

# Učinak prihranjivanja pčelinjih zajednica (*Apis mellifera* L.) proteinskim pogačama na stupanj invadiranosti sporama *Nosema* spp.

---

Mužić, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:132051>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-08**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
STUDIJ *VETERINARSKA MEDICINA*

DIPLOMSKI RAD

Antonia Mužić

Učinak prihranjivanja pčelinjih zajednica (*Apis mellifera* L.) proteinskim  
pogačama na stupanj invadiranosti sporama *Nosema* spp.

Zagreb, 2024.

Antonia Mužić

Odjel za animalnu proizvodnju i biotehnologiju

Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Krešimir Matanović

Mentorice: prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger i doc. dr. sc. Maja Ivana Smodiš Škerl

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Srebrenka Nejedli
2. prof. dr. sc. Željko Mikulec
3. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger
4. doc. dr. sc. Maja Ivana Smodiš Škerl, Kmetijski Inštitut Slovenije (zamjena)

Rad sadržava 33 stranice, 5 slika, 3 tablice, 54 literaturna navoda.

## Zahvale

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger i doc. dr. sc. Maji Ivani Smodiš Škerl na stručnom vodstvu i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Veliko hvala roditeljima i sestrama Lari i Ani na podršci, strpljenju i motivaciji tijekom studiranja. Također, zahvaljujem svim prijateljima koje sam upoznala na fakultetu, posebice Nikolini, Marti i Aleks, ekipi sa Cvjetnog i dragom Adyju koji su bili uz mene i uljepšali mi studentske dane.

## Popis priloga

Slika 1. Izgled proizvodnog pčelinjaka na kojem je obavljen terenski dio istraživanja.

Slika 2. Priprema mikroskopskog preparata.

Slika 3. Pripremljeni uzorak za pretraživanje pod svjetlosnim mikroskopom.

Slika 4. Nativni preparat crijevnog sadržaja pčele s vidljivim sporama *Nosema spp.* pod svjetlosnim mikroskopom, povećanje 400x.

Slika 5. Prikaz prosječnog broja spora *N. ceranae* na početku i tijekom prihranjivanja šećernom i proteinskom pogačom.

Tablica 1. Prosječan broj spora (n) i broj spora *N. ceranae* po pčeli (N) za pokusne (prihranjivane proteinskim pogačama) i kontrolne (prihranjivane šećernim pogačama) skupine pčelinjih zajednica nakon inicijalnog uzorkovanja.

Tablica 1. Prosječan broj spora (n) i broj spora *N. ceranae* po pčeli (N) za pokusne (prihranjivane proteinskim pogačama) i kontrolne (prihranjivane šećernim pogačama) skupine pčelinjih zajednica nakon drugog uzorkovanja.

Tablica 3. Prosječan broj spora (n) i broj spora *N. ceranae* po pčeli (N) za pokusne (prihranjivane proteinskim pogačama) i kontrolne (prihranjivane šećernim pogačama) skupine pčelinjih zajednica nakon trećeg uzorkovanja.

## Popis i objašnjenje kratica

EU - Europska unija

PCR - Lančana reakcija polimerazom, *engl. Polymerase chain reaction*

AMP – Antimikrobni peptidi

SCFA – Kratko lančane masne kiseline, *engl. Short-chain fatty acids*

DNK – Deoksiribonukleinska kiselina

RH – Republika Hrvatska

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	PREGLED DOSADAŠNJE LITERATURE.....	3
2.1.	PREHRANA ZAJEDNICE MEDONOSNE PČELE .....	3
2.2.	Probavni sustav pčele .....	6
2.3.	Mikrobiom crijeva pčele radilice .....	8
2.4.	Vairimorfoza (Nozemoza).....	10
3.	MATERIJALI I METODE .....	14
3.1.	Lokacija i izgled pokusnog pčelinjaka.....	14
3.2.	Prihranjivanje pčelinjih zajednica .....	14
3.3.	Uzrokovanje .....	15
3.4.	Laboratorijska mikroskopska pretraga .....	15
3.5.	Statistika .....	17
4.	REZULTATI .....	18
5.	RASPRAVA .....	22
6.	ZAKLJUČCI .....	25
7.	LITERATURA .....	26
8.	SAŽETAK.....	311
9.	SUMMARY .....	322
10.	ŽIVOTOPIS .....	333

## 1. UVOD

Pčelarstvo kao gospodarska grana pridonosi zaštiti okoliša, očuvanju biološke raznolikosti i održavanju ekološke ravnoteže (FAUX i KANE, 2021.). Pčele su najvažniji kukci oprašivači koje zauzimaju veliku ulogu u kopnenom ekosustavu, a ona se očituje preko oprašivanja biljaka i proizvodnje hrane za čovjeka i životinje (MATAŠIN i sur., 2007.). U prilog tome ide i podatak kako 90% komercijalnog oprašivanja obavljaju zajednice medonosne pčele (*Apis mellifera* L.). Iako je proizvodnja osnovnih namirnica i hrane za ljude, kao što su pšenica, kukuruz, riža i krumpir neovisna o životinjama zbog samooprašivanja vjetrom, ili vegetativnim razmnožavanjem, proizvodnja mnogih vrsta voća i povrća ovisi o oprašivanju korisnim kukcima oprašivačima. Nadalje, gospodarenjem pčelinjim zajednicama dobiva se široka paleta visoko vrijednih pčelinjih proizvoda kao što su med, propolis, matična mliječ, pelud, vosak i pčelinji otrov. Zbog toga, zdravlje, ekološka i ekonomska uloga medonosne pčele nedavno su postali tema brojnih istraživanja. Glede veze između globalne proizvodnje i sigurnosti hrane te medonosnih pčela, sve više zabrinjava smanjivanje broja pčelara i broja uzgajanih zajednica medonosnih pčela, kao i drastično smanjivanje brojnosti, ali i vrsta divljih pčela oprašivača (GENERSCH, 2010.). Iako se zajednicama medonosne pčele može djelomično gospodariti i nadoknaditi njihovu brojnost, tijekom proteklih desetljeća, u određenim dijelovima svijeta, uočeno je značajno slabljenje i propadanje zajednica medonosnih pčela. Razlozi za gubitke su složeni, a glavni čimbenici su zarazne pčelinje bolesti, od kojih su najvažnije nametničke bolesti varooza i nozemoza, zatim njima prateće ekonomski značajne virusne bolesti, upotreba pesticida u poljoprivredi, nedostatna prehrana te primjena nepovoljnih i nepravilnih pčelarskih praksi (STEINHAEUER i sur., 2018.).

Prirodna hrana odraslih pčela je nektar i pelud kojeg sakupljačice pronalaze i uzimaju u prirodi, a dostupnost hrane različita je tijekom pčelarske sezone. Količine pohranjenih zaliha hrane u košnicama i u pčelinjim tjelesnim rezervama utječu na jačinu pčelinje zajednice. Pčelar treba redovito pregledavati pčelinje zajednice i pratiti količinu pohranjenih rezervi hrane u košnici. Nadalje, treba osigurati jaku pčelinju zajednicu u proljeće za sakupljanje peludi i nektara te usluge oprašivanja, a u jesen za uspješno prezimljavanje. U cilju poboljšanja učinkovitosti pčelarenja, povećanja proizvodnje meda, oprašivanja poljoprivrednih usjeva i stvaranja jakih pčelinjih zajednica, potrebna je dostatna i uravnotežena hrana. To se postiže dodatnim prihranjivanjem pčelinjih zajednica. Nakon vađenja i vrcanja meda iz košnice pčelama je potrebna dodatna hrana, najčešće u obliku šećernog sirupa. Tijekom zimskih i



proljetnih mjeseci najviše se koristi šećerno- medno tijesto, odnosno pogača. Pogača na tržište dolazi različitog sastava i s različitim dodacima (KATUŠIĆ, 2020., MAJOROŠ i sur., 2022.). Duga bespašna razdoblja, klimatske promjene koje dovode do naglih promjena u okolišu, velike poljoprivredne površine pod monokulturnim usjevima tek su neki od čimbenika koji mogu dovesti do gladovanja. Tada pčelinja zajednica postane osjetljivija na infekcije uzrokovane patogenim mikroorganizmima i invazije nametnicima i štetnicima. Najčešći uzročnici bolesti su *Varimorpha* spp. (nadalje u tekstu *Nosema* spp.), *Varroa destructor*, ekonomski značajni pčelinji virusi, bakterije i gljivice (MAJOROŠ i sur., 2022.).

Varimorfoza (nadalje u tekstu nozemoza) je nametnička bolest odraslih pčela koja, iako je asimptomatska bolest, nanosi velike ekonomske štete pčelarstvu. Uzročnici su mikrosporidije *Nosema apis* koja uzrokuje nozemozu tipa A i *Nosema ceranae* koja je uzročnik nozemoze tipa C. *N. ceranae* smatra se za pčele opasnijom i virulentnijom od *N. apis*. Nozemoza tipa C je postala gospodarski vrlo značajna bolest kada je prešla sa svog prirodnog nosioca, azijske pčele (*Apis cerana*) te se prilagodila na europsku medonosnu pčelu (*A. mellifera*). Osim promjene nosioca, blago joj je promijenjen i tropizam mjesta invadiranja. Genetski materijal uzročnika je utvrđen u masno – bjelančevinastom tijelu, Malphigijevim cjevčicama, mliječnoj i slinskoj žlijezdi invadiranih pčela. Posljedica promijenjenog tropizma može ukazivati na težu kliničku sliku, pri kojoj nema karakterističnih znakova bolesti nozemoze (KRZNAR i sur., 2015.). Upravo zbog toga, nozemozu tipa C naziva se „tih ubojica“, jer zbog izostanka vidljivih kliničkih znakova često nije zapažena od strane pčelara. Primarno mjesto parazitiranja spomenutog nametnika su epitelne stanice srednjeg crijeva odrasle pčele u kojima se umnaža, a posljedično oštećujući crijevne stanice koje propadaju (HORNITZKY, 2005.).

Bolest se može očitovati slabljenjem pčelinje zajednice te smanjenim prinosom meda i drugih pčelinjih proizvoda. Pčele radilice kraće žive i to se događa u vrijeme kad obavljaju poslove skupljačice čime je smanjen obim oprašivanja i uočeni su gubitci u poljoprivrednoj proizvodnji, posebice voćarstvu (MATAŠIN i sur., 2007.). Normativni akti u Europskoj uniji (EU) ne dopuštaju uporabu antibiotika za liječenje pčelinjih bolesti zbog mogućeg utvrđivanja rezidua antibiotika ili njihovih razgradnih produkata u pčelinjim proizvodima, mogućnosti pojave rezistencije, neučinkovitosti te prikriivanja klinički vidljivih znakova bolesti.

