

Prisustnost spora nozemoze (*Nosema* sp.) u zajednicama medonosne pčele (*Apis mellifera*) na kraju razdoblja zimovanja

Jurman, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:617923>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-27**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Laura Jurman, apsolvant

Sveučilišni diplomski studij Lovstvo i pčelarstvo

**PRISUTNOST SPORA NOZEMOZE (*Nosema sp.*) U
ZAJEDNICAMA MEDONOSNE PČELE (*Apis mellifera*) NA
KRAJU RAZDOBLJA ZIMOVANJA**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Laura Jurman, apsolvant

Sveučilišni diplomski studij Lovstvo i pčelarstvo

**PRISUTNOST SPORA NOZEMOZE (*Nosema sp.*) U
ZAJEDNICAMA MEDONOSNE PČELE (*Apis mellifera*) NA
KRAJU RAZDOBLJA ZIMOVANJA**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

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

Osijek, 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Građa pčela	3
2.1.1. Probavni sustav	4
2.2. Bolesti pčela.....	4
2.2.1. Čimbenici koji utječu na pojavu bolesti pčela	4
2.2.2. Klasifikacija bolesti medonosne pčele	7
2.2.3. Nozemoza.....	7
2.3. Prezimljavanje pčelinjih zajednica	12
2.3.1. Pročisni letovi.....	13
3. MATERIJAL I METODE	14
4. REZULTATI	18
5. RASPRAVA.....	23
6. ZAKLJUČAK.....	25
7. POPIS LITERATURE.....	26
8. SAŽETAK	28
9. SUMMARY	29
10. POPIS TABLICA	30
11. POPIS SLIKA	31
12. POPIS GRAFIKONA.....	32
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

Medonosna pčela (*Apis mellifera*) ima vrlo kompleksnu građu. Čine ju unutarnji i vanjski sustavi. Vanjske sustave čine kožni sustav i ekstremiteti. Unutarnje sustave čine dišni, krvožilni, spolni, probavni, žljezdani i osjetilni sustav (Tucak i sur., 2005.).

Nozemoza je bolest čiji su uzročnici mikrosporidiji iz roda *Nosema spp.* koja se razvija u probavnom sustavu pčele. Probavni sustav sastoji se od usnog aparata i crijeva. Crijeva se dijele na prednje, srednje i zadnje. Nakon što spore uđu u probavni sustav pčele, razmnožavaju se brzo i prodiru u stanice probavnog sustava (FAO, 2020.). Ulaze u epitelne stanice srednjeg crijeva i tamo se razmnožavaju. Napadnute stanice propadaju, a spore ulaze u crijeva odakle odlaze u nove crijevne stanice.

Nozemozu uzrokuju dvije vrste gljivica, a to su *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Simptomi bolesti razlikuju se s obzirom na vrstu gljivica kojima je zajednica zaražena. Simptomi bolesti uzrokovane *Nosemom apis* su crijevni poremećaj odnosno proljev koji se može uočiti na podnici, letu i saću, kod pčela sakupljačica smanjuje se letačka aktivnost, pčele slabije proizvode matičnu mliječ. Ako je matica bolesna smanjuje polaganje jaja, pčele koje nisu u stanju letjeti hodaju s raširenim krilima i paralizirane su, mogu se naći mrtve pčele natečenog zatka i nogu uvučenih ispod prsa. Nozemoza uzrokovana *Nosemom ceranae* ima nešto drugačije simptome.

S obzirom da je bolest relativno nova, simptomi se još istražuju. Smatralo se kako bolest napada samo azijsku medonosnu pčelu (*Apis cerana*) no pronađena je na europskoj medonosnoj pčeli (*Apis mellifera*) 2005. godine u Španjolskoj (Higes i sur., 2006.). Za bolest je tipična odsutnost proljeva i te pčele ugibaju dalje od košnice što uzrokuje smanjen broj pčela u košnici koji se teže primjećuje. Nozemoza se može kontrolirati usvajanjem dobre pčelarske prakse i biotehničkim mjerama.

Dobra priprema zajednica za zimovanje ključna je u suzbijanju bolesti. Zdrave pčele za vrijeme zimskog razdoblja zadržavaju neprobavljenu hranu u rektumu. U slučaju zaraze nozemozom, za vrijeme zimovanja pčele će prazniti neprobavljenu hranu iz crijeva u košnicu. Takav izmet je tekuć, ljepljiv i sladak što privlači druge pčele. Na taj način zaraza nozemozom se brzo širi jer pčele nisu u mogućnosti ići na proćisne letove i dolazi do zaraze zdravih pčela.

Pčele zaražene nozemozom imaju poremećenu probavnu funkciju i pojačanu osjetljivost što omogućava razvoj drugih bolesti, posebice virusnih (Sulimanović i sur., 1995.). Bolest je izraženija kod pčela radilica jer su one uključene u čišćenje saća. Wang i Moeller (1970.) su utvrdili kako bolesne pčele ne prilaze i ne hrane maticu i nisu u mogućnosti proizvoditi matičnu mliječ. Na razvoj bolesti također utječu vanjski čimbenici kao što su vrijeme, stres, opće stanje zajednice i slično.

Istraživanje za pisanje diplomskog rada provedeno je na 19 pčelinjaka na području Osijeka i Siska. Cilj istraživanja bio je utvrditi broj spora *Nosema spp.* u pčelinjim zajednicama nakon razdoblja zimovanja.

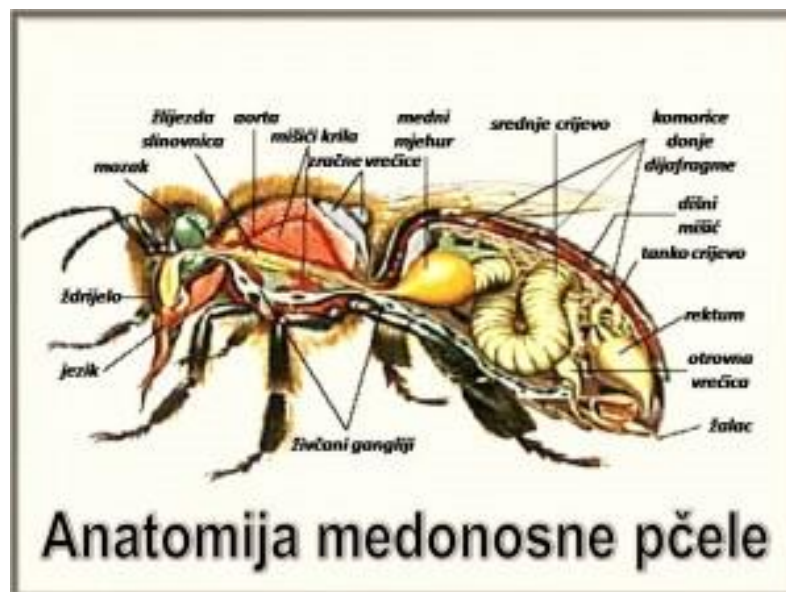
2. PREGLED LITERATURE

2.1. Građa pčela

Građa pčela je izuzetno složena. Čine ju vanjski i unutarnji sustavi tijela (Slika 1.). Vanjske sustave čine kožni sustav i ekstremiteti odnosno krila i noge.

