Učinkovitost in vitro primjene dezinficijensa “Bee Protect F” na bakteriju Peanibacillus larvae

Sakač, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:534825

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Tea Sakač

Učinkovitost *in vitro* primjene dezinficijensa "Bee Protect F" na bakteriju *Peanibacillus larvae*

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
ZAVOD ZA BIOLOGIJU I PATOLOGIJU RIBA I PČELA

Predstojnik Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela:
Izv. prof. dr. sc. Emil Gjurčević

Mentori:
Prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger
Dr. sc. Josipa Vlainić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Jelena Šuran
2. Dr. sc. Josipa Vlainić
3. Prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

ZAHVALE

Zahvaljujem mentoricama prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger i dr. sc. Josipi Vlainić na ukazanom povjerenju, susretljivosti i strpljenju prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem prijateljima i kolegama na podršci i savjetima, oni su bili uz mene tijekom uspona i padova.

Ponajviše zahvaljujem svojim roditeljima Ivanki i Krunoslavu na motivaