Osim probavnih smetnji bolesne pčele imaju slabije razvijene mliječne žlijezde. Zbog toga slabije hrane leglo, pa je i razvoj pčelinje zajednice, posebno u proljeće otežan. Bolest se pogoršava u toku zime kada pčele ne izlijeću iz košnice. U zimske dane, kada nema pročišnih izleta, bolesne pčele balegaju u košnici, što pogoduje naglom širenju bolesti. Bolesne matice također često uginu u toku zime.

1.3.3. Nozemoza uzrokovana nametnikom *Nosema ceranae*

Obzirom na brže odvijanje zarazne vrste smatra se da je *N. ceranae* puno virulentnija i opasnija za europsku medonosnu pčelu. Pojava bolesti uzrokovana s *N. ceranae* je češća u toplijim klimatskim područjima, dok se bolest uzrokovana *N. apis* učestalije javlja u hladnijim klimatskim područjima. Vrsta *N. ceranae* otkrivena je 1909. godine na azijskoj medonosnoj pčeli, a tek je 2006. zabilježen prvi slučaj zaraze europske medonosne pčele kada je laboratorijskom pretragom potvrđen nalaz (Fries, 2006.). Patološki podatci utvrđeni su na pčelinjacima u Španjolskoj.

Patogeneza bolesti se odvija kao i kod invazije nametnikom *N. apis*. Klijanjem spora u šupljini srednjeg crijeva. Unutar stanični razvoj *N. ceranae* u stanicama srednjeg crijeva odvija se na sličan način kao i razvoj *N. apis* (Fries i sur., 1996.; Higes i sur., 2006.; Chen i sur., 2009.). Velik broj epitelnih stanica crijeva ispunjenih sporama nametnika upućuje na samozaražavanje i brz razvoj *N. ceranae* u organizmu europske medonosne pčele, što ukazuje na visok patogen potencijal i virulenciju (Higes i sur., 2006.).

Osim što je *N. ceranae* praktički preskočila zapreku domaćina, te s azijske medonosne pčele prešla i prilagodila se na europsku medonosnu pčelu, utvrđeno je da je došlo i do promjene tropizma uzročnika u odnosu na *N. apis*. vrsta *N. ceranae* ne zadržava se samo na epitelnim stanicama srednjeg crijeva, već invadira i druge organe i tkiva pčele, poput malpigijevih cjevčica, masnog tkiva i žljezdanog tkiva (Chen i sur., 2009.). Zasad poznati degenerativni patološki procesi uključuju upale crijevne stjenke koje dovode do smanjene apsorpcije hranjivih tvari iz unesene hrane. Invadirane stanice propadaju, a time se smanjuje funkcija

lučenja probavnih enzima. U takvim slučajevima pčele gladuju, smanjuju se rezerve bjelančevina i masnog tkiva, te koncentracija masnih kiselina u hemolimfi. Također, dolazi do poremećaja u razvoju mliječnih žlijezda mladih pčela koje zbog nedostatka bjelančevina, odnosno resorbiranih aminokiselina, ne mogu proizvesti dovoljno matične mliječi koja predstavlja osnovnu hranu za leglo i maticu. To za posljedicu ima manje zatvorenog legla i pojavu kanibalizma dok se životni vijek pčela smanjuje čak do 78 % (Plavša, 2006.).



Slika 8. Okviri i pogača uprljani izmetom pčela

Izvor: <https://www.agroklub.rs/pcelarstvo/nozemoza-neprijatelj-pcelinjaka/19724/>

1.4. Nozemoza i sindrom nestanka pčelinjih zajednica

Sindrom nestanka pčelinjih zajednica (engl. Colony collapse disorder - CCD) je fenomen koji se u proteklih nekoliko godina pojavio u pčelarstvu SAD-a, a zatim i u ostalim dijelovima svijeta. Karakterizira ga iznenadna smrt pčelinje zajednice uz nestanak odraslih pčela u košnici i ispred nje. U napuštenim košnicama obično se nalaze dovoljne zalihe meda i peludi, prisutnost zatvorenih stanica legla u košnici i malo ili ni malo mrtvih pčela na podnici. U nekim slučajevima u zajednici se može naći matica i mali broj preživjelih pčela. Karakterističan fenomen je da grabež u ovim društvima nastaje kasno, čak i prisutnost štetočina (voskova moljca) se rijetko sreće. Uzroci ovog sindroma vjerojatno su povezani i posljedica su sinergijskog djelovanja različitih bolesti pčela, nedostatka kvalitetne hrane, intenzivna biljna proizvodnja i uporaba insekticida, prisutnost GMO biljaka te loša pčelarska praksa.