Unutarnje sustave čine:

- dišni sustav
- krvožilni sustav
- spolni sustav
- probavni sustav
- žljezdani sustav
- osjetilni sustav



Slika 1. Anatomija pčele

Izvor: <http://draca.hr/pcele-2/anatomija-pcele/>

2.1.1. Probavni sustav

Probavni sustav pčela čine različiti organi i žlijezde. Imaju funkciju prerade hrane i omogućiti organizmu energiju za funkcioniranje svih sustava.

Probavni sustav sastoji se od:

- usnog aparata
- probavnih crijeva: prednje crijevo, srednje crijevo i zadnje crijevo

Usni aparat se nalazi pri dnu glave. Oblikovan je i prilagođen za srkanje i lizanje. Sastoji se od prednjeg dijela koji čine prednja usna i prednje vilice i stražnjeg dijela koji čine donja usna, donja čeljust i rilce. Prednje crijevo sastoji se od ždrijela, jednjaka i mednog mjehura. Ždrijelo je širok kanal koji se sužava prema jednjaku. Prožet je mišićima. Jednjak je uska cijev koja se nastavlja na ždrijelo i prelazi u medni mjehur. Ždrijelo, jednjak i medni mjehur su jednako građeni i stvaraju jednu cjelinu. Kao cjelina imaju funkciju dovođenja hrane. Srednje crijevo ima oblik valjkaste cijevi i ima najvažniju funkciju probavnog sustava. U srednjem crijevu vrši se probava, membrana srednjeg crijeva propušta probavne sokove do hrane i probavljenu hranu stijenci crijeva kako bi se ona apsorbirala. Neprobavljeni ostaci hrane peristaltikom crijeva odlaze do zadnjeg crijeva. Zadnje crijevo sastoji se od tankog crijeva i rektuma i ima odvodnu ulogu. Zdrave pčele nikada ne izbacuju izmet u košnici. Kada klimatski uvjeti ne dozvoljavaju izlijetanje iz košnice, pčele izmet zadržavaju u rektumu. Za vrijeme dugih i hladnih zima, pčele nisu u mogućnosti izlijetati iz košnice te ukoliko su bolesne počinju defecirati po košnici. To može prouzročiti širenje bolesti poput nozemoze (Tucak i sur., 2005.).

2.2. Bolesti pčela

2.2.1. Čimbenici koji utječu na pojavu bolesti pčela

Medonosne pčele osjetljive su na bolesti različitih uzročnika. Čimbenici koji utječu na pojavu bolesti kod pčela su genetski, patogeni organizmi i okoliš. Otpornost zajednice pčela ovisi o genetskom naslijeđu matice stoga se razlikuje od zajednice do zajednice. Patogeni organizmi koji uzrokuju bolesti pčela su virusi, bakterije, gljivice ili protozoe. O kvantiteti i

sposobnosti širenja patogena ovisi širenje bolesti u košnici. Asimptomatski stadij bolesti je stadij u kojem nema vidljivih simptoma iako je patogen prisutan u zajednici. Simptomatski stadij je stadij bolesti u kojem simptomi određene bolesti postaju vidljivi. Bolest prelazi u simptomatski stadij pod određenim uvjetima kao što su porast broja patogena, pad imuniteta pčela zbog druge bolesti, kemikalije ili pesticidi, stres vezan uz prehranu, nagle promjene temperature i slično. Na prisutnost bolesti također utječe i okoliš koji često zna biti ključan okidač. Glavni okolišni stresori su temperatura, relativna vlažnost zraka i dostupnost medonosnog bilja (FAO, 2020.). U sljedećim tablicama prikazane su glavne bolesti pčela razvrstane prema vrsti patogena (Tablica 1.) i glavne bolesti legla (Tablica 2.)

Tablica 1. Glavne bolesti pčela razvrstane prema vrsti patogena

Bolest	Uzročnik	Tip
Akaroza	<i>Acarapias woodi</i>	Parazit
Etinioza	<i>Aethina tumida</i>	Parazit
Tropileloza	<i>Tropilaelaps spp.</i>	Parazit
Varooza	<i>Varroa destructor</i>	Parazit
Američka gnjiloća	<i>Paenibacillus larvae</i>	Bakterija
Europska gnjiloća	<i>Milissococcus pluton</i>	Bakterija
Vapnenasto leglo	<i>Ascophera apis</i>	Gljivica
Kameno leglo	<i>Aspergillus flavus</i>	Gljivica
Nozemoza	<i>Nosema apis</i> <i>Nosema ceranae</i>	Gljivica
Amebijaza	<i>Malpighamoeba mellificae</i>	Protozoa
Virus akutne pčelinje paralize	<i>Dicistroviridae</i>	Virus
Virus crnih matičnjaka	<i>Dicistroviridae</i>	Virus
Virus kronične pčelinje paralize	<i>Cripaviridae</i>	Virus
Virus deformiranih krila	<i>Iflaviridae</i>	Virus
Apis iridescent virus	<i>Dicistroviridae</i>	Virus
Izraelska akutna pčelinja paraliza	<i>Dicistroviridae</i>	Virus
Kakugo virus	<i>Iflaviridae</i>	Virus
Kašmirski virus pčela	<i>Dicistroviridae</i>	Virus
Virus mještinastog legla	<i>Virus picorn</i>	Virus
Virus prstena duhana	<i>Secoviridae</i>	Virus

Izvor: FAO, 2020.