Cilj ovog rada bio je istražiti učinkovitost prihrane pčelinjih zajednica proteinskim pogačama i utvrditi njihov mogući utjecaj na vitalitet i na stupanj invadiranosti sporama *Nosema* spp.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJE LITERATURE

### 2.1. Prehrana zajednice medonosne pčele

Za optimalnu prehranu pčelinjih zajednica potrebno je zadovoljiti sve prehrambene potrebe koje uključuju sastavine: bjelančevine, lipide, ugljikohidrate, vitamine, minerale i vodu (VIDAL-NAQUET, 2015.). Nektar je glavni prirodni izvor ugljikohidrata u prehrani medonosne pčele (ZACHARY, 2010.). Sakupljaju ga, transportiraju i unose u košnicu pčele skupljačice (WHITE JR, 1978.). Tijekom transporta dodaju mu enzime invertazu i glukozooksidazu, tako da probava nektara počinje prije vraćanja u košnicu. Invertaza je enzim koji pretvara saharozu u glukozu i fruktozu. Mala količina glukoze pretvara se u glukonsku kiselinu i vodikov-peroksid pod utjecajem enzima glukozooksidaze. Glukonska kiselina čini med kiselim, a vodikov-peroksid ima i antibakterijska svojstva (ZACHARY, 2010.). U košnici skupljačice nektar predaju kućnim pčelama, nakon čega ga one predaju jedna drugoj „s rilca na rilce“, te konačno pohranjuju u stanice saća gdje med sazrijeva. Količina vlage u medu mora se smanjiti na 17 do 18 % da bi se med smatrao „zreo“ te tada pčele zatvore stanicu saća.

Odrasle pčele mogu iskoristiti glukozu, fruktozu, saharozu, maltozu, no ne mogu probaviti ramizozu, ksilozu, arabinozu, galaktozu, manozu, laktozu, rafinozu, melibiozu i stahiozu. Većina navedenih šećera otrovni su za medonosnu pčelu. Nadalje, oko 40% šećera u sojinom zrnu otrovno je za pčele, što treba imati na umu pri korištenju soje kao zamjene za pelud (ZACHARY, 2010.).

Jedini prirodni izvor proteina za pčelinju zajednicu čini pelud. Osim bjelančevina, pelud zadovoljava potrebu za mastima, vitaminima i mineralima. Za razliku od meda, samo mala količina peluda uskladištena je u stanicama saća (fermentirani pelud ili pčelinji kruh) u košnici te se zaliha brzo isprazni u bespaznom razdoblju (BRODSCHNEIDER i CRAILSHEIM, 2010.). Pčele radilice u dobi kada obavljaju poslove skupljačica skupljaju pelud s različitih biljaka. Dio peluda uskladištenog u saću pojedju mlade pčele kako bi razvile mliječne žlijezde sa svrhom stvaranja i izlučivanja matične mliječi, a ostatak sakupljene peludi pohranjuje se u stanice saća blizu legla (MAJOROŠ i sur., 2022.). Kvaliteta i količina peluda važna je za razvoj i aktivnost mliječne žlijezde radilica. U razdoblju kada obavljaju funkciju hraniteljica mlađeg legla, radilice proizvedu i izlučuju najviše matične mliječi. Kada prestane dostatan priljev peluda, bjelančevinaste probavljene hranjive tvari iskorištavaju se za izgradnju letnog mišićja i funkcioniranje voskovnih žlijezda, dok se veća količina smješta u rezervno masno-

bjelančevinasto tijelo pri formiranju zimske pčele u kasno ljeto i jesen (FAUX i KANE, 2021.). Masno - bjelančevinasto tijelo pčele ima veliku ulogu u pohrani bjelančevina, glikogena i masti, a posjeduje i veliki broj mitohondrija i visoku koncentraciju enzima. Poželjno je da pčele imaju pristup više od jedne cvjetne vrste peluda kako bi se uravnotežio nedostatak koja određena cvjetna vrsta može imati jer nedostatak pogodne vrste peluda može značajno utjecati na razvoj pčelinje zajednice (WIGGESWORTH, 1984.).

Osim ugljikohidrata i proteina, za zdravlje pčele važan je unos masti, vitamina i minerala. Masti, odnosno lipidi sastavni su dio pčelinje peludi (BRODSCHNEIDER i CRAILSHEIM, 2010.). Fosfolipidi, koji su sastavni dio masnih kiselina, imaju funkciju strukturnih elemenata u staničnim membranama i utječu na propustljivost staničnih membrana (WIGGESWORTH, 1984.). Sterol, 24 – metilen kolesterol, nalazi se u peludu i glavni je izvor sterola koji zbog nemogućnosti sintetiziranja, pčele sterol dobivaju iz hrane (ZACHARY, 2010.).

Vitamini B kompleksa, primjerice tiamin, riboflavin, nikotinamid, piridoksin, pantotemat, folna kiselina i biotin, kao i vitamin C (askorbinska kiselina) značajni su za kvalitetan uzgoj pčelinjeg legla. Utvrđeno je da pčele mogu sintetizirati vitamin C. Minerali, kao što su natrij, kalij, kalcij, magnezij, klor, fosfor, željezo, bakar, jod, mangan, kobalt, cink, nikal potrebni su pčelama u određenim količinama, no natrij, natrij-klorid i kalcij u većim količinama mogu biti i otrovni. Poput lipida, potrebe za vitaminima i mineralima zadovoljene su ako su zalihe peluda zadovoljene (BRODSCHNEIDER i CRAILSHEIM, 2010.). Voda koju pčele skupljaju pomaže im u održavanju idealne temperature i vlažnosti zraka u košnici te kao otapalo za guste vrste meda. Najveće potrebe za vodom su u proljeće zbog uzgoja i prehrane mlađeg pčelinjeg legla. Količina vode koju prikupljaju ovisi o vanjskim temperaturama zraka, relativnoj vlažnosti i jačini pčelinje zajednice. Djelomične potrebe za vodom pčele mogu podmiriti iz skupljenog nektara (ZACHARY, 2010.).

Prihranjivati možemo tekućom (šećerni sirup) ili krutom (pogače) hranom. Ovisno o godišnjem dobu, vremenskim i pašnim prilikama, udaljenosti pčelinjaka te troškovima odlučujemo koju vrstu prihrane koristiti (SOMERVILLE, 2000.). Šećerne, odnosno peludne pogače pogodne su za pčelare s udaljenim pčelinjacima jer su dugotrajnije. Nadalje, kod korištenja pogača, smanjena je mogućnost pojave grabeži. Kod primjene stimulativnog prihranjivanja tekućom hranom (šećernom otopinom) daju se male količine šećerne otopine (dva do tri decilitra u omjeru 1:1) svaki drugi dan. Pritom treba paziti da se ne izazove grabež na pčelinjaku.

Nadalje, stimulativno prihranjivanje tekućom hranom provodi se kad su noćne temperature iznad 12 °C, te dnevne između 15 i 20 °C (TOMLJANOVIĆ i sur., 2020.). Podražajno (stimulativno) prihranjivanje preporučuje se tijekom proljeća i ljeta kada nema dostatnog unosa prirodne hrane u košnicu. Tada matica instiktivno smanjuje zalijeganje jaja, a dugotraniji nedostatak hrane može uzrokovati značajno smanjenje populacije odraslih pčela (SOMERVILLE, 2000.). Podražajnim prihranjivanjem stvara se privid unosa nektara i peluda, maticu se potiče na nesenje jaja te zajednica ne smanjuje svoj biološko - uzgojni potencijal (TOMLJANOVIĆ i sur., 2020.).

Vruća ljeta i posljedična suša te nedostatak peludno – nektarne paše može negativno utjecati na razvoj pčelinje zajednice te dovesti do smanjene nesivosti matice te ulaska u zimu s malim brojem pčela u zimskom klupku. Takva pčelinja zajednica ne može sebi osigurati dovoljnu količinu hrane za zimu, tako da je potrebno dodatno prihranjivanje. Najčešće se tada koristi veća količina šećerne otopine (20 litara u omjeru 1:1) odjednom ili u nekoliko obroka. Ovim postupkom osigurava se dovoljna količina hrane za zimu, potiče se maticu na nesivost dok je u prirodi suša te se osigurava pogodna količina i pravilan raspored meda za zimu u košnici. U hranilicu se, najčešće početkom kolovoza, stavi odjednom ili u nekoliko dana oko 20 litara šećerne otopine u omjeru 1:1. Pčelinja zajednica će popiti, preraditi i spremiti šećer u medište košnice. Pčelar rotira nastavke te nastavak s medištem dolazi na podnicu. S obzirom da pčele ne trpe da im se med nalazi kod leta košnice, počinju prebacivati med iz donjeg nastavka u gornji i time potiču maticu na nesenje. Biološko - uzgojni potencijal pčelinje zajednice jača, zajednica ulazi u zimu s dovoljnom količinom odraslih pčela, te se osigurava dovoljna količina hrane koju će pčele koristiti tijekom zimskih mjeseci. Uz šećernu pogaču, koristiti se može proteinska pogača kod nestanka peluda u prirodi kao pomoć u prehrani pčelinjeg legla.

Kasno ljetno i jesensko prihranjivanje pčelinjih zajednica uključuje davanje dvije do tri litre dnevno mješavine šećera i vode u omjeru 3:2, odnosno, 2:1. Ovaj način prihranjivanja primjenjuje se kada pčelinja zajednica nije osigurala dovoljne količine hrane za zimu na kasnim medonosnim pašama. Tijekom zimskih mjeseci dodavanje pogača ili šećerne otopine kontraindicirano je jer se time stvara privid unosa hrane izvana. Nadalje, to potiče maticu na nesenje jaja te zbog hranjenja pčelinjega legla dolazi do trošenja zaliha hrane. Zima je vrijeme kada bi pčele i priroda trebale mirovati. U slučaju provođenja loših pčelarskih praksi tijekom ljeta ili prikupljene male količine zaliha hrane u košnici, pčelar je primoran provoditi hranjenje iz nužde. Pčelar može prihranjivati zajednicu pogačama, no ova radnja ima neizvjesan ishod

budući da matica počinje s nesenjem i razvojem legla, što doprinosi trošenju hrane. Zaključno, hranjenje iz nužde je zadnja mjera koju se u pravilu, treba izbjegavati (TOMLJANOVIĆ i sur., 2020.).

## 2.2. Probavni sustav pčele

Probavni sustav pčele sastoji se od usnog aparata, žlijezda koje su vezane s prednjim crijevom i probavne cijevi. Usni aparat prilagođen je za grizenje i sisanje, a građen je od prednjeg i stražnjeg dijela. Prednji dio čini gornja usna (*labrum*), mala hitinska pločica te parna gornja mandibula ili vilica (*mandibula*). Gornja vilica građena je od dvije hitinske pločice čija je funkcija uzimanje peludi, gradnja saća te uzimanje krute hrane. Stražnji dio usnog aparata formirao se u *rilce* koje čine dijelovi donje vilice i donje usne (*labium*), odnosno podbradak (*submentum*), duguljasta bradica (*mentum*), jezik (*glossa*) i dva usna pipala (*palpi labiales*). Jezik je građen od hitinskih prstenova, tanak je i duguljast te je posut dlačicama po cijeloj površini. Rilce služi za usisavanje tekuće hrane, vode i nektara (TOMAŠEC, 1949.; DAVIS, 2011.; STELL, 2012.).

U dijelu probavnog aparata koji se nalazi u glavi, izlaze izvodni kanali triju žlijezda koje imaju važnu ulogu u probavi te prehrani legla. To su čeljusna žlijezda, mliječna žlijezda te žlijezda slinovnica (STELL, 2012.; KANE i FAUX, 2021.). Čeljusna žlijezda (*glandula mandibularis*) najbolje je razvijena kod matice. Leži na osnovi gornjih čeljusti te njezin izvodni kanal ulazi u usnu šupljinu, a izlučina otapa vosak, propolis i kožicu peludnih zrnaca, sprječava klijanje peluda te izlučuje spolno privlačni hormon. Mliječna ili ždrijelna žlijezda (*glandula pharyngealis*) parna je žlijezda koja se razvijena nalazi samo u pčela radilica, dobi od 8 do 12 dana starosti. Smještena je u prednjem gornjem dijelu glave. Žlijezda stvara i izlučuje matičnu mliječ, bijeli, gusti sekret primarno za prehranu pčelinjeg legla. Matična mliječ visoko vrijedna je izlučina koja sadrži velike količine bjelančevina, šećera, masti, te vitamina.

Žlijezdu slinovnicu (*glandula labialis*) čine prsna (*gandula thoracalis*) i tjemena žlijezda (*glandula occipitalis*). Razvijena je već u stadiju pčelinje ličinke i tada izlučuje predivo za košuljicu buduće kukuljice. U odraslih pčela, žlijezda izlučuje alkaličnu slinu koja sadrži različite enzime, kao i gušći sekret za podmazivanje usnog aparata i primjesa pri gnječenju listića voska za uspješniju gradnju saća (TOMAŠEC, 1949.).

Probavnu cijev (*tubus alimentarius*) čine tri dijela: prednje cijevo, srednje te zadnje crijevo. Prednje crijevo (*stomodaeum*) sastoji se od ždrijela, jednjaka i mednog mjehura te ima funkciju dovođenja hrane. Ždrijelo (*pharynx*) je kanal koji povezuje usta s jednjakom. Kroz njega hrana polazi dalje u probavni sustav. Jednjak (*oesophagus*) uska je cijev koja ulazeći u šupljinu zadka naglo se proširuje te prelazi u medni mjehur (*ingluvies*). Funkcija mednog mjehura je privremeno spremište tekuće hrane, odnosno nektara. U njemu se ne odvija probava te ne vrši sekretornu funkciju. Dio hrane koji je potreban pčelama za održavanje organizma i obavljanje fizioloških funkcija propušta se dalje u srednje crijevo, a ostatak pčele povrate kada se vrate u košnicu te predaju drugim pčelama, koju one odnose u stanice saća (TAUTZ, 2008.).

Međucrijevo, zadnji dio prednjeg crijeva povezuje medni mjehur sa srednjim crijevom (*mesenteron ventriculus*). Srednje crijevo ima najvažniju probavnu funkciju, u njemu se odvija probava hrane i apsorpcija osnovnih hranjivih tvari. Tamo nalazimo probavne enzime amilazu, invertazu, proteazu i himozin (KANE i FAUX, 2021.). Stijenka srednjeg crijeva sastoji se od uzdužnog i poprečnog mišićnog sloja. Prema lumenu crijeva na vezivno - tkivnoj bazalnoj membrani nalaze se visoki cilindrični epitel (enterociti). Preobrazbom najgornjeg plazmatskog sloja epitelnih stanica nastaje *rabdorium*, odnosno poprečno - prugasti rub kojem su presvučene epitelne stanice u mirovanju. *Rabdorium* se djelomično odljepljuje zbog sekretorne funkcije epitelnih stanica i formira peritrofnu membranu koja obavija hranu u srednjem crijevu. Membrana propušta probavne sokove do hrane, a probavljenu hranu k stijenci crijeva radi resorpcije, te se tako odvija probava (DAVIS, 2011.; STELL, 2012.).

Zadnje crijevo (*proctodaeum*) sastoji se od tankog crijeva i rektuma koji ima odvodnu funkciju. Na početnom dijelu tankog crijeva nalaze se ušća Malpighijevih cjevčica čija je uloga izlučivanje štetnih tvari iz organizma, odnosno njegova je ekskretorna funkcija. Zadnje crijevo završava proširenim dijelom ili rektumom. Stijenka mu je naborana te elastična, tako da se šupljina može povećati. Pčele uglavnom defeciraju izvan košnice, osim kod pojavi bolesti (nozemoza) ili dugih zima. Tijekom hladnih zimskih dana kada ne mogu izlijetati, u rektumu se nakuplja izmet. Kada je vanjska temperatura zraka viša od 12 °C, pčele izlaze iz košnice i pročiste se, a ova radnja naziva se pročisni izlet (TOMAŠEC, 1949.).

### 2.3. Mikrobiom crijeva pčele radilice

Sve više je spoznaja da crijevni mikrobiom pčele sudjeluje u regulaciji njenih važnih fizioloških funkcija, uključujući i zdravlje. Nedavna istraživanja pokazala su da medonosne pčele i bumbari imaju jedinstven mikrobiom koji nije u takovom obliku ni sastavu prisutan kod solitarnih pčela. Stoga, smatra se da socijalni prijenos hrane i informacija te organizirana podjela rada olakšavaju prijenos crijevnih bakterija i omogućuju koevoluciju domaćina i korisnih bakterija koje mogu biti ključne za zdravlje pčela. Zbog malog broja bakterija koje dominiraju u njihovom crijevu kao i sposobnosti uzgajanja bakterija *in vitro*, odnosno u laboratorijskim uvjetima, medonosne pčele služe kao odličan model za razumijevanje procesa koje čine specijalizirane crijevne zajednice kao i putova kojima iste zajednice utječu na biologiju domaćina (JONES i sur., 2018.).

Mikrobiom crijeva medonosne pčele utječe na prehranu domaćina, povećanje tjelesne težine, endokrinu signalizaciju, imunološke funkcije i posebice, otpornost na patogene, dok poremećaj u mikrobiomu može dovesti do promjena u navedenim funkcijama. Kao i u ljudi, mikrobiom se nalazi u zadnjem dijelu crijeva, gdje sudjeluje u probavi i fermentaciji biljnih komponenta.

Kako pčele radilice prolaze kroz različite razvojne stadije, tako se mijenja brojnost bakterija. Crijevo ličinke sadrži mali broj bakterija, često premalo da bi se otkrilo korištenjem standardnim PCR-om. Nakon završenog stadija kukuljice, mlada pčela prožvače voštani čep koji su radilice izradile. Te mlade pčele gotovo su bez bakterija, iako se neke bakterije mogu unijeti prilikom žvakanja. Karakteristični sastav crijevnog mikrobioma uspostavlja se kroz socijalne interakcije s drugim radilicama kroz prve dane života tijekom obavljanja zadataka čistačica. Broj bakterija raste logaritamski sve dok se zajednica oko četvrtog dana ne stabilizira na  $10^9$  bakterijskih stanica (ZHENG i sur., 2018.).

Zajednicom crijevnog mikrobioma dominira 7 dominantnih skupina, koje zajedno čine više od 95% cijelog mikrobioma. Dosljednost ovih dominantnih skupina utvrđena je među pčelama iz različitih košnica, čak i sa različitih kontinenata (MORAN i sur., 2012.). Jednom uspostavljen mikrobiom, malo se mijenja, unatoč sezonskim promjenama i promjenama u ponašanju te prehrani (ZHENG i sur., 2018.).

Mikrobiom crijeva pčele sastoji se od četiri glavne vrste Proteobacteria (*Gilliamella apicola*, *Snodgrassella alvi*, *Frischella perrara*, *Bartonella apis*), koje uglavnom žive u tankom crijevu (TLAK GAJGER i sur., 2023.), te dvije vrste Firmicute (*Lactobacillus spp. Firm-4* i *Firm-5*) i jedne vrste Actinobacterium (*B. asteroides*), koji se pretežno nalaze u rektumu. Ove specifične lokacije sugeriraju da bakterije zauzimaju različite metaboličke niše u crijevima pčela i potencijalno sudjeluju u sintrofičkim interakcijama (KEŠNEROVA i sur., 2017.). Dok se *Lactobacillus Firm-4* i *Firm-5* rijetko otkrivaju izvan crijeva, druge vrste *Lactobacillus*, primjerice *Lactobacillus kunkeei*, mogu se pronaći unutar košnice i na različitim materijalima iz košnice (ZHENG i sur., 2018.).

*G. apicola* omogućuje razgradnju kompleksnog ugljikohidrata pektina koji se nalazi u stijenci peludnih zrnaca. Tijekom procesa fermentacije, bakterije proizvedu veliku količinu acetata i drugih kratkolančanih masnih kiselina. Glavni proizvođač proizvoda fermentacije sukcinata i pimelata je *Lactobacillus Firm-5*, dok je *B. asteroides* glavni proizvođač valerata. Nadalje, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus Firm-4* i *Firm-5* mogu probaviti druge sastavina peludi, primjerice flavonoide i  $\omega$ -hidroksi kiseline i fenolamide. U crijevu, anoksiju održava *S. alvi* tako da koristi acetat za uklanjanje kisika koji prodire u crijeva i važna je za održavanje stabilnog gradijenta kisika.

Prema istraživanjima u kojima su uspoređivane pčele radilice bez razvijenog mikrobioma s konvencionalnim radilicama pokazala je da je crijevi mikrobiom potreban za normalno dobivanje na tjelesnoj masi (ZHENG i sur., 2017.). Ovaj podatak može se povezati s promjenama u endokrinoj signalizaciji i ekspresiji gena, uključujući promjene u inzulinskoj signalizaciji i povećanju razine vitelogenina, koji regulira nutritivni status kod medonosnih pčela. Smatra se da crijevni mikrobiom može utjecati na ponašanje tako da mijenja razine biogenim amina, kao što su oktopamin, dopamin i serotonin. Razine spomenutih amina značajno su niže u mozgu mladih pčela bez mikrobioma u odnosu na mozak kod starijih pčela. Bitno je napomenuti da razine ovih amina u mozgu variraju sezonski, a više su ljeti kada je aktivnost pčela u traženju hrane najveća. Nadalje, pčele s prirodno razvijenim mikrobiomom spremnije reagiraju na unos saharoze, te se stoga uzimaju više hrane (ZHENG i sur., 2018.).

Uloga mikrobioma u zaštiti pčele je u izravnom stimuliranju imunskog sustava, odnosno aktivacija urođene imunosti. Iako još nedovoljno istraženo, smatra se da pčele imaju slične signalne putove poput onih u vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) u koje crijevne bakterije izazivaju imunološki odgovor (KWONG i MORAN, 2017.). Tijekom imunološkog odgovora, pojačavaju se imunološki efektori, uključujući antimikrobne peptide (AMP). To su



kratki peptidi, a u pčela nalaze se sljedeći: abaecin, apidaecin, defensin i himenoptaecin (VIDAL-NAQUET, 2015.). Antimikrobnu aktivnost većinom postižu izmjenom osobina mikrobnih membrana i unutarstaničnih metaboličkih procesa. *S. alvi* kolonizira tanko crijevo te raste u kontaktu s epitelom crijeva, dok *G. apicola* raste na vrhu crijevnog epitelnog sloja, te tako zajedno tvore gusti biofilm. Iako, navedeni obrambeni mehanizam kod pčela nije razjašnjen, pčele s poremećenim sastavom crijevnog mikrobioma češće ugibaju kada su izazvane oportunističkim patogenom bakterijom *Serratia marcescens*. Smatra se da gusti biofilm blokira pristup patogenih mikroorganizama epitelnim crijevnim stanicama domaćina, te ih tako fizički sprječava ili antagonizira. Primjerice, metabolizam crijevnih mikroorganizama snižava pH lumena crijeva i razinu kisika te stvara kratkolančane masne kiseline (SCFA) koje inhibiraju virulentnost i rast patogenih mikroorganizama u miševa (HORAK i sur., 2020.).

Zbog malog broja bakterija koje dominiraju u njihovom crijevu, kao i sposobnosti uzgajanja bakterija *in vitro*, odnosno u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, medonosne pčele služe kao odličan model za razumijevanje procesa koje čine specijalizirane crijevne zajednice, kao i putova kojima iste zajednice utječu na biologiju domaćina.

#### 2.4. Vairimorfoza (Nozemoza)

Nozemoza je nametnička bolest odraslih pčela, raširena posvuda u svijetu. Uzrokovana je mikrosporidijama *Vairimorpha (Nosema) apis* i *Vairimorpha (Nosema) ceranae* (TOKAREV i sur., 2020.).

Prema TOKAREVU i suradnicima (2020.) porodica *Nosematidae* je redefinirana te uključuje rodove *Nosema* i *Vairimorpha*. Ova dva roda zajedno spadaju u razred Microsporidia. Naime, iako rod *Nosema* i *Vairimorpha* sadrži dvije genetski različite skupine, njihove se morfološke i razvojne značajke preklapaju u potpunosti. Kao rezultat toga, neke vrste koje su tradicionalno klasificirane u rod *Nosema*, primjerice *N. apis*, *N. bombi* i *N. ceranae* filogenetski su mnogo bliže vrsti *Vairimorpha necatrix*. Nedavna istraživanja pokazala su primjerice da rodovi *Nosema* i *Vairimorpha* sadrže vrste koje su jednojezgrene tijekom cijelog životnog ciklusa.

Mirkosporidije su jednostanične nametničke gljive prilagođene obvezatnom unutarstaničnom načinu života, dok izvan domaćina postoje kao metabolički neaktivne, ali infektivne spore (GISDER i sur., 2017.). Spore *Nosema apis* vrlo su otporne, a ugibaju na

temperaturi od 65 °C za jednu minutu, dok na niskim temperaturama mogu ostati zarazne od nekoliko dana do pet godina (SIMEUNOVIĆ i sur., 2014.), dok su spore *N. ceranae* puno osjetljivije na niske temperature.

Nozemozu tipa A uzrokuje mikrosporidija *N. apis*, a tip C uzokuje *N. ceranae*. Prije se smatralo da je uzročnik *N. apis* specifičan za zapadnu medonosnu pčelu (*Apis mellifera*), dok je *N. ceranae* bila parazit istočne medonosne pčele (*A. cerana*) u južnoj i jugoistočnoj Aziji. No, posljednjih 30 godina utanovljena je prirodna infekcija zajednica zapadne medonosne pčele (*A. mellifera*) nametničkom gljivom *N. ceranae*. *N. ceranae* se proširila u populacijama zapadne medonosne pčele te je čak postala i dominantna. U današnje vrijeme *N. ceranae* očigledno na europskom području zamijenjuje *N. apis* u pčelinjim populacijama (GISDER i sur., 2017.), a smatra se puno virulentnijom i opasnijim nametnikom od *N. apis* (KRZNAR i sur., 2015.).

Smatra se da bi invazije *N. ceranae* mogle uzrokovati slabljenje pčelinjih zajednica u zemljama južne Europe koje imaju topliju klimu, dok gubitci pčelinjih zajednica utvrđeni u sjevernoj Europi i Americi do sada nisu značajno povezani s invazijama *N. ceranae*. HIGES i sur. (2008.) utvrdili su vezu između *N. ceranae* i propadanja pčelinjih zajednica. Prema njima, košnice zaražene mikrosporidijom *N. ceranae* prolaze takozvanu „fazu inkubacije“. Tada matica može nesenjem dovoljno jaja nadoknaditi gubitak radilica. Tijekom ove faze, klinički znakovi bolesti nisu prisutni, no kada je više od 80% pčela zaraženo s više od 10 milijuna spora, dolazi do njihovo propadanja. Matica više ne može kompenzirati pojačanim polaganjem jaja, te se broj radilica naglo smanjuje, obično tijekom druge sezone i zajednica propada uobičajeno pred zimovanje.

Najčešći način prijenosa mikrosporidija je horizontalni, odnosno fekalno – oralni prijenos. Invadirane odrasle pčele izmetom izlučuju velik broj dugoživućih spora uzročnika. Iako u manjoj mjeri, vertikalni prijenos je moguć, jer je DNK uzročnika pronađen i u jajnicima matice. Izvor zaraze može biti saće uprljano izmetom pčela, voda na nehidijenskim pojilištima, te med onečišćen sporama. Uzročnik se može širiti među pčelinjim zajednicama, gdje veliku ulogu ima pčelar primjenom različitih api-tehničkih postupaka na pčelinjaku, primjerice premještajući okvire sa zaraženim saćem iz jedne košnice u drugu (MARIN-GARCIA i sur. 2022.).

Odrasla pčela unese infektivnu sporu onečišćenom hranom ili vodom. Spore u srednjem crijevu prokljuju te istiskuju polarnu cjevčicu. Sporoplazma pomoću polarnog filameta koji probije staničnu membranu bude unesena u epitelne stanice crijeva. Nakon ubrizgavanja

sporoplazme, potrebno je 96 sati da u zaraženoj stanici počnu stvarati nove infektivne spore. Lizom stanica spore budu oslobođene u lumen crijeva te ih pčele defekacijom izbacuju u okoliš (GISDER i sur., 2017.).

Nozemoza tipa C ima složenu patogenezu. Mijenja fiziologiju i ponašanje pčele, ali i cjelokupne pčelinje zajednice. Ovisno o dobi, svaka radilica ima određenu funkciju unutar i izvan košnice. Mlađe pčele su spremačice, hraniteljice i graditeljice te žive i rade u košnici, dok su poslovi izvan košnice (skupljačice) rezervirani za starije pčele. Hormoni vitelogenin i juvenilni hormon III (JH) fiziološki su regulatori na kojima se temelji razvoj ponašajnih obrazaca kod pčela. Vitelogenin ima višestruku ulogu u zdravlju medonosne pčele; neophodan je za razvoj jajašca, te sudjeluje u modulaciji upalnih odgovora kod pčela. Sadrži antioksidativna svojstva te služi kao rezerva hranjivih tvari (GOBLIRSCH i sur., 2013.). Infekcija *N. ceranae* remeti feromonsku ravnotežu u zajednici. Zaražene matice pokazuju povećane titre vitelogenina, a radilice pokazuju više koncentracije juvenilnog hormona (JH) (MARIN-GARCIA i sur., 2022.). Prema ARESU i suradnicima (2012.) u pokusnim uvjetima pčele zaražene *N. ceranae* imale su veće koncentracije juvenilnog hormona u hemolimfi, što sugerira da sazrijevanje se događa ranije od nezaraženih pčela ili onih zaraženih *N. apis*.

Utvrđeno je da invazija *N. ceranae* izaziva energetske stres koji se očituje povećanim apetitom. Dokazane su i promjene u sastavu i koncentracijama aminokiselina, lipida i rezervama ugljikohidrata. Smanjuje se sposobnost letenja zbog energetske stresa ili dezorijentiranosti. U zaraženim pčela dolazi do atrofije hipofaringealnih žlijezda, koje izlučuju proteine matične mliječi. *N. ceranae* također može utjecati na ponašanje zajednice, odnosno smanjenom proizvodnjom meda i manjim brojem pčela radilica u zaraženim košnicama (MARIN-GARCIA i sur., 2022.).

Nozemoza tipa C ima kroničan tijek, dugo inkubacijsko razdoblje, a praćena je nespecifičnim kliničkim simptomima ili može proći potpuno asimptomatski. Posljedica brzog umnažanja uzročnika u epitelnim stanicama srednjeg crijeva pčela smanjena je učinkovitost njihove probave. Naime, pčele troše više hrane jer ne mogu pravilno probaviti pelud i med. Dolazi i do poremećaja razvoja drugih organa, primjerice pčelama su slabije razvijene mliječne žlijezde, a u matica jajnici (MARIN-GARCIA i sur., 2022.).

U rano proljeće i pred uzimljanje, javljaju se najveći gubitci kao posljedica invazija uzročnicima nozemoze tipa C. Ugiba veliki broj odraslih pčela, pčelinja zajednica naglo slabi, a tijekom jačih invazija može i potpuno propasti. Životni vijek invadiranih pčela je značajno

kraći (u prosjeku za 9 dana), čime je smanjen prinos meda i drugih pčelinjih proizvoda (TLAK GAJGER, 2019.).

Za laboratorijsko utvrđivanje prisutnosti i kvantifikacije spora *Nosema* spp. koristi se mikroskopska pretraga nativnog crijevnog sadržaja odraslih pčela. Za diferencijalnu dijagnostiku *N. apis* i *N. ceranae* najčešće korištena molekularna metoda je višestruki PCR.

Prema važećim normativnim aktima u Europskoj uniji (EU), nije dopuštena uporaba antibiotika za liječenje pčelinjih bolesti (EU 3/01/081) zbog mogućnosti pojave rezistencije na višekratno rabljene kemoterapeutike, recidive bolesti te zbog utvrđivanja štetnih tvari antibiotika u pčelinjim proizvodima (TLAK GAJGER, 2017.). Trenutno ne postoji registriran i odobren veterinarsko medicinski proizvod za tretiranje pčelinjih zajednica protiv nozemoze tipa C. Zato se prilikom prihranjivanja pčelinjih zajednica dodavaju različiti dodatci hrani biljnog, vitaminsko-mineralnog ili proteinskog sastava. Oni u većoj ili manjoj mjeri mogu suprimirati umnažanje spora *N. ceranae*, a time i smanjiti stupanj invadiranosti njenim sporama. Iako bolesnu zajednicu primjenom dodataka hrani za pčele nije moguće u potpunosti izliječiti, može se značajno utjecati na omogućavanje suživota opisanog nametnika i invadirane pčelinje zajednice (TLAK GAJGER i sur., 2015.).

U svrhu kontroliranja i sprječavanja nastanka pčelinjih bolesti nužno je provoditi profilaktičke mjere dobrih pčelarskih i biosigurnosnih praksi. Dobra pčelarska praksa je skup pravila i uputa prema kojima se pčelar vodi i koje provodi u svom pčelinjaku. Daje garanciju za opću dobrobit zajednica pčela, okoliša i ljudi te je temelj za održivi razvoj pčelarstva (TOMLJANOVIĆ i sur., 2020.). Jedna od smjernica dobrih pčelarskih praksi je provesti pravilnu pripremu za aktivnu sezonu, ali i uzimljanje pčelinjih zajednica. Pčelinje zajednice u tom periodu trebaju imati dobro razvijeni imunostni sustav te dovoljnu količinu kvalitetne hrane pohranjene u saću (TOMLJANOVIĆ i sur., 2012.). Zbog toga je važno prihranjivanje u kasno ljeto ili jesen, dok matica polaže jaja (RIBARIĆ, 2016.).

Nadalje, važno je redovito kontrolirati jačinu i zdravstveno stanje zajednica, a u slučaju promjena u ponašanju odraslih pčela ili fiziološkom izgledu pčelinjeg legla treba potražiti savjet doktora veterinarske medicine.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Lokacija i izgled pokusnog pčelinjaka

Pčelinjak na kojemu je provedeno istraživanje nalazi se na otoku Cresu, na istočnoj strani otoka. Smješten je oko dva kilometra od sela Hrasta, te predstavlja stacionarni tip pčelinjaka. Na pčelinjaku nalazi se 40 pčelinjih zajednica koje su smještene u Langstroth-Root tipu košnica (Slika 1.), koje su vertikalni tip košnice i kojih su svi dijelovi standardizirane izrade te jednakih dimenzija. Istraživanje je provedeno na 24 pčelinje zajednice od kojih je 12 predstavljalo kontrolnu skupinu (ŠP-K) prihranjivanu komercijalnim šećernim pogačama. Zajednice u pokusnoj skupini (PrP-P) prihranjivane su komercijalnom proteinskom pogačom (12) koja sadrži proteinske zamjenice (bez pčelinjeg peluda).



Slika 1. Izgled proizvodnog pčelinjaka na kojem je obavljen terenski dio istraživanja.

#### 3.2. Prihranjivanje pčelinjih zajednica

Prihranjivanje pčelinjih zajednica provedeno je nakon inicijalnog uzorkovanja odraslih pčela početkom travnja 2023. godine. Nakon prvog davanja pogača zajednice su pregledavane svakih dva tjedna. Nakon 60. dana od inicijalnog uzorkovanja i pregleda pčelinjih zajednica ponovno je izvršeno uzorkovanje odraslih pčela. Polovicom kolovoza sve pčelinje zajednice

ponovno su prihranjene pripadajućom pogačom, a treće uzorkovanje odraslih pčela obavljeno je nakon 30 dana od drugog termina prihranjivanja, odnosno 90 dana od prvog prihranjivanja.

### 3.3. Uzrokovanje

Prilikom uzorkovanja u čistu plastičnu posudicu zapremine 120 mL uzete su odrasle pčele s perifernih okvira izravno sa saća. Svaka posuda je dobro zatvorena, označena i pohranjena na led u prijenosni hladnjak. Svaki uzorak sadržavao je cca. 60 odraslih pčela što čini standardni uzorak pri laboratorijskom kvantitativnom pretraživanju na nozemozu.

### 3.4. Laboratorijska mikroskopska pretraga

Nakon prikupljana uzoraka odraslih pčela na terenu, uzorci su spremljeni u plastične vrećice te pohranjeni u zamrzivaču na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do pretraživanja. Tijekom pripreme za laboratorijsko pretraživanje, iz svake je vrećice nasumično izvučeno 10 pčela te stavljeno u plastičnu čašu. U čašu je dodano 10 mL destilirane vode, a uzorak pčela dobro je zgnječen plastičnim štapićem kako bi se oslobodio sadržaj crijeva te promiješan kako bi se dobio što homogeniji uzorak za pretraživanje pod svjetlosnim mikroskopom (Slika 2. i 3.). Dobivenu suspenziju crijevnog sadržaja pretraživanih pčela uziman je jednokratnom pipetom te stavljen po dvije kapi na Malassezijev hemocitometar te prekriven pokrovnim stakalcem za mikroskopiranje.



Slika 2. Priprema mikroskopskog preparata.

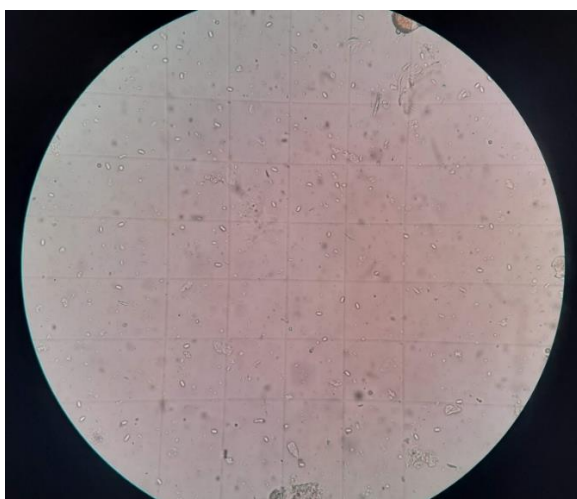
Izvor: I. Tlak Gajger



Slika 3. Pripremljeni uzorak za pretraživanje pod svjetlosnim mikroskopom.

Izvor: I.Tlak Gajger

Malassezijeve hemocitometar se sastoji od 25 pravilno raspoređenih kvadrata. Svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem od 400x pregledani se uzorci nativnog homogenata sadržaja pčelinjih crijeva, a utvrđene spore *Nosema* spp. su izbrojane na ukupno pet kvadrata. Aritmetička sredina broja spora *Nosema* spp. izbrojenih u pet kvadrata hemocitarske mrežice predstavlja broj spora po pčeli ( $x \cdot n^5$ ). Svaki uzorak pripremljene nativne suspenzije crijevnog sadržaja prebrojan je u triplikatu. Spore *Nosema* spp. pravilnog su ovalnog oblika s tamnijim obrubom, a pretraživanje je napravljeno pomoću svjetlosnog mikroskopa pri povećanju 400 x (Slika 4.).



Slika 4. Nativni preparat crijevnog sadržaja pčele s vidljivim sporama *Nosema* spp. pod svjetlosnim mikroskopom, povećanje 400x.

### 3.5. Statistika

Dobiveni podaci obrađeni su korištenjem računalnog programa GraphPad Prism 8, a za utvrđivanje razlika između pokusnih i kontrolnih skupina pčelinjih zajednica, odnosno utvrđenom prosječnom broju spora *Nosema* spp. korišten je neparametrijski Kruskal-Wallis test.

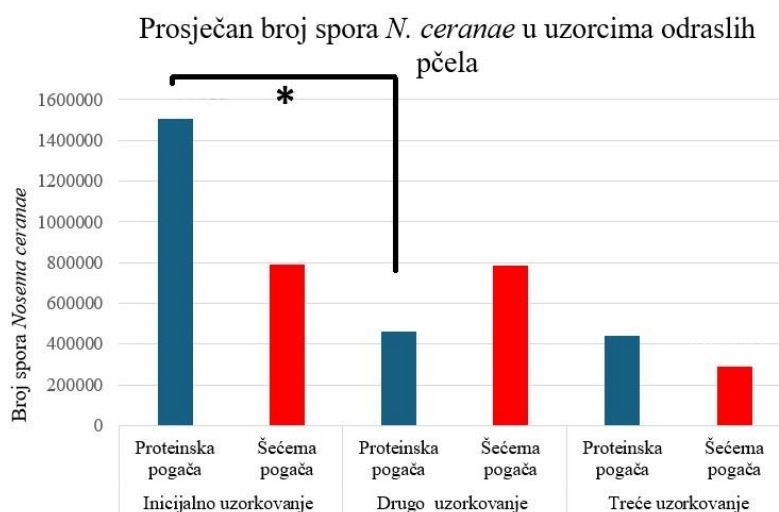


#### 4. REZULTATI

U provedenom istraživanju ukupno je prikupljeno 72 uzorka, od čega je iz svakog uzorkovanja pretraženo po 24 uzorka, točnije 12 uzoraka odraslih pčela uzetih iz kontrolnih pčelinjih zajednica prihranjivanih šećernom pogačom, te 12 uzoraka iz pčelinjih zajednica u pokusnoj skupini prihranjivanih proteinskom pogačom.

Prosječan broj utvrđenih spora *N. ceranae* u inicijalnom uzorkovanju iznosio je 1.503 za pokusnu skupinu, a 790 000 za kontrolnu skupinu (Tablica 1.). Nakon početnog uzorkovanja, pčelinje zajednice prihranjivane su proteinskim i šećernim pogačama. Nakon 60 dana izvršeno je drugo uzorkovanje pri čemu je laboratorijskim pretraživanjem utvrđen prosječan broj spora *N. ceranae* u pokusnoj skupini 460 000, a kontrolnoj skupini 783 333 spora (Tablica 2.). U zadnjem, trećem uzorkovanju prikupljeno je novih 24 uzoraka odraslih pčela koje su mikroskopski pregledane te je izračunat prosječan broj spora *N. ceranae* u pokusnoj skupini iznosio 441 666 a kontrolnoj skupini 288 333 spora (Tablica 3.)

Iako nisu utvrđene značajne razlike u broju spora *N. ceranae* između kontrolnih i pokusnih skupina pčelinjih zajednica, iz laboratorijskih nalaza za drugo i treće uzorkovanje može se uočiti trend smanjenja broja spora *N. ceranae* kod pčelinjih zajednica prihranjivanih i šećernim i proteinskim pogačama (Slika 5.). Međutim, promatrajući pokusnu skupinu prihranjivanu proteinskom pogačom kod drugog uzorkovanja, odnosno nakon prvog prihranjivanja utvrđena je statistički značajna razlika ( $p > 0,5$ ), odnosno primijećeno je značajno smanjenje u broju spora *N. ceranae*.



Slika 5. Prikaz prosječnog broja spora *N. ceranae* na početku i tijekom prihranjivanja šećernom i proteinskom pogačom, \* $p < 0,5$ .

Tablica 1. Prosječan broj spora (n) i broj spora *N. ceranae* po pčeli (N) za pokusne (prihranjivane proteinskim pogačama) i kontrolne (prihranjivane šećernim pogačama) skupine pčelinjih zajednica nakon inicijalnog uzorkovanja.

Šećerna pogača												
	1.k	2.k	3.k	4.k	5.k	6.k	7.k	8.k	9.k	10.k	11.k	12.k
1.	0	0	8	0	0	15	8	8	1	0	30	0
2.	4	2	2	2	1	10	15	8	0	2	23	8
3.	5	1	0	5	0	17	15	18	3	0	27	12
4.	2	2	1	0	2	20	11	19	5	5	34	9
5.	8	5	2	0	8	18	6	18	7	6	30	6
zbroj	19	10	13	7	11	80	55	71	16	13	144	35
n	4	2	3	1	2	16	11	14	3	3	29	7
N	380000	200000	260000	140000	220000	160000	110000	1420000	320000	260000	288000	700000
Proteinska pogača												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.	0	5	0	0	0	0	0	0	0	19	19	8
2.	0	15	0	0	0	0	0	0	0	13	18	12
3.	0	11	1	2	11	12	2	11	0	0	24	16
4.	4	9	5	6	5	3	4	3	2	0	19	10
5.	2	7	2	0	7	18	6	7	5	12	33	12
zbroj	6	47	8	8	23	33	12	21	7	44	113	58
n	1	9	2	2	5	7	2	4	1	9	23	12
N	120000	940000	160000	160000	460000	660000	240000	420000	140000	880000	226000	1160000

Tablica 2. Prosječan broj spora (n) i broj spora *N. ceranae* po pčeli (N) za pokusne (prihranjivane proteinskim pogačama) i kontrolne (prihranjivane šećernim pogačama) skupine pčelinjih zajednica nakon drugog uzorkovanja.

Šećerna pogača												
	1.k	2.k	3.k	4.k	5.k	6.k	7.k	8.k	9.k	10.k	11.k	12.k
1.	1	9	8	0	0	10	2	19	0	2	15	6
2.	3	7	4	2	0	12	3	23	1	1	20	10
3.	5	10	5	3	2	15	8	28	1	2	32	12
4.	0	12	2	3	3	10	9	35	0	3	12	9
5.	6	2	2	5	0	6	12	23	1	0	28	6
Zbroj	15	40	21	13	5	53	34	128	3	8	107	43
n	3	8	4	3	1	11	7	26	1	2	21	9
N	3000	800	420	260	100	1060	6800	25600	600	16000	21400	86000
	00	000	000	000	000	000	00	00	00	0	00	0
Proteinska pogača												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.	0	1	0	0	0	10	6	4	0	4	7	9
2.	0	3	0	2	0	6	15	12	0	4	9	10
3.	0	1	0	0	0	15	19	9	0	10	12	6
4.	2	2	0	0	0	7	13	10	0	7	18	8
5.	0	6	0	0	0	12	17	13	0	6	16	10
Zbroj	2	13	0	2	0	50	70	48	0	31	62	43
n	0	3	0	0	0	10	14	10	0	6	12	9
N	4000	260	0	400	0	1000	1400	96000	0	62000	12400	86000
	0	000		00		000	000	0		0	00	0

Tablica 3. Prosječan broj spora (n) i broj spora *N. ceranae* po pčeli (N) za pokusne (prihranjivane proteinskim pogačama) i kontrolne (prihranjivane šećernim pogačama) skupine pčelinjih zajednica nakon trećeg uzorkovanja.

Šećerna pogača												
	1.k	2.k	3.k	4.k	5.k	6.k	7.k	8.k	9.k	10.k	11.k	12.k
1.	0	0	1	0	0	2	0	22	0	0	1	3
2.	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	3	0
3.	0	2	3	1	0	3	0	12	0	0	8	4
4.	0	1	0	2	0	4	0	28	0	0	2	6
5.	0	2	0	2	0	0	0	33	0	0	6	6
Zbroj	0	5	4	5	0	9	0	111	0	0	20	19
n	0	1	1	1	0	2	0	22	0	0	4	4
N	0	100 000	800 00	100 000	0	1800 00	0	2220 000	0	0	400 000	380 000
Proteinska pogača												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.	0	0	0	0	8	56	7	2	0	0	2	2
2.	0	0	0	0	6	22	8	6	0	0	4	0
3.	0	0	0	0	12	18	12	4	0	0	1	0
4.	0	0	0	0	18	20	14	6	0	0	0	1
5.	0	0	0	0	2	14	7	8	0	0	2	3
Zbroj	0	0	0	0	46	130	48	26	0	0	9	6
n	0	0	0	0	9	26	10	5	0	0	2	1
N	0	0	0	0	920 000	2600 000	9600 00	5200 00	0	0	180 000	120 000

## 5. RASPRAVA

Prihranjivanje pčelinjih zajednica je uobičajeni api-tehnički postupak na pčelinjaku. Može se obavljati u više termina tijekom godine, a što najviše ovisi o dostupnosti prirodne hrane koja je različita tijekom pčelarske sezone. Posebice je važno redovito pregledavati pčelinje zajednice i pratiti količinu pohranjenih rezervi hrane u košnici kod pripreme zajednica za zimovanje. Također, uravnotežena prehrana pčelinjih zajednica postiže se povremenim dodatnim prihranjivanjem pčelinjih zajednica. Najčešći oblik prihranjivanja pčelinjih zajednica, osim šećernog sirupa, čine pogače (KATUŠIĆ, 2020., MAJOROŠ i sur., 2022.). Pogače dostupne na tržištu, kao i one pripremljene u kućnoj radinosti različitog su osnovnog sastava, te s ili bez dodataka. U prethodno objavljenim znanstvenim radovima istražen je utjecaj prihrana s različitim koncentracijama peludi ili dodataka hrani sačinjenih od proteinskih zamjena na stupanj invazije sporama *Nosema* spp., ublažavanje negativnih učinaka prihrane proteinskim dodacima dodavanjem pčelinje peludi, te na niz fizioloških pokazatelja. Pri tome utvrđeno je kako su skupine pčelinjih zajednica prihranjivane samo peludom uzimale više hrane te je mikroskopskom pretragom utvrđen manji broj spora *Nosema* spp., a u usporedbi s skupinama pčelinjih zajednica prihranjivanih čistim proteinskim dodatkom ili mješavinom peluda i proteinskih dodataka (WATKINS DE JONG i sur., 2019.).

U ovom istraživanju uspoređivan je učinak primjene proteinske pogače i šećerne pogače prije i poslije prihranjivanja pčelinjih zajednica na pčelinjaku u primorskom dijelu RH. Pri tome je pretraživan je učinak prihranjivanja pogačama na smanjenje broja spora *Nosema* spp. Iako je kod pokusnih pčelinjih zajednica u prosjeku došlo do smanjenja stupnja invadiranosti uzročnikom nozemoze, potrebno je naglasiti slabost istraživanja u koje je bio uključen mali broj pčelinjih zajednica i koje su u početku pokusa bile nejednolično prirodno invadirane sporama *Nosema* spp.

Navedeni rezultati u suglasju s s nizom ranije provedenih istraživanja o učinku dodataka hrane za pčele na stupanj invadiranosti uzročnicima nozemoze, i to *N. ceranae*, koja je jedina rasprostranjana na pčelinjacima u RH (TLAK GAJGER i sur., 2010.). Naime, na hrvatskim pčelinjacima i u laboratorijski kontroliranim uvjetima dosad je proveden niz istraživanja s primjenjenim prihranjivanjima različitim dodacima hrani za pčele (TLAK GAJGER, 2011.; TLAK GAJGER i sur., 2009.; 2009a; 2011.; 2015.; 2018.; 2020.; 2021.; 2023.).

Primjerice, prethodno je utvrđeno kako primjena EM® probiotika za pčele predstavlja dobru pčelarsku praksu koja se primjenjuje diljem svijeta. Primjena EM® probiotika za pčele u obliku dodatka prehrani do sada je pozitivno ocijenjena od strane pčelara kao dobra pčelarska praksa koja se primjenjuje na pčelinjacima diljem svijeta (TLAK GAJGER i sur., 2020.; TLAK GAJGER i sur., 2023.). Praćenjem probiotičkog učinka na jačinu i zdravstveno stanje pčelinjih zajednica, kao i kretanja stupnja invadiranosti *Nosema* spp. u tretiranim zajednicama, dokazano je njegovo pozitivno djelovanje u smislu preveniranja invazija nozemoze tipa C, te kao podrška u jačanju zajednica s ciljem očuvanja zdravog mikrobioma probavnog sustava pčela. Rezultati dobiveni u prijašnjim istraživanjima pokazali su željene učinke apliciranih probiotika podrijetlom iz crijevnog sustava pčela na opće stanje i proizvodnost prihranjivanih zajednica (MUDRUNOVA i sur., 2011.; AUDISIO i sur., 2015.; ALBERONI i sur., 2016.; CORBY-HARRIS i sur., 2016.; TLAK GAJGER i sur., 2023.; SMRITI i sur., 2024.). Također je primjenom šećernih prihrana obogaćenih pentadekapeptidom BPC 157, a praćenjem njegovog utjecaja na fiziološke i imunološke pokazatelje, kao i opće zdravstveno stanje pčelinjih zajednica, te broja spora mikrosporidija *Nosema* spp. u tretiranim zajednicama, dokazano je njegovo učinkovito djelovanje (TLAK GAJGER i sur., 2018.; 2020.).

U pčelarskoj praksi dokazano je kako registrirani dodatci prehrani koji su odobreni za uporabu u pčelarstvu mogu prevenirati jake invazije uzročnikom nozemoze tipa C, te služiti kao pripomoć u jačanju zajednica s ciljem očuvanja korisnog mikrobioma probavnog sustava pčela. Na Floridi je provedeno istraživanje u terenskim uvjetima pčelinjaka na ukupno 75 zajednica, a vezano za mogući utjecaj prihranjivanja komercijalnim proteinskim pogačama na jačinu zajednice te stupanj invadiranosti sporama *Nosema* spp. Pri tome autori su zaključili kako su pčele dobro uzimale pogače proizvođača BeePro, UltraBee, MegaBee, te značajno slabije zajednice prihranjivane pogačom Brood Builder (MORTENSEN i sur., 2018.). Tijekom provođenja pokusa broj spora *Nosema* spp. smanjio se u svim promatranim pčelinjim zajednicama tijekom travnja, i kontrolne i pokusne skupine (MORTENSEN i sur., 2018.).

Sličan rezultat interpretirala je ŠTAVALJ (2021.) nakon provedenog istraživanja na 19 lokacija pčelinjaka smještenih u kontinentalnom dijelu RH na ukupno 1119 pčelinjih zajednica koje su prihranjivane s dvije vrste komercijalne pogače. Kao kontrolna skupina služile su zajednice koje nisu prihranjivane.

Također, na Slici 5. je vidljivo da usprkos rezultatima koji nisu pokazali statistički značajnu razliku između kontrolne i pokusne skupine, došlo je do značajnog smanjenja broja spora *Nosema* spp. u skupini pčelinjih zajednica prihranjivanoj proteinskom pogačom uspoređujući tijek pokusa, posebice razliku inicijalnog i prvog termina uzorkovanja odraslih pčela.

## 6. ZAKLJUČCI

Iako u ovom istraživanju nisu utvrđene statistički značajne razlike u broju spora *Nosema* spp. između kontrolne i pokusne skupine pčelinjih zajednica, tijekom trajanja pokusa uočeno je značajno smanjenje broja spora *Nosema* spp. u pokusnoj skupini prihranjivanoj proteinskom pogačom uspoređujući početak i tijek istraživanja (inicijalno i prvo uzorkovanje). Stoga je bitno osigurati primjerenu prihranu kao pripremu za zimovanje i stimulatívni razvoj u rano proljeće, te u razdobljima loših vremenskih prilika kao bi pčelinje zajednice lakše nadomjestile potrebne zalihe hrane.



## 7. LITERATURA

- ALBERONI, D., F. GAGGIÀ, L. BAFFONI, D. DI GIOIA (2016): Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9469–9482.
- ARES A. M., M. J. NOZAL, J. L. BERNAL, R. MARTÍN-HERNÁNDEZ, M. HIGES, J. BERNAL (2012): Liquid Chromatography Coupled to Ion Trap-Tandem Mass Spectrometry to Evaluate Juvenile Hormone III Levels in Bee Hemolymph from *Nosema* spp. Infected Colonies. *J. Chromatogr. B* 899, 146 - 153. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.05.016.
- AUDISIO, M. C., D. C. SABATÉ, M. R. BENÍTEZ-AHRENDTS (2015): Effect of CRL1647 on different parameters of honeybee colonies and bacterial populations of the bee gut. *Benef. Microbes* 6, 687–695.
- BRODSCHNEIDER R., K. CRAILSHEIM (2010): Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41, 278-294. doi: 10.1051/apido/2010012.
- CORBY-HARRIS, V., L. SNYDER, C. A. D. MEADOR, R. NALDO, B. MOTT, K. E. ANDERSON (2016): *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., Improves Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Resistance to *Nosema*. *J. Econ. Entomol.* 1–7.
- DAVIS, C. F. (2011): *The honey bee, inside out*. 2<sup>nd</sup> edition. Bee Craft Limited, UK.
- GENERSCH, E. (2010): Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 87–97. doi: 10.1007/s00253-010-2573-8.
- GISDER S., V. SCHÜLER, L. L. HORCHLER, D. GROTH, E. GENERSCH (2017) : Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp. Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of *Nosema ceranae*, an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 6, 301. doi: 10.3389/fcimb.2017.00301.
- GOBLIRSCH, M., Z.Y. HUANG, M. SPIVAK (2013): Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. *PLoS ONE* 8(3): e58165. doi: 10.1371/journal.pone.0058165.
- HORAK, R. D., S. P. LEONARD, N. A. MORAN (2020): Symbionts shape host innate immunity in honeybees. *Proc Biol Sci.* 26, 287. doi: 10.1098/rspb.2020.1184.

- HORNITZKY, M. (2005): A report for the Rural Industries Research and Development Corporations. Publication No. 03/028. Rural industries Research and Development Corporation, Barton, Australia, 1-16.
- HUANG, Z.Y. (2010): Honey bee nutrition. Am. Bee J. 150, 773-776. John Wiley & Sons. Hoboken. USA
- JONES, J.C., C. FRUCIANO, F. HILDEBRAND, H. AL TOUFALILIA, N.J. BALFOUR, P. BORK, P. ENGEL, F.L. RATNIEKS, W.O. HUGHES (2017): Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. Ecol Evol. 30, 441-451. doi: 10.1002/ece3.3597.
- KANE, T. R., C. M. FAUX (2021): Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner.
- KATUŠIĆ, L. K. (2020): Utjecaj stimulativne prihrane zajednica medonosne pčele (*Apis mellifera*) na proljetni razvoj (Završni rad). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Osijek, Hrvatska.
- KEŠNEROVÁ, L., R. A. T. MARS, K. M. ELLEGAARD, M. TROILO, U. SAUER, P. ENGEL (2017): Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. PLoS Biol. 12, 15, e2003467. doi: 10.1371/journal.pbio.2003467.
- KRZNAR, M., J. RIBARIĆ, K. PUŽAR, D. CVITKOVIC, S. NEJEDLI, I. TLAK GAJGER (2015): Utjecaj prihrane pčela dodatkom hrani BeeWell AminoPlus na broj spora *Nosema* sp. – preliminarno istraživanje. Vet stn 46, 459-466.
- KWONG, W. K., N. A. MORAN (2016): Gut microbial communities of social bees. Nat Rev Microbiol. 14, 374-384. doi: 10.1038/nrmicro.2016.43.
- MAJOROŠ, A., I. TLAK GAJGER, M. I. SMODIŠ ŠKERL (2022): Prehrambeni stres pčelinjih zajednica (*Apis mellifera* L.): uzroci, učinci i mjere sprječavanja gubitaka. Vet stn 53, 461- 474. doi: 10.46419/vs.53.4.11.
- MARÍN-GARCÍA, P. J., Y. PEYRE, A. E. AHUIR-BARAJA, M. M. GARIJO, L. LLOBAT (2022); The Role of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in Honey Bee Colony Losses and Current Insights on Treatment. Vet Sci. 9, 130.
- MATAŠIN, Ž., I. TLAK, Z. PETRINEC (2007): Značenje dijagnosticiranja nozemoze. Međunarodni pčelarski sajam i znanstveno-stručni skup 4. pčelarski dani /Vinkovci. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, str. 98-103.
- MORAN, N. A., A. K. HANSEN, J. E. POWELL, Z. L. SABREE (2012): Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS One. 7: e36393. doi: 10.1371/journal.

- MORTENSEN, A. N., C. J., JACK, T. A. BUSTAMANTE, D. R. SCHMEHL, J. D. ELLIS (2018.): Effects of Supplemental Pollen Feeding on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colony Strength and *Nosema* spp. Infection. J. Econ. Entomol. 112, 60-66.
- MUDROŇOVÁ, D., J. TOPORČÁK, R. NEMCOVÁ, S. GANCARČÍKOVÁ, V. HAJDUČKOVÁ, K. RUMANOVSKÁ (2011): *Lactobacillus* sp. as a potential probiotic for the prevention of *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. J. Apic. Res. 50, 323–324. doi.org/10.3896/IBRA.1.50.4.11.
- POTTS, S. G., J. C. BIESMEIJER, C. KREMEN, P. NEUMANN, O. SCHWEIGER, W. E. KUNIN (2010): Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecol.Evol. 25, 345-353. doi: 10.1016/j.tree.2010.01.007.
- RIBARIĆ, J. (2016): Utjecaj dodatka hrani na stupanj invazije mikrosporidijom *Nosema ceranae*, biokemijske i histokemijske pokazatelje u medonosne pčele (*Apis mellifera*). Doktorski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, Hrvatska.
- SMRITI A. R., S. GAGANDEEP, G. GUPTA (2024): Prospects of probiotics in beekeeping: a review for sustainable approach to boost honeybee health. Arch Microbiol 206, 205. doi.org/10.1007/s00203-024-03926-4.
- SOMERVILLE, D. (2000): Honey bee nutrition and supplementary feeding. Agnote NSW Agriculture. DAI/178, 1-8.
- STEEL, I. M. (2012): Understanding Bee Anatomy. The Catford Press. London, UK.
- STEINHAUER, N., K. KULHANEK, K. ANTÚNEZ, H. HUMAN, P. CHANTAWANNAKUL, M. P. CHAUZAT (2018): Drivers of colony losses. Curr Opin Insect Sci. 26, 142-148. doi: 10.1016/j.cois.2018.02.004.
- ŠTAVALJ, J. (2021). Utjecaj prihrane različitim pogačama na pojavnost nozemoze u zajednicama medonosne pčele (*Apis mellifera*) u proljeće. Diplomski rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek. Osijek, Hrvatska.
- TAUTZ, J. (2008): The Buzz about Bees: Biology of a Superorganism. Springer Verlag. Berlin. Germany, 1-284.
- TLAK GAJGER, I. (2017): Prepoznavanje bolesti pčela. Edukativna brošura. Hrvatski pčelarski savez, Zagreb.
- TLAK GAJGER, I. (2019): Bolesti pčela u suvremenoj proizvodnji. Sveučilišni udžbenik. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 111-115.
- TLAK GAJGER, I., J. RIBARIC, M. MATAK, L. SVECNJAK, Z. KOZARIC, S. NEJEDLI, I. M. SMODIS SKERL (2015): Zeolite clinoptilolite as a dietary supplement

and remedy for honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Veterinarni Medicina*, 60, 12, 696–705.

TLAK GAJGER, I., J. RIBARIĆ, M. SMODIŠ ŠKERL, J. VLAINIĆ, P. SIKIRIĆ (2018): Stable gastric pentadecapeptide BPC 157 in honeybee (*Apis mellifera*) therapy, to control *Nosema ceranae* invasions in apiary conditions. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 41, 4, 614–621. doi.org/10.1111/jvp.12509.

TLAK GAJGER, I., J. VLAINIĆ, P. ŠOŠTARIĆ, J. PREŠERN, J. BUBNIČ, M. I. SMODIŠ ŠKERL (2020): Effects on some therapeutical, biochemical, and immunological parameters of honey bee (*Apis mellifera*) exposed to probiotic treatments, in field and laboratory conditions. *Insects* 11, 9, 638. doi:10.3390/insects11090638.

TLAK GAJGER, I., M. I. SMODIŠ ŠKERL, P. ŠOŠTARIĆ, J. ŠURAN, P. SIKIRIĆ, J. VLAINIĆ (2021): Physiological and Immunological Status of Adult Honeybees (*Apis mellifera*) Fed Sugar Syrup Supplemented with Pentadecapeptide BPC 157. *Biology* 10, 9, 891. doi.org/10.3390/biology10090891.

TLAK GAJGER, I., O. VUGREK, D. GRILEC, Z. PETRINEC (2010): Prevalence and distribution of *Nosema ceranae* in Croatian honeybee colonies. *Veterinarni Medicina* 55, 9, 457 – 462.

TLAK GAJGER, I., O. VUGREK, LJ. PINTER, Z. PETRINEC (2009a): „Nozevit patties“ treatment of honeybees (*Apis mellifera*) for the control of *Nosema ceranae* disease. *Am. Bee J.* 149, 11, 1053 – 1056.

TLAK GAJGER, I., S. NEJEDLI, L. CVETNIĆ (2023): Influence of Probiotic Feed Supplement on *Nosema* spp. Infection Level and the Gut Microbiota of Adult Honeybees (*Apis mellifera* L.). *Microorganisms* 11, 610. doi.org/10.3390/microorganisms11030610.

TLAK GAJGER, I., Z. KOZARIC, D. BERTA, S. NEJEDLI, Z. PETRINEC (2011): Effect of the herbal preparation Nozevit on the mid-gut structure of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema* spp. spores. *Vet. Med.* 56, 343-350.

TLAK GAJGER, I., Z. PETRINEC, LJ. PINTER, Z. KOZARIĆ (2009): Experimental treatment of *Nosema* disease with "Nozevit" phyto-pharmacological preparation. *Am. Bee J.* 149, 5, 485 - 490.

TOKAREV, Y. S., W. F. HUANG, L. F. SOLTER, J. M. MALYSH, J. J. BECNEL, C. R. VOSSBRINCK (2020): A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics, *J. Invertebr. Pathol.* 169,107279. doi.org/10.1016/j.jip.2019.107279.

TOMAŠEC, I. (1949): *Biologija pčela*. Nakladni zavod Hrvatske. Zagreb, str. 15-23.

- TOMLJANOVIĆ, Z., D. CVITKOVIĆ, S. PAŠIĆ, B. VOLAREVIĆ, I. TLAK GAJGER (2020): Production, practices and attitudes of beekeepers in Croatia. *Vet. arhiv* 90, 413-427. doi.org/10.24099/vet.arhiv.0909.
- TOMLJANOVIĆ, Z., I. TLAK GAJGER, V. SANTRAČ (2012): Dobra veterinarska praksa u pčelinjaku. Bayer Animal Health, Zagreb, str. 1-80.
- VIDAL-NAQUET, N. (2015): Honeybee Veterinary Medicine: *Apis Mellifera* L. 5m Publishing: Sheffield, UK.
- WATKINS DE JONG, E., G. DEGRANDI-HOFFMAN, Y. CHEN, H. GRAHAM, N. ZIOLKOWSKI (2019): Effects of diets containing different concentrations of pollen and pollen substitutes on physiology, *Nosema* burden, and virus titers in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 50, 845-858.
- WHITE JR, J. W. (1978): Honey, *Advances in Food Research*, 24, 287-374. doi: 10.1016/s0065-2628(08)60160-3.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1984): *Insect physiology*. Chapman and Hall. London
- ZHENG, H., J. E. POWELL, M. I. STEELE, C. DIETRICH, N. A. MORAN (2017): Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114, 4775-4780. doi: 10.1073/pnas.1701819114.
- ZHENG, H., M. I. STEELE, S. P. LEONARD, E. V. S MOTTA, N. A. MORAN (2018): Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Anim (NY)* 47, 317-325. doi: 10.1038/s41684-018-0173-x.

## 8. SAŽETAK

### UČINAK PRIHRANJIVANJA PČELINJIH ZAJEDNICA (*Apis mellifera* L.) PROTEINSKIM POGAČAMA NA STUPANJ INVADIRANOSTI SPORAMA *Nosema* spp.

Antonia Mužić

Pčelinja zajednica treba dostatne zalihe nektara, meda i peluda da bi zadovoljila energetske i prehrambene potrebe. Pri tome potrebna je stalna dostupnost prirodne hrane, no u rano proljeće i tijekom bespašnih razdoblja zbog loših vremenskih prilika, najpouzdaniji izvor dodatne hrane je kvantitativno i kvalitativno zadovoljavajuće prihranjivanje pčelinjih zajednica pogačama i / ili šećernim sirupom koje pčelar provodi u okviru dobre pčelarske prakse. Cilj ovog rada bio utvrditi učinkovitost primjene proteinskih pogača tijekom prihrane pčelinjih zajednica te utvrditi mogući utjecaj na stupanj invadiranosti sporama *Nosema* spp. Pretraženi su uzorci odraslih pčela sakupljeni na pčelinjaku u pokusnim i kontrolnim skupinama (24) pod hipotezom da će pčelinje zajednice bolje uzimati proteinske nego šećerne pogače, te da će se smanjiti broj spora mikrosporidija *Nosema* spp. Laboratorijskim pretraživanjem uporabom svjetlosnog mikroskopa utvrđena je prisutnost i kvantifikacija spora *Nosema* spp. Iako analiziranjem rezultata nisu utvrđene statistički značajne razlike u broju spora između kontrolne i pokusne skupine pčelinjih zajednica, tijekom trajanja pokusa uočeno je značajno smanjenje broja spora *Nosema* spp. u pokusnoj skupini prihranjivanoj proteinskom pogačom uspoređujući početak i tijek istraživanja.

Ključne riječi: medonosna pčela, spore *Nosema* spp., proteinske pogače

## 9. SUMMARY

### EFFECT OF PROVIDING HONEYBEE COLONIES (*Apis mellifera* L.) WITH PROTEIN PATTIES ON INVASION LEVELS OF *Nosema* spp. SPORES

Antonia Mužić

A honeybee colony needs sufficient nectar, honey and pollen supplies to meet its energy and nutritional needs. This requires constant availability of natural food, but in early spring and during dearth periods due to bad weather conditions, the most reliable source of additional food is quantitative and qualitatively satisfactory feeding of honeybee colonies with patties or sugar syrup, which the beekeeper carries out within the framework of good beekeeping practice. This study aimed to determine the impact of protein patties after application during additional feeding of honeybee colonies and its possible impact on the degree of invasion with *Nosema* spp. spores. Samples of adult bees collected in the apiary in experimental and control groups (24) were examined under the hypothesis that honeybee colonies would take up protein patties better than sugar patties, and that the number of spores of *Nosema* spp. microsporidia would be reduced. Laboratory examination using a light microscope determined the presence and quantification of *Nosema* spores spp. Although the analysis of the results did not reveal statistically significant differences in the number of spores between the control and experimental groups of honeybee colonies, a significant reduction in the number of *Nosema* spp. spores were observed during the experiment in the colonies fed with protein patty, comparing the beginning and course of the research.

Keywords: honeybee, *Nosema* spp. spores, protein patties

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14. prosinca 1998. godine u Rijeci. Odrasla sam u Orlecu, malom selu na otoku Cresu, uz roditelje i dvije mlađe sestre. Osnovnu školu Frane Petrića Cres završila sam 2013. godine te sam iste godine u rujnu upisala opću gimnaziju Ambroza Haračića Mali Lošinj, područni odjel Cres.

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam u rujnu 2017. godine. Tijekom studija sudjelovala sam na raznim projektima, primjerice, volontirala sam edukativnoj izložbi "Reptilomanja+", na Noći muzeja na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela, na Festivalu znanosti i Danu otvorenih vrata Veterinarskog fakulteta a na šestoj godini studija sudjelovala sam u organizaciji Humanijade, te međunarodnog sportsko- edukacijskog susreta biomedicinskih fakulteta.

Od 2017. godine članica sam Udruge studenata veterinarske medicine – USVM, te sam kao aktivni član udruge IVSA Hrvatska sudjelovala na projektima IVSArt, IVSA kviz općeg znanja, slatki dani IVSA-e i CSACW-u (Cro-Slo-Austro-Czech Weekend) 2022. godine. Dvije godine sam sudjelovala u projektu *Studentski zdravi dani* sa štandom "BEE HEALTHY", te sam 2022. godine dobitnica Rektorove nagrade u interdisciplinarnom području znanosti za spomenuti projekt. Također, 2022. godine položila sam lovački ispit i dobila lovačku diplomu i dozvolu. Prisustvovala sam 8. Kongresu veterinarara male prakse Hrvatske u Zadru 2023. godine.

U srpnju 2023. godine sudjelovala sam u "Ljetnoj školi Akvakulture" na Veterinarskom fakultetu u Sarajevu u sklopu CEEPUS projekta. U akademskoj godini 2023./2024. dva mjeseca sam u sklopu ERASMUS+ stručne prakse boravila u Napulju, na odjelu za veterinarsku medicinu i animalnu proizvodnju Sveučilišta u Napulju Federico II.