2. MATERIJAL I METODE

U svrhu pisanja završnog rada provedeno je istraživanje na terenu, te laboratorijska pretraga pčela na prisutnost spora nozemoze. U svrhu istraživanja skupljeni su uzorci radilica i matica od tri generacije oplodnjaka. Tri generacije oplodnjaka odnosi se na oplodnjake koji othranjuju prvu maticu, odnosno drugu i treću. Prilikom uzorkovanja iz svakog oplodnjaka skupljeno je 20 pčela radilica i jedna matica koje su podvrgnute laboratorijskoj pretrazi (slika 9). Od svake generacije skupljeno je 15 uzoraka što je ukupno 45 uzoraka.



Slika 9. Uzorak pčela sa maticom

Izvor: Autor

2.1. Laboratorijska pretraga

Nakon prikupljanja uzoraka na terenu uzorci su pohranjeni u ledenicu na duboko smrzavanje do dana provođenja laboratorijske pretrage. Posebno su istraživane matice, a posebno radilice. Prvi korak u laboratorijskoj pretrazi bio je odvajanje zadka svake pojedine pčele, a posebno matice (slika 10, slika 11 i slika 12).



Slika 10. Odvajanje zadka radilica i matice

Izvor: Autor



Slika 11. Zadak matice odvojen za pretragu

Izvor: Autor



Slika 12. Zadcji pčela nakon odvajanja

Izvor: Autor

Drugi korak u laboratorijskoj pretrazi je dodavanje 0,5 mL destilirane vode po pčeli u tarionik s tučkom odnosno 10 mL sveukupno. Odvojeni zadci su zgnječeni kako bi sadržaj crijeva izašao te se uzorak promiješao kako bi se dobio što bolji uzorak za gledanje pod mikroskopom (slika 13). Uzorak se zatim uzima pipetom te se jedna kap stavlja na hemacitometar te pokriva pokrovnim stakalcem za mikroskopiranje. Hemacitometar se sastoji od 25 pravilno raspoređenih kvadrata pomoću kojih se pod svjetlosnim mikroskopom i povećanjem od 400 puta broje spore na ukupno pet kvadrata. Ukupni broj spora izračunat je na način da se ukupan broj spora utvrđen na pet analiziranih kvadrata pomnoži s 50 000.



Slika 13. Priprema mikroskopskog preparata

Izvor: Autor

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Broj spora kod radilica

U ovom istraživanju utvrđen je prosječan broj spora kod radilica od 5,48 miliona (tablica 2) s rasponom od 0 do 20,4 milijuna, dok je srednja vrijednost bila u rasponu od 2,89 do 8,29. Iako postoji dio uzoraka u kojima nije utvrđena prisutnost niti jedne spore, kod skoro polovice uzoraka utvrđeno je 2 i više milijuna spora (grafikon 1). U istraživanju Tlak Gajger i sur. (2009.) utvrđeno je prosječno 12,625 milijuna, spora po pčeli što je 2,3 puta više spora u odnosu na provedeno istraživanje u svrhu završnog rada. Istraživanje provedeno u 6 Talijanskih regija s uzorcima pčela iz košnica koje nisu pokazivale simptome zaraze nozemozom, nakon mikroskopske pretrage pčela pronađeno je od 125 000 do 4 milijuna spora po pčeli što ukazuje na opasnost ove bolesti i teškog otkrivanja (Papini i sur., 2017.)

Tablica 2. Deskriptivna statistika za prosječan broj spora (x milijun) kod radilica u tri različite skupine.

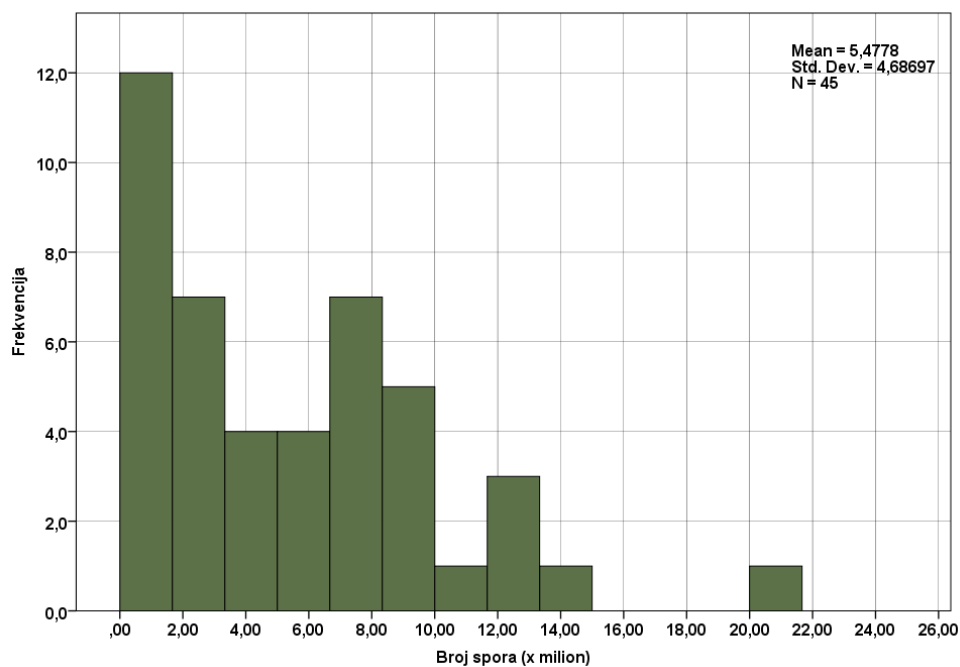
Skupina	N	Srednja vrijednost	SD	Medijan	95% Interval pouzdanosti		Minimum	Maksimum
					Donja granica	Gornja granica		
1	15	5,25	3,29	6,05	3,43	7,07	1,10	12,55
2	15	2,89	4,25	1,00	0,54	5,24	0,00	13,40
3	15	8,29	4,95	7,90	5,55	11,03	0,00	20,40
Total	45	5,48	4,69	4,70	4,07	6,89	0,00	20,40

Utvrđena je statistički značajna razlike između skupina (ANOVA, $F(2,42) = 6,174$, $p = 0,004$, tablica 3). U skupini 2 utvrđen je značajno veći broj spora nego u skupini 3 (grafikon 2). Prilikom provođenja istraživanja očekivani najveći broj spora bio je u trećoj skupini a najmanji u prvoj skupini. Istraživanje je pokazalo kako je najmanji broj spora ipak bio u drugoj skupini, što može biti uzrokovano time da se u vrijeme prikupljanja uzoraka u drugoj

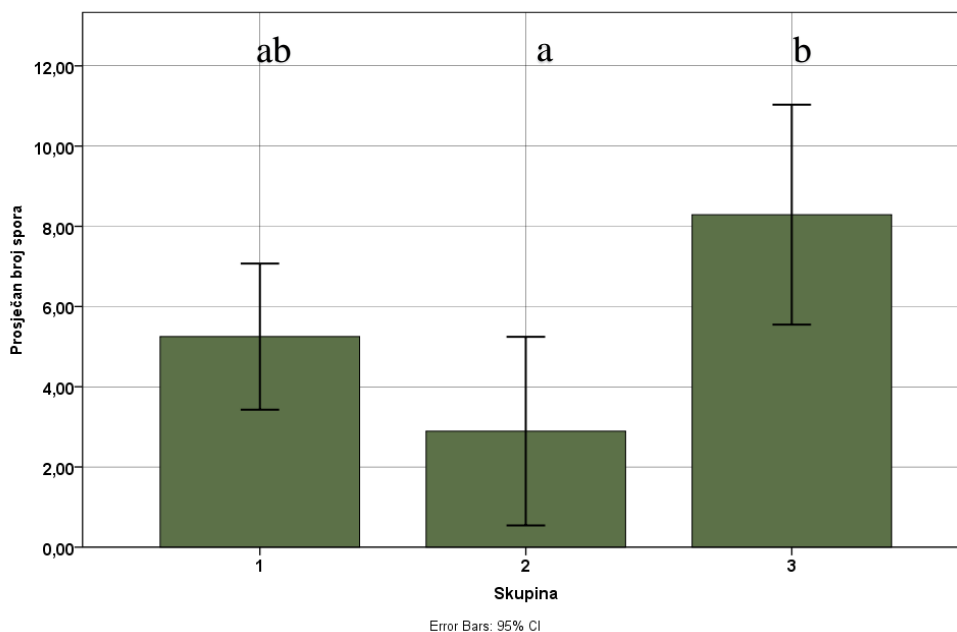
skupini nalazio značajan broj mladih tek izlegnutih pčela. U trećoj skupini utvrđen je najveći broj spora što je bilo i očekivano. Važno je napomenuti da su uzorci za pretragu uzimani iz oplodnjaka za proizvodnju matica koji su značajno manje površine od klasične košnice. Može se zaključiti da zbog malog životnog prostora pčela odnosno oplodnjaka dolazi do bržeg širenja zaraznih bolesti, u ovom slučaju spora nozemoze.

Tablica 3. Analiza varijance za prosječan broj spora utvrđenih kod radilica.

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	df	Sredina kvadrata	F	Sig.
Između skupina	219,597	2	109,799	6,174	0,004
Unutar skupina	746,980	42	17,785		
Ukupno	966,578	44			



Grafikon 1. Frekvencija broja uzoraka prema broju utvrđenih spora nozemoze



Grafikon 2. Prosječan broj spora (x milijun) kod 3. skupine. Različito slovo predstavlja statistički značajnu razliku između skupina (LSD, $p < 0,05$)

3.2. Matice

Prosječan broj utvrđenih spora kod uzoraka matice očekivano je bio puno manji te je prosječno iznosio 0,06 milijuna (tablica 4). Najveći utvrđen broj spora bio je 600.000 u uzorku iz skupine 3. Najveći broj uzoraka bio je negativan na nozemozu (grafikon 3) međutim utvrđena je prisutnost barem jedne spore kod 7 uzoraka iz skupine 1, 3 uzorka iz skupine 2 i 9 uzoraka iz skupine 3. U istraživanju Higes i sur. (2009.), kojem je glavni cilj bio dokazati povezanost zaraze pčela radilica sa zarazom matice dokazano je da 4 od 5 matice već nakon 21 dan ugibaju od bolesti. Također, utvrđeno je kako matica znatno manje nese jaja što se odražava na broj radilica i slabljenje zajednice. Broj spora kod zaraženih pčela u tom istraživanju bio je 22,58 milijuna dok se kod matice nakon 21 dan moglo pronaći 17,6 milijuna spora, što je znatno više nego u ovom istraživanju.

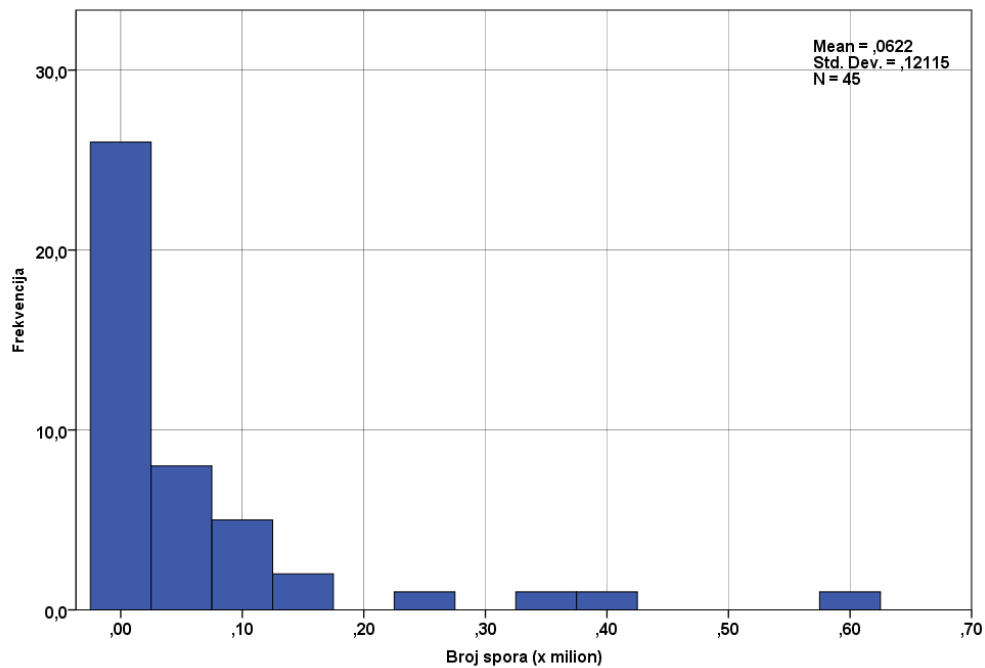
Tablica 4. Deskriptivna statistika za prosječan broj spora (x milijun) kod matrica u tri različite skupine.

Skupina	N	Srednja vrijednost	SD	Medijan	95% Interval pouzdanosti		Minimum	Maksimum
					Donja granica	Donja granica		
1	15	0,08	0,12	0,00	0,01	0,14	0,00	0,40
2	15	0,01	0,02	0,00	-0,001	0,02	0,00	0,05
3	15	0,10	0,16	0,05	0,01	0,19	0,00	0,60
Total	45	0,06	0,12	0,00	0,03	0,09	0,00	0,60

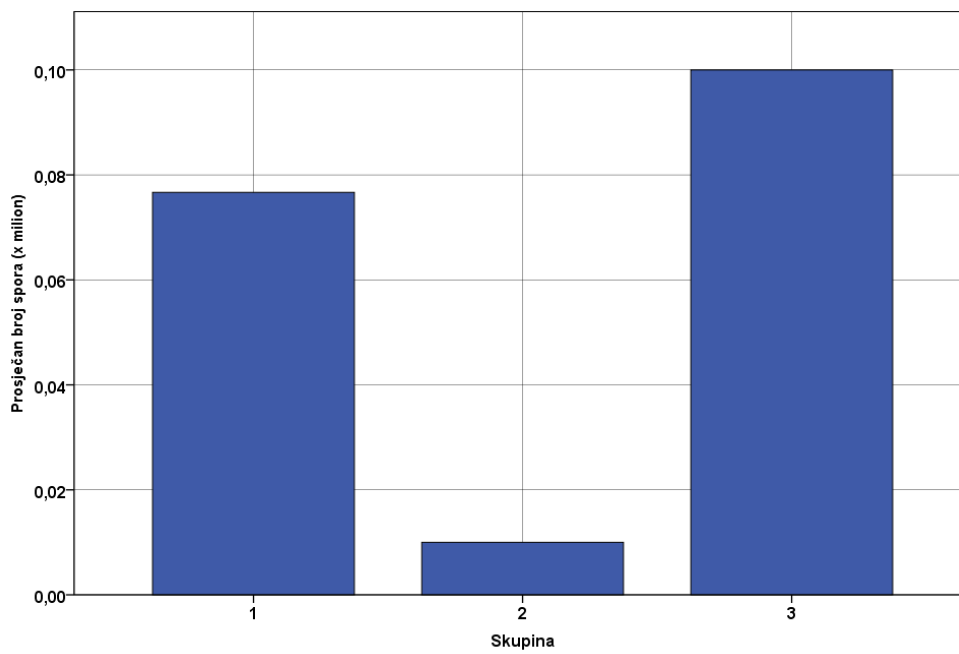
Iako su skupine 1 i 3 imale veći broj spora u usporedbi sa skupinom 2 (grafikon 4), između skupina nije bilo značajnih razlika (ANOVA, $F(2, 42) = 2,368$, $p = 0,106$, tablica 5)

Tablica 5. Analiza varijance za prosječan broj spora utvrđenih kod matrica.

Izvor varijabilnosti	Suma kvadrata	df	Sredina kvadrata	F	Sig.
Između skupina	0,065	2	0,033	2,368	0,106
Unutar skupina	0,580	42	0,014		
Ukupno	0,646	44			



Grafikon 3. Frekvencija broja uzoraka prema broju utvrđenih spora nozemoze



Grafikon 4. Prosječan broj spora (x milion) kod 3. skupine.

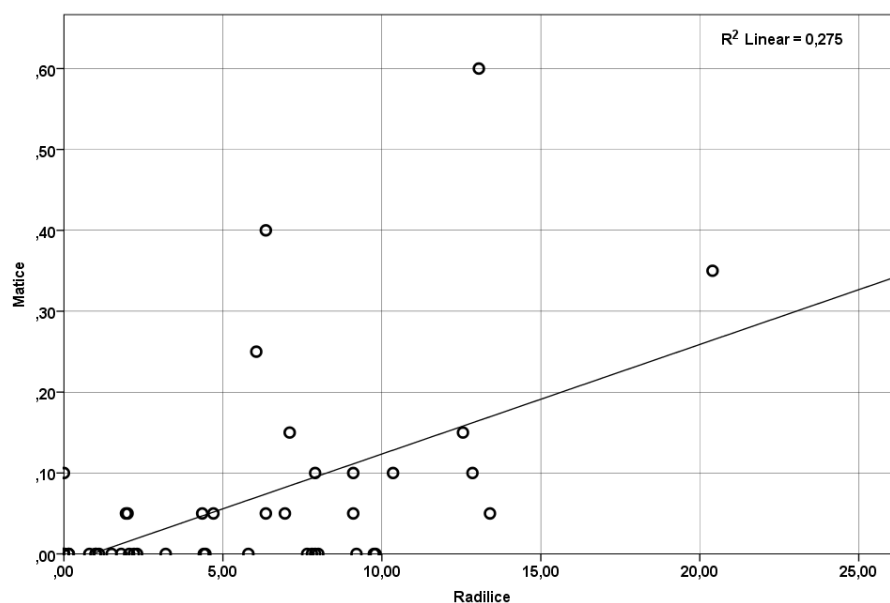
3.3. Korelacije

Analizirajući korelacije između broja utvrđenih spora nozemoze radilica i matice istog uzorka, pronađena je značajna pozitivna korelacija ($r = 0,495$, $p < 0,001$) između dva uzorka (tablica 6, grafikon 5). Matica također može biti nosilac zaraze te vrlo dobar prijenosnik iz razloga što matica balega u košnici. Matica se obično zarazi u prvih 7 dana života, no moguć izvor zaraze su i prilike kada matica konzumira med, obično u vrijeme rojenja. Matica koja je zaražena osim što je prijenosnik bolesti počinje nesti sve manje jaja te pravi nepravilno zanesene okvire što pčele primjećuju te obično nakon toga dolazi do tihe izmjene matice. Pčele uklupčaju staru maticu te započinju s othranom buduće matice.

Tablica 6. Spearmanov koeficijent korelacije za broj spora utvrđenih kod radilica i matice.

	Radilice	Correlation Coefficient	Matice
Spearman's rho			0,495**
		Sig. (2-tailed)	0,001
		N	45

Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).**



Grafikon 5. Prosječan broj spora (x milijun) kod radilica (x os) i matice (y os) istog uzorka.

4. ZAKLJUČAK

Medonosne pčele žive u pčelinjim zajednicama funkcionirajući unutar grupe, čineći zajednicu koja se sastoji od: pčela radilica, trutova i matice. Sve tri strukture čine pčelinju zajednicu u kojoj svaki od njih ima zasebnu funkciju. Naime, na njih djeluju i negativni čimbenici kao i na svaku poljoprivrednu granu. Najveći negativni čimbenici su zarazne bolesti. Iz tog razloga, ukoliko jedna od pčela oboli od neke zarazne bolesti, postoji velika mogućnost prenošenja iste na ostale pčele unutar zajednice. Nozemoza je nametnička bolest koja zahvaća odrasle pčele. Radi se o kozmopolitski rasprostranjenoj bolesti, prisutnoj u tropskim i suptropskim područjima u kojima ni ne predstavlja veći problem, do umjerenih područja promjenjive klime u kojima čini oštećenja na pčelinoj zajednici. Ova bolest uzrokovana je dvjema vrstama jednostaničnih, obligatnih unutarstaničnih parazita, *Nosema apis* i *Nosema ceranae*, koji se razmnožavaju stvaranjem spora. Posljedično bolesti, pčele prerano postaju sakupljačice te doprinosi patološkim promjenama na epitelnim stanicama srednjeg crijeva remeteći tako probavu i metabolizam, što kao posljedicu ima neishranjenost pčela te prerano ugibanje. Pčele također mogu zarazu prenijeti matici ali matica također može biti izvor zaraze. Iz provedenog istraživanja moguće je vidjeti kako postoji povezanost između broja spora u radilicama te broja spora u matici te značajan broj spora kod radilica u oplodnjacima, posebice kada se duže nalaze na oplodnoj stanici.

5. LITERATURA

1. Belčić J., Sulimanović Đ. (1982.) Zlatna knjiga pčelarstva, Nakladni zavod Matice Hrvatske, Zagreb, 320.
2. Chen, Y. P., Evans, J. D., Murphy, C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen – Rindal, D., Pettis, J. S. (2009.): Microphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. J. Eukar. Microbiol. 56, 142 – 147.
3. Fries, I., Feng F., Silva, A. D., Slemenda, S. B., Pieniazek, N. J. (1996.): *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of amicrosporidian parasite of the Asian honey bee *Apis ceranea* (Hymenoptera, Apidae). Eur. J. Protistology. 32, 356-365.
4. Higes, M., Martin, R., Meana, A. (2006.): *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honey bee in Europe. Journal Invertebrate Pathology 92, 93-95.
5. Higes M., Martin-Hernandez R., Garcia-Palencia P., Marin P., Meana A. (2009.): Horizontal transmission of *Nosema ceranae* (Microsporidia) from worker honeybees to queens (*Apis mellifera*). Environmental Microbiology Reports 1(6), 495–498.
6. Kovačić M., Utjecaj selekcije na osobine medonosne pčele (*Apis mellifera carnica*) na području Hrvatske, Doktorska disertacija, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek 2018.
7. Papini R., Mancianti F., Canovai R., Cosci F., Rocchigiani G., Giovanni Benelli G., Canale A., (2017.): Prevalence of the microsporidian *Nosema ceranae* in honeybee (*Apis mellifera*) apiaries in Central Italy. Saudi Journal of Biological Sciences, 24(5), 970-982
8. Plavša, N., Vidić, B., Đuričić, B. (2006.): Nozemoza - tihi ubica pčelinjih društava (Nosemosis Silent killer of bee colony). Zbornik radova i kratkih sadržaja, 18. Savetovanje veterinara Srbije, Zlatibor, Beograd, 118-119.
9. Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B., (2010.): Biology and control of *Varroa destructor*. Journal of Invertebrate Pathology 103, S96–S119
10. Tlak Gajger, I., Vugrek, O., Petrincec, Z., Grilec, D., Tomljanović, Z. (2010.): Detection of *Nosema ceranae* in honey bees from Croatia. Journal of Apicultural Research, 49(4), 340-341.

11. Tlak Gajger, I. (2017.): Prepoznavanje bolesti medonosne pčele, Hrvatski pčelarski savez, Zagreb
http://www.veterinarstvo.hr/UserDocsImages/Zdravlje_zivotinja/p%C4%8Dele%20i%20bumbari/BRO%C5%A0URA%20O%20P%C4%8CELINJIM%20BOLESTIMA.PDF
(20.05.2020.)
12. AGROKLUB: Kako suzbiti nozemozu pčela?, 27. listopada 2019. godine
<https://www.agroklub.rs/pcelarstvo/kako-suzbiti-nozemozu-pcela/54803/> (20.5.2020.)
13. AGROKLUB: Nozemoza, neprijatelj pčelinjaka!, 11. kolovoza 2015. godine
<https://www.agroklub.rs/pcelarstvo/nozemoza-neprijatelj-pcelinjaka/19724/> (18.5.2020.)