Tablica 2. Glavne bolesti legla

Glavne bolesti legla
Varooza
Etinioza
Tropileloza
Američka gnjiloća
Europska gnjiloća
Vapnenasto leglo
Kamenito leglo
Virus crnih matičnjaka
Virus mješinastog legla
Druge viroze

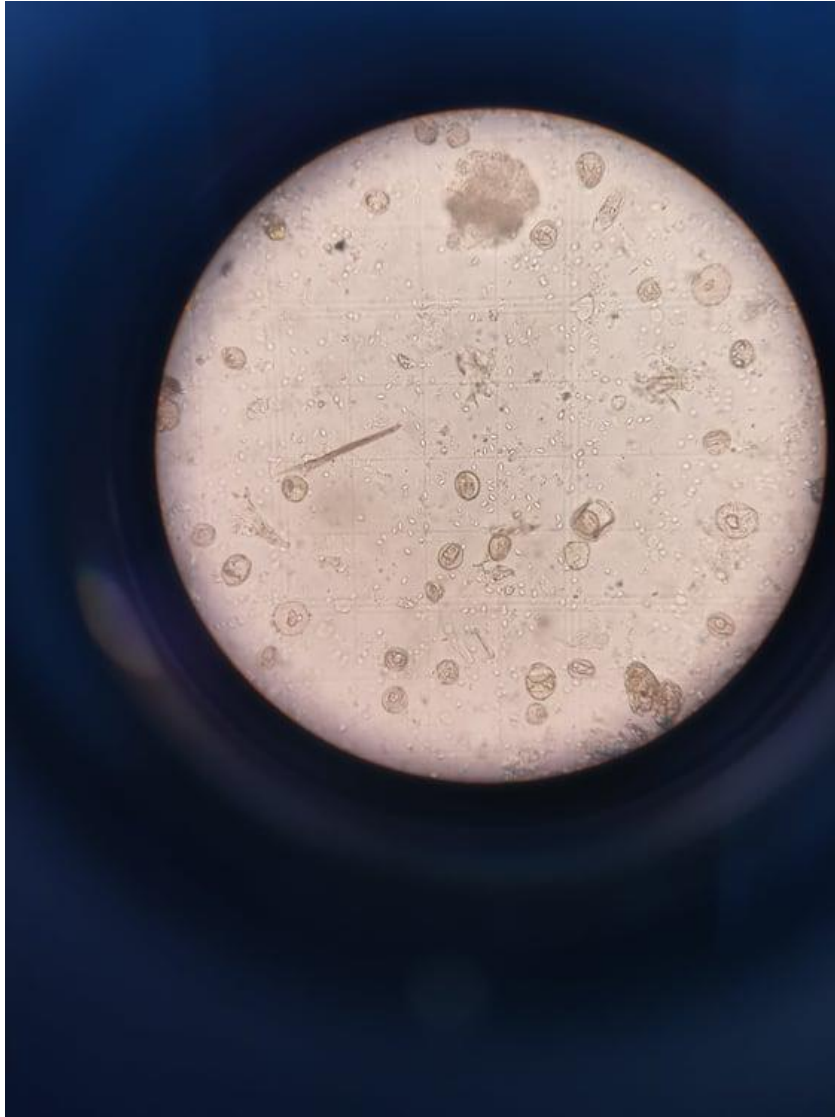
Izvor: FAO, 2020.

2.2.2. Klasifikacija bolesti medonosne pčele

Bolesti pčela mogu se klasificirati prema tipu bolesti i prema funkciji jedinki koje su pogođene u košnici. S obzirom na tip patogena, bolesti mogu biti parazitske, gljivične, bakterijske ili virusne. Prema funkciji jedinki koje su pogođene u košnici bolesti dijelimo na bolesti legla i bolesti odraslih pčela. Glavne bolesti odraslih pčela su varooza, nozemoza i viroze, a glavne bolesti legla su varooza, etinioza, tropileloza, američka gnjiloća, europska gnjiloća, vapnenasto leglo, kameno leglo, virus crnih matičnjaka, virus mješinastog legla i druge viroze.

2.2.3. Nozemoza

Nozemoza je bolest odraslih pčela koju uzrokuju dvije različite vrste gljivica: *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Simptomi bolesti razlikuju se s obzirom na vrstu gljivica kojima je leglo zaraženo. Na slici 2. prikazane su gljivice *Nosema spp.* pod mikroskopom na povećanju x400.



Slika 2. *Nosema spp.* pod svjetlosnim mikroskopom

Izvor: Autor, 2021.

2.2.3.1. *Nosema apis*

Nosema apis uzrokuje „klasični“ oblik bolesti. Simptomi bolesti su crijevni poremećaj odnosno proljev koji se može uočiti na podnici, letu i saću (Slika 3.) Kod pčela sakupljačica smanjuje se letačka aktivnost, pčele ne proizvode matičnu mliječ, ako je matica bolesna paralizirane su, mogu se naći mrtve pčele natečenog zatka i nogu uvučenih ispod prsa. Nakon što spore uđu u probavni sustav pčele, razmnožavaju se brzo i prodiru u stanice probavnog sustava (FAO, 2020.). Ulaze u epitelne stanice srednjeg crijeva i tamo se razmnožavaju. Napadnute stanice propadaju, a spore ulaze u crijeva odakle odlaze u nove crijevne stanice.

Najveći broj spora razmnožava se 8 do 10 dana nakon ulaska u organizam, u tom periodu napadnute su gotovo sve stanice srednjeg crijeva (Tucak i sur., 2005.). Veliki broj spora završava u izmetu pčela. Bolest se uglavnom ne širi direktno na novu generaciju pčela nego mlade pčele unesu u organizam spore čisteći zaraženo saće. Bolest se lakše pojavljuje u proljeće, a može se pojaviti i zimi u košnicama koje su u lošijem stanju. (FAO, 2020.)



Slika 3. Izmet na ulazu u košnicu koji je uzrokovan *Nosemom apis*

Izvor: <https://apiproduct.eu/wp-content/uploads/2020/03/dizenterija.jpg>

2.2.3.2. *Nosema ceranae*

Gljivica *Nosema ceranae* prenosi se na isti način kao i *Nosema apis*. Spore su vrlo otporne i podnose ekstremno niske i visoke temperature što znači da se bolest vraća vrlo lako i nakon nekoliko godina. *Nosema ceranae* prvi puta izolirao je Ingemar Fries 1996. godine, a u Europi je prvi puta utvrđena 2005. godine u Španjolskoj (Higes i sur., 2006.). S obzirom da je bolest relativno nova, simptomi se još istražuju. Za bolest je tipična odsutnost proljeva, a radilice ugibaju dalje od košnice što može uzrokovati da se smanjeni broj pčela u košnici teže primjećuje. Može se širiti sa zajednice na zajednicu letom zaraženih radilica i trutova,

zalijetanjem trutova, pljačkom zaraženih zajednica (grabež), premještanjem zaraženih okvira, prihranom kontaminiranim medom i korištenjem zaraženih alata ili opreme (FAO, 2020.).

2.2.3.3. Građa spore *Nosema spp.* i mehanizam ulaska spore

Spore su veličine 6 x 3 µm i ovalnog štapićastog oblika. Obavijene su debelom ovojnicom koja okružuje sporoplazmu. U unutrašnjosti se nalazi dvostruka jezgra oko koje su namotaji šupljeg polarnog filameta. Ulaskom u crijeva spore se prijanjajućom pločom „zalijepe“ za epitelnu stanicu. Kemijskim podražajima, izbacivanjem polarnog filameta i probijanjem stijenke ulaze u epitelne stanice srednjeg crijeva. Spore *Nosema ceranae* slične su građom, ali nešto manje 3,9-5,3 µm. Promatranjem tkiva srednjeg crijeva utvrđeno je kako se zrele spore također oslobađaju u lumen crijeva (Chen i sur., 2009.).

2.2.3.4. Prevencija nozemoze

Nozemoza se može kontrolirati usvajanjem dobre pčelarske prakse i biotehničkim mjerama (Tablica 3.). Kako bi se smanjio rizik od širenja zaraze potrebno je odabrati matice od provjerenog uzgajivača, selekcijom uzgajati pčele koje su otporne na nozemozu, analizirati uzorke pčela u ranu jesen i proljeće, kada je razina zaraženosti visoka (više od 100 000 spora po pčeli) zajednicu je potrebno tretirati dostupnim i dopuštenim proizvodima namijenjenim za tretiranje *Nosema spp.* (FAO, 2020.). U uginulim pčelama i fekalijama spore mogu preživjeti do 6. godina, a na tlu i saću do 2 godine. Ubija ih temperatura od 60 °C kao i vodena para za oko 10 minuta (Laktić i sur., 2008.)

Tablica 3. Dobra pčelarska praksa za prevenciju i suzbijanje nozemoze

PREPORUKA	ŠTO TIME POSTIŽEMO?
Odaberati primjereno mjesto za pčelinjak (ne vlažno, ne izloženo hladnim vjetrovima), orijentirati košnice po mogućnosti prema suncu, na blago prozračnim područjima.	Smanjuje se vjerojatnost pojave i razmnožavanja gljivica.
Uzimiti pčelinje zajednice primjereno njihovoj veličini. Nenaseljene okvire treba ukloniti. U hladnoj klimi, držiti košnice na toplijem i osunčanom mjestu tijekom zime do kasnog proljeća.	Smanjuje se temperaturni stres pčela tijekom hladne sezone.
Osigurati dovoljnu količinu hrane u košnici tijekom zime koja se nalazi na mjestu dostupnom pčelama.	Sprječava prehrambeni stres pčela tijekom hladne sezone. Ako ima dovoljno hrane koja se nalazi na mjestima koje je dostupno pčelama dok su u klupku, sprječava ugibanje zajednice od gladi.
Prije uzimljanja primijeniti odgovarajuće tretmane protiv varoe.	Osigurava se dobar imunitet pčela.
Osigurati pčelama na raspolaganju dovoljno hrane bogate proteinima tijekom kasnog ljeta i jeseni. Smjestiti pčelinjake na mjesta gdje su zajednici dostupni izvori peludi krajem ljeta i u jesen. Kad je to moguće, posaditi blizu pčelinjaka biljke koje daju pelud tijekom kasnog ljeta i u jesen. Ako nije moguće, na vrijeme prihraniti pčele proteinskim dodacima.	Sprječava prehrambeni stres pčela i omogućava normalan razvoj dugoživućih pčela.
Zimi što manje uznemiravati pčele. Ograničiti pregled samo za vrijeme sunčanih dana i to za vrijeme najtoplijih sati.	Izbjegava se temperaturni stres pčela.
Ne koristiti izrađeno saće (ni ako je prazno, ni sa zalihama meda i/ili peludi) podrijetlom iz oslabljenih ili stradalih zajednica.	Smanjujete vjerojatnost prijenosa zaraze između zajednice. Slabljenje zajednice često je znak da s njom nešto nije u redu. Uz to su manje zajednice podložnije na bolesti.

Sprječiti zagađivanje pojilica fekalijama i utopljenim ili mrtvim pčelama. Koristiti higijenske pojilice kao izvor vode za pčele.	Smanjuje širenje zaraze preko pojišta.
Kupiti matice od uzgajivača matica bez <i>Nosema spp.</i> Kada god je to moguće, uzgajati pčele koje su otporne na nozemozu.	Pčele koje pokazuju genetsku rezistenciju na nozemozu imaju manju vjerojatnost zaraziti se nozemozom.
Ukloniti i spalite saće s znakovima pčelinjeg proljeva.	Smanjuje razinu zaraženosti u košnicama i između košnica.
Ako je moguće, poslati uzorke pčela u ranu jesen ili u proljeće u laboratorij na analizu.	Ranim otkrivanjem bolesti može se izbjeći kontaminacija drugih pčela.
Primjeniti odgovarajuću kontrolu patogena (npr. varoe) u pčelinjoj zajednici. Redovito pratiti razinu zaraze varoom upotrebljavajući metodu šećerom u prahu.	Zdrave i snažne zajednice imaju jači imunološki sustav i mogu se bolje boriti protiv bolesti.
Ojačati i stimulirati zajednice u jesen i na proljeće primjenom primjerene prihrane kada je potrebno.	Prehrambeni stres zbog nedostatka odgovarajuće hrane može ugroziti imunološki sustav pčela i zbog tog ih učiniti sklonijima bolesti.

Izvor: (FAO, 2020.)

2.3. Prezimljavanje pčelinjih zajednica

Prije razdoblja zimovanja košnice je potrebno pregledati i pripremiti. Vrlo je važno da su zajednice zdrave i da imaju dovoljan broj mladih pčela. Ukoliko je potrebno, pčelinje zajednice preko zime moguće je prihranjivati krutom hranom. Takav način prihrane primjenjuje se u slučaju nesigurnosti pčelara jesu li pčelinje zajednice pripremljene s dovoljno hrane ili hrana nije pravilno raspoređena. Za vrijeme niskih temperatura pčele u košnici koriste samo hranu koja je iznad njih i ako se ta hrana potroši pčele mogu uginuti od gladi. U takvim slučajevima dodaje se šećerna pogača.

Tijekom zimskog razdoblja i niskih temperatura potrebno je obilaziti pčelinjak. Potrebno je osluškivati zujanje u košnici kako bi se uvjerali da je sve u redu. Ako je zujanje u košnici snažno i neravnomjerno to može biti znak da je u košnici štetočina ili da zajednici ponestaje

hrane. Uginule zajednice potrebno je ukloniti iz pčelinjaka i dobre okvire pripremiti za iduću sezonu.

2.3.1. Pročisni letovi

Kada pčele imaju kvalitetnu hranu i odgovarajuće uvijete, one će zimu prezimiti bez pročisnih letova. Pčele se mogu suzdržati 2 do 3 mjeseca bez pražnjena neprobavljene hrane iz debelog crijeva. Zdrave pčele ne izbacuju izmet u unutrašnjosti košnice. Kada temperature pređu 10°C u hladu, pčele će početi izlaziti iz košnica na pročisne letove. Ovisno o snazi zajednice i udaljenosti klupka od ulaza, neke zajednice će početi prije izlaziti iz košnica. Ako pčele nisu izlazile dulje vremena potrebno je osloboditi ulaz tankom grančicom ili žicom.

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanje je provedeno tijekom ožujka 2021. godine u laboratoriju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Prikupljeni su uzorci s 19 pčelinjaka, 10 s područja Osijeka i 9 s područja Siska (Slika 4.). Sa svakog pčelinjaka skupljeni su uzorci iz 30 nasumično odabranih pčelinjih zajednica. Uzorci pčela su nakon skupljanja čuvani u zamrzivaču te su ubrzo nakon skupljanja analizirani u laboratoriju.

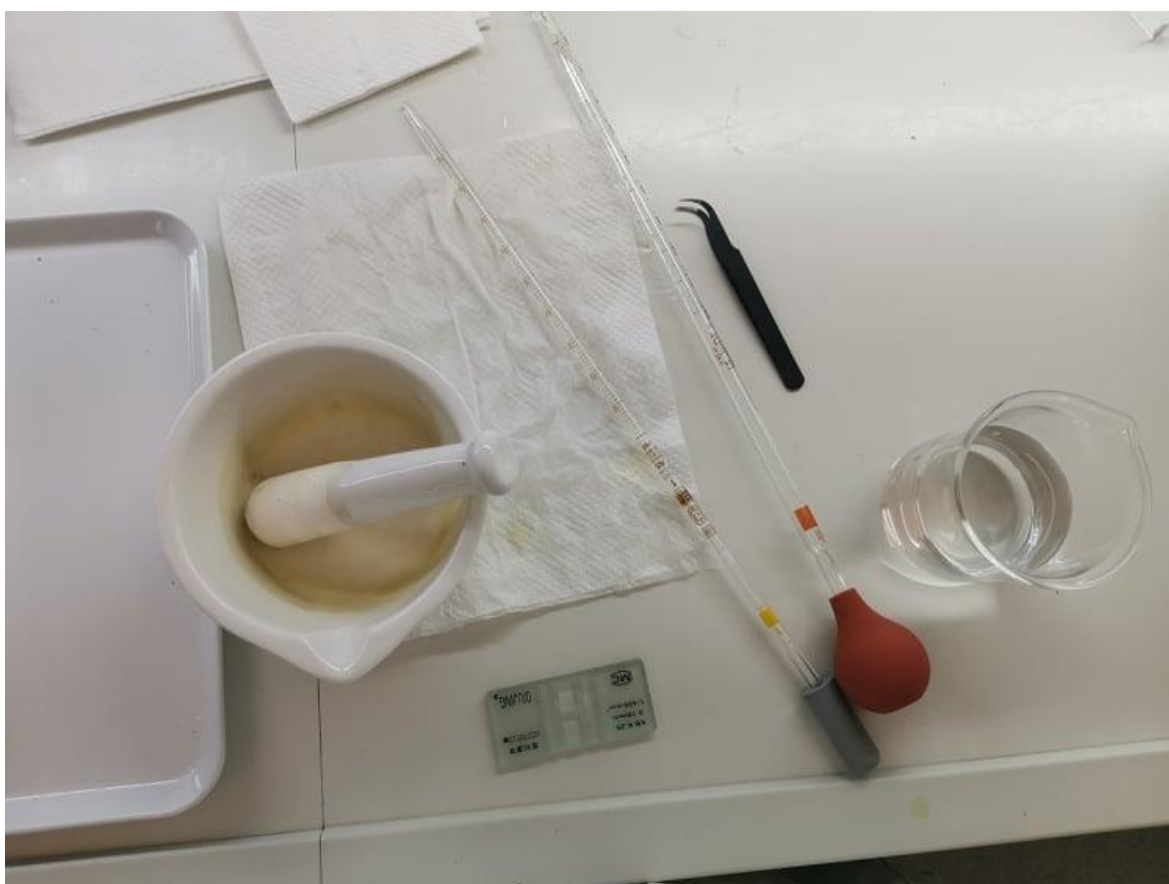


Slika 4. Prikupljanje uzoraka za analizu na pčelinjaku

Izvor: Autor, 2021.

Za potrebe laboratorijskog dijela istraživanja korištena je slijedeća oprema (slika 5.):

- Svjetlosni mikroskop povećanja 400x
- Hemocitometar
- Tarionik i tučak
- Destilirana voda
- Pipete
- Pinceta



Slika 5. Pribor korišten u laboratoriju za pripremu uzoraka

Izvor: Autor, 2021.

Za pripremu uzoraka pincetom je odvojen zadak s 20 pčela radilica. Odvojenim zaticima u tarioniku je pomoću pipete dodano 0,5 ml destilirane vode po zatku odnosno 10 ml vode sveukupno. Pomoću tučka uzorak se dobro zgnječio kako bi iz crijeva izašao sadržaj te je promješšan (Slika 6.).



Slika 6. Uzorak pripremljen u tarioniku

Izvor: Autor, 2021.

Nakon toga pomoću čiste pipete stavlja se kap tekućine na hemocitometar i pokrije pokrovnim stakalcem (Slika 7.).



Slika 7. Hemocitometar pripremljenim preparatom za gledanje pod mikroskopom

Izvor: Autor, 2021.

Uzorak se zatim gleda pod svjetlosnim mikroskopom na povećanju od 400x. Nakon što se slika na mikroskopu pronade i izoštri broje se spore (Slika 8.). Dobiveni broj spora množi se s 50 tisuća kako bi se izračunao broj spora po pčeli.



Slika 8. Izoštrena slika preparata pod mikroskopom

Izvor: Autor, 2021.

4. REZULTATI

U ovom istraživanju na ukupnom broju od 563 uzorka (299 iz regije Osijek i 264 iz regije Sisak) kod pčela radilica utvrđen je prosječan broj spora od 3,2 milijuna. Rezultati su podijeljeni u 2 regije: regija Osijek i regija Sisak. U regiji Osijek prosječan broj spora je oko 900.000 dok je u regiji Sisak prosječan broj spora 5,8 milijuna. Mann-Whitney test pokazao je kako je između regija utvrđena statistička značajna razlika ($U = 21.798,500$, $p < 0,001$). U regiji Osijek minimalan broj spora je 0, a maksimalan 27 milijuna. U regiji Sisak minimalan broj spora je 0, a maksimalan 105 milijuna. Za uzorke u regiji Osijek standardna devijacija je 2,9 milijuna, a za uzorke u regiji Sisak je 11,7 milijuna. (Tablica 4.).

Tablica 4. Rezultati istraživanja po regijama

Regija		Izbrojano spora	Utvrđeni broj spora
Osijek	Srednja vrijednost	18,24	912.207,36
	N	299	299
	Standardna devijacija	58,23	2.911.489,588
	Minimum	0	0
	Maksimum	551	27.550.000
Sisak	Srednja vrijednost	116,31	5.815.719,70
	N	264	264
	Standardna devijacija	235,43	11.771.513,315
	Minimum	0	0
	Maksimum	2.100	105.000.000
Ukupno	Srednja vrijednost	64,23	3.211.545,29
	N	563	563
	Standardna devijacija	173,597	8.679.830,483
	Minimum	0	0
	Maksimum	2.100	105.000.000

U regijama Osijek i Sisak primijećena je značajna razlika u broju spora što je vidljivo u tablici 5. i na grafikonu 1.

Tablica 5. Broj spora na pojedinačnim pčelinjacima

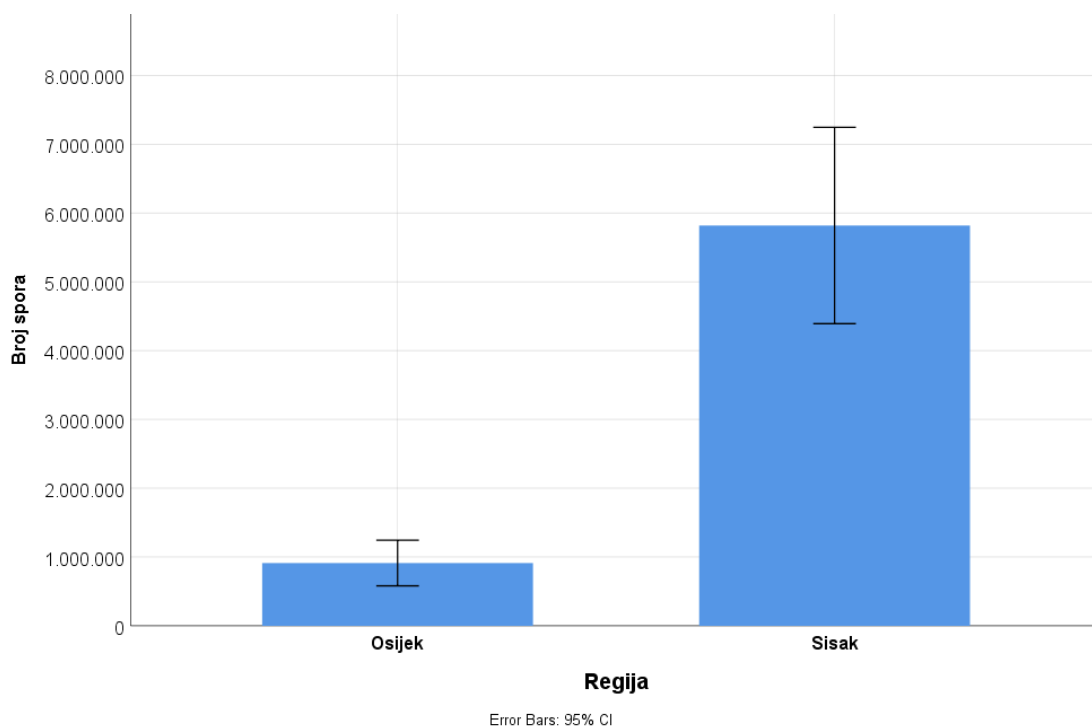
Regija Osijek i okolica		
Pčelinjak	Broj spora	Utvrđeni broj spora
1	Mean	7,97
	N	30
	SD	25,753
	Min.	0
	Max.	135
2	Mean	38,23
	N	30
	SD	54,896
	Min.	0
	Max.	195
3	Mean	8,63
	N	30
	SD	23,173
	Min.	0
	Max.	114
4	Mean	1,79
	N	29
	SD	6,873
	Min.	0
	Max.	37
5	Mean	3,03
	N	30
	SD	11,149
	Min.	0
	Max.	61
6	Mean	90,23
	N	30
	SD	143,291
	Min.	0
	Max.	551
7	Mean	22,13
	N	30
	SD	46,908
	Min.	0
	Max.	223
8	Mean	4,73
	N	30

	SD	17,130	856.509,892
	Min.	0	0
	Max.	83	4.150.000
9	Mean	3,17	158.333,33
	N	30	30
	SD	12,852	642.608,281
	Min.	0	0
	Max.	70	3.500.000
10	Mean	1,97	98.333,33
	N	30	30
	SD	8,036	401.824,145
	Min.	0	0
	Max.	44	2.200.000

Regija Sisak i okolica

Pčelinjak		Broj spora	Utvrđeni broj spora
11	Mean	437,30	21.865.000,00
	N	30	30
	SD	486,565	24.328.237,283
	Min.	8	400.000
	Max.	2100	105.000.000
12	Mean	157,33	7.866.666,67
	N	30	30
	SD	137,088	6.854.401,221
	Min.	0	0
	Max.	477	23.850.000
13	Mean	70,40	3.520.000,00
	N	30	30
	SD	155,696	7.784.795,083
	Min.	0	0
	Max.	621	31.050.000
14	Mean	21,13	1.056.666,67
	N	30	30
	SD	45,276	2.263.798,050
	Min.	0	0
	Max.	184	9.200.000
15	Mean	96,96	4.847.916,67
	N	24	24
	SD	180,194	9.009.710,693
	Min.	0	0
	Max.	883	44.150.000

16	Mean	50,80	2.540.000,00
	N	30	30
	SD	115,858	5.792.911,840
	Min.	0	0
	Max.	570	28.500.000
17	Mean	6,20	310.000,00
	N	30	30
	SD	17,997	899.846,730
	Min.	0	0
	Max.	76	3.800.000
18	Mean	85,17	4.258.333,33
	N	30	30
	SD	109,796	5.489.819,470
	Min.	0	0
	Max.	402	20.100.000
19	Mean	117,67	5.883.333,33
	N	30	30
	SD	176,376	8.818.821,304
	Min.	0	0
	Max.	890	44.500.000



Grafikon 1. Broj spora nozemoze u regiji Osijek i Sisak

Na području Osijeka i okolice od svih analiziranih uzoraka, 41,33% bilo je pozitivno na prisutnost spora nozemoze (utvrđena barem 1 spora) dok je na području Siska i okolice kod 70,48% uzoraka utvrđena prisutnost spora nozemoze. Međutim, ukoliko se kao granica uzme 1 milijun spora nozemoze, tada je u regiji Osijek 16,1% uzoraka pozitivno (48 uzoraka od 299 s više od milijun spora po pčeli) dok je u regiji Sisak 53,8 % uzoraka pozitivno (142 od 264 uzorka s više od milijun spora po pčeli).

5. RASPRAVA

Nozemoza je bolest odraslih pčela koju uzrokuju dvije različite vrste gljivica: *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Razvoju bolesti najviše odgovara zimsko razdoblje jer su pčele spriječene izlijetati na pročišne letove. Spore koje zaražene pčele izbace lako dospijevaju u probavni sustav drugih pčela. U ovom istraživanju uzorci živih pčela radilica su skupljani na kraju razdoblja zimovanja u dvije regije u Hrvatskoj. U regiji Osijek utvrđeni prosječni broj spora je oko 900.000 dok je u regiji Sisak broj spora bio statistički značajno veći i iznosio prosječnih 5,8 milijuna.

Slično istraživanje proveli su Retschnig i sur. (2017.) u Švicarskoj koji su tijekom dvije godine uzimali uzorke pčela u zimu i rano proljeće. Od 900 analiziranih uzoraka, 420 je bilo zaraženo *Nosema spp.* Za uzorke su uzimali 60 nasumično odabranih pčela radilica iz zajednice koje su se zatim gledale pod mikroskopom. Kroz cijelo istraživanje broj spora je bio od 200 tisuća do 4,2 milijuna spora po pčeli. U zimu 2011. godine prosječan broj spora je bio 850 tisuća, a u zimu 2012. godine 4,2 milijuna. Spore nozemoze su detektirane u 57,6 % uzoraka od čega je 89,47% zaraženo *Nosema ceranae*, a samo 4,21% je *Nosema apis*. U 6,32 % uzoraka su pronađene obje vrste gljivica. U istraživanju je navedeno kako je na veliku razliku u broju spora između uzoraka iz 2011. i 2012. godine moglo utjecati vrijeme uzimanja uzoraka kao i broj letnih dana tijekom zime.

Özkirim i sur. (2019.) napravili su istraživanje u Turskoj u 72 različite regije između 2009. i 2016. godine. U svako godišnje doba prikupljena su 4 uzorka s 4 pčelinjaka iz svake regije. U tom razdoblju prikupljen je 1041 uzorak. Najveći prosječan broj spora nađen je 2009. godine (23,5 milijuna spora) i 2015. godine (21 milijun spora). Autori zaraženost povezuju s temperaturom i klimatskim čimbenicima. U godinama u kojima su zimske temperature bile najniže povećao se broj spora *N. apis*, ali se broj spora *N. ceranae* smanjio. Navode kako se uzročnici zaraze „zamjenjuju“ ovisno o vanjskim čimbenicima te da je zaraženost s *N. ceranae* najčešća. Također navode kako zaraza ovisi o prosječnim zimskim temperaturama, ali ne i o lokaciji pčelinjaka.

Papini i sur (2016.) su proveli istraživanje na 38 pčelinjaka. Sa svakog pčelinjaka prikupljeni su uzorci iz 2 do 4 zajednice od svibnja do rujna. Pčelinjaci su locirani u 6 regija u centralnoj Italiji. Spore nozemoze su utvrđene u svih 6 regija odnosno utvrđene su na 24 od 38 pčelinjaka. Od 24 pčelinjaka pozitivna na nozemozu, svih 24 su pozitivni na *N. ceranae*.

Zaraženost je bila od 125.000 do 4,1 milijuna spora po pčeli. Navode kako je moguća veća zaraženost *N. ceranae* u krajevima s toplijom klimom odnosno mediteranskom klimom.

Tlak-Gajger i sur (2010.) su proveli istraživanje na 204 uzorka koji potječu uglavnom iz zajednica s različitim problemima kao što su smanjen broj pčela u zajednici, visoka smrtnost pčela i slabe zajednice. Uzorci su skupljani u rano proljeće odnosno tijekom veljače i ožujka iz tri klimatske regije u Hrvatskoj. U kontinentalnoj Hrvatskoj 72,65% uzoraka bili su pozitivni na nozemozu, u planinskoj Hrvatskoj 86% uzoraka, a u mediteranskoj Hrvatskoj 64,86% uzoraka.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u provedenom istraživanju kao i rezultata istraživanja drugih autora možemo zaključiti kako su spore nozemoze prisutne u većini uzoraka pčela nakon razdoblja zimovanja. U ovom istraživanju, značajno manji broj spora utvrđen je u regiji Osijek. Druga istraživanja pokazala su kako je puno veća zaraza sporama *Nosema ceranae* i kako je ona sada dominantna u Europi. Istraživanja drugih autora koji su pratili prisutnos spora nozemoze tijekom cijele godine pokazala su kako je prisutnost spora nozemoze u radilicama najveća nakon razdoblja zimovanja jer pčele nisu bile u mogućnosti ići na proćisne letove i spore su se širile unutar košnice. Zaraza se najčešće širi među pčelama radilicama, a puno rjeđe se javlja kod matice i trutova.

Nozemoza je opasna bolest koja može imati smrtne posljedice za zajednicu ako se ne tretira na pravilan način. Spore se mogu aktivirati i nakon dužeg razdoblja i brzo se šire. Zajednice je potrebno kvalitetno pripremiti za razdoblje zimovanja s dovoljnom količinom dostupne hrane.

7. POPIS LITERATURE

1. Chen Y. P., Evans J.D., Murphy C., Gutell R. , Zuker M., Gundensen-Rindal D., Pettisa J. S. (2009.): Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2): 142-147
2. FAO, 2020.: Dobra pčelarska praksa: Glavne bolesti medonosne pčele (*Apis mellifera*): Kako ih prepoznati, spriječiti i liječiti: Praktični priručnik. Geromar d.o.o., Sveta Nedelja, 65-70.
3. Higes, M., Martín, R., Meana, A. (2006.): *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol.*, 92(2):93-5.
4. Laktić Z., Šekulja D. (2008.): *Suvremeno pčelarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 426-429.
5. Özkırım A., Schiesser A., Keskin N. (2019.): Dynamics of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* Co-Infection Seasonally in Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Colonies. *Journal of Apicultural Science*; 63(1): 41-48.
6. Papini, R., Mancianti, F., Canovai, R., Cosci, F., Rocchigiani, G., Benelli, G., Canale, A. (2016.): Prevalence of the microsporidian *Nosema ceranae* in honeybee (*Apis mellifera*) apiaries in Central Italy. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5): 970-982
7. Retschnig, G., Williams, G.R., Schneeberger, A., Neumann, P. (2017.): Cold Ambient Temperature Promotes *Nosema* spp. Intensity in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Insects*. 2017 Mar; 8(1): 20., objavljeno 2017., 9. veljače
8. Sulimanović, Đ., Lj. Zeba, J. Marković (1995.): *Prepoznavanje i suzbijanje pčelinjih bolesti*. PIP d.o.o., Zagreb, 88-99
9. 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
10. Tucak, Z., Bačić, T., Horvat, S., Puškadija, Z. (2005.): *Pčelarstvo*, III. dopunjeno i prošireno izdanje. Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek, 25-35, 68-70.
11. Umeljić, V. (2016.): *Tehnike pčelarenja*. Naklada Uliks, Hrvatska, 39-59, 152-166, 287.
12. Wang, Der-I, Moeller, F. E. (1970.): The division of labor and queen attendance behaviour of nosema-infected worker honey bee. *J. Econ. Ent.* 63: 1539-1541.

13. Agriculture Victoria: Nosema disease of honey bees. 2021.

<https://agriculture.vic.gov.au/biosecurity/animal-diseases/honey-bee-pests-and-diseases/nosema-disease-of-honey-bees> (25.8.2021.)

14. Agroportal: Nozemoza pčela. 26.10.2017.

<https://www.agroportal.hr/uzgoj-pcela/20229> (25.8.2021.)

8. SAŽETAK

U ovom istraživanju analizirana je prisutnost spora *Nosema spp.* na 563 uzorka s 19 pčelinjaka iz dvije regije u Hrvatskoj. Iz regije Osijek i okolice obrađeno je 299 uzoraka, a iz regije Sisak i okolice 264 uzorka. Sa svakog pčelinjaka uzorci su skupljeni iz 30 pčelinjih zajednica. Skupljeni uzorci analizirani su u laboratoriju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Cilj istraživanja bio je utvrditi prisutnost spora nozemoze nakon razdoblja zimovanja.

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti visoka zaraženost radilica sporama nozemoze nakon razdoblja zimovanja. Utvrđen je prosječan broj spora od 3,2 milijuna. Rezultati su podjeljeni u 2 regije: regija Osijek i regija Sisak. U regiji Osijek prosječan broj spora je oko 900.000 dok je u regiji Sisak prosječan broj spora 5.8 milijuna. Na području Osijeka i okolice 41,33% uzoraka bilo je pozitivno na nozemozu (utvrđena barem jedna spora), dok je na području Siska i okolice 70,48% uzoraka bilo pozitivno na prisutnost spora nozemoze.

9. SUMMARY

In this study, the presence of *Nosema spp.* spores was analyzed on 563 samples from 19 apiaries from two regions in Croatia. From the Osijek region 299 samples and from the Sisak region 264 samples were analysed. At each apiary samples were collected from 30 bee colonies. The samples were analysed in the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek. The aim of the study was to determine the presence of *Nosema spp.* spores in honey bee workers after the wintering period.

Based on the obtained results it can be concluded that the infection with nosemosis is high after the wintering period. The average number of spores was 3,2 million per bee. The results are divided into 2 regions: Osijek region and Sisak region. In the Osijek region, the average number of spores was 900.000, while in the Sisak region the average number of spores was 5,8 million. In the area of Osijek and its surroundings, 41,33% of the analysed samples were positive for nosema spores (at least 1 spore was found), while in the area of Sisak and its surroundings, 70.48% of the samples were positive for the presence of nosema spores.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Glavne bolesti pčela razvrstane prema vrsti patogena

Tablica 2. Glavne bolesti legla

Tablica 3. Dobra pčelarska praksa za prevenciju i suzbijanje nozemoze

Tablica 4. Rezultati istraživanja po regijama

Tablica 5. Rezultati istraživanja na pojedinačnim pčelinjacima

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Anatomija pčele

Slika 2. Nosema spp. pod svjetlosnim mikroskopom

Slika 3. Izmet na ulazu u košnicu koji je uzrokovan Nosemom apis

Slika 4. Prikupljanje uzoraka za analizu na pčelinjaku

Slika 5. Pribor korišten u laboratoriju za pripremu uzoraka

Slika 6. Uzorak pripremljen u tarioniku.

Slika 7. Hemocitometar pripremljen za gledanje pod mikroskopom

Slika 8. Izoštrena slika uzorka pod mikroskopom

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1. Broj spora u regiji Osijek i Sisak

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Diplomski sveučilišni studij, smjer Lovstvo i pčelarstvo

Diplomski rad

Prisutnost spora nozemoze (*Nosema sp.*) u zajednicama medonosne pčele (*Apis mellifera*) na kraju razdoblja zimovanja

Laura Jurman

Sažetak: U ovom istraživanju analizirana je prisutnost spora *Nosema spp.* na 563 uzorka s 19 pčelinjaka iz dvije regije u Hrvatskoj. Iz regije Osijek i okolice obrađeno je 299 uzoraka, a iz regije Sisak i okolice 264 uzorka. Sa svakog pčelinjaka uzorci su skupljeni iz 30 pčelinjih zajednica. Skupljeni uzorci analizirani su u laboratoriju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Cilj istraživanja bio je utvrditi prisutnost spora nozemoze nakon razdoblja zimovanja. Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti visoka zaraženost radilica sporama nozemoze nakon razdoblja zimovanja. Utvrđen je prosječan broj spora od 3,2 milijuna. Rezultati su podjeljeni u 2 regije: regija Osijek i regija Sisak. U regiji Osijek prosječan broj spora je oko 900.000 dok je u regiji Sisak prosječan broj spora 5.8 milijuna. Na području Osijeka i okolice 41,33% uzoraka bilo je pozitivno na nozemozu (utvrđena barem jedna spora), dok je na području Siska i okolice 70,48% uzoraka bilo pozitivno na prisutnost spora nozemoze.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku

Mentor: doc.dr.sc. Marin Kovačić

Broj stranica: 32

Broj grafikona i slika: 9

Broj tablica: 5

Broj navoda: 14

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: medonosna pčele, nozemoza, spore, zimovanje

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

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

Rad je pohranjen u: Knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilište u Osijeku, Vladimira Preloga 1d

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of agrobiotechnical sciences Osijek
University Graduate Studies, Hunting and Beekeeping

Graduate thesis

Presence of nosemosis spores (*Nosema sp.*) in honey bee colonies (*Apis mellifera*) at the end of the wintering period

Laura Jurman

Abstract: In this study, the presence of *Nosema spp.* spores was analyzed on 563 samples from 19 apiaries from two regions in Croatia. From the Osijek region 299 samples and from the Sisak region 264 samples were analysed. At each apiary samples were collected from 30 bee colonies. The samples were analysed in the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek. The aim of the study was to determine the presence of *Nosema spp.* spores in honey bee workers after the wintering period. Based on the obtained results it can be concluded that the infection with nosemosis is high after the wintering period. The average number of spores was 3,2 million per bee. The results are divided into 2 regions: Osijek region and Sisak region. In the Osijek region, the average number of spores was 900.000, while in the Sisak region the average number of spores was 5,8 million. In the area of Osijek and its surroundings, 41,33% of the analysed samples were positive for nosema spores (at least 1 spore was found), while in the area of Sisak and its surroundings, 70,48% of the samples were positive for the presence of nosema spores.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

Mentor: doc.dr.sc. Marin Kovačić

Number of pages: 32

Number of figures: 9

Number of tables: 5

Number of references: 14

Original in: Croatian

Croatian Key words: honey bee, nosemosis, spores, wintering

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. prof.dr.sc. Zlatko Puškadija, president
2. doc.dr.sc. Marin Kovačić, mentor
3. prof.dr.sc. Tihomir Florijančić, member

Thesis deposited at: Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1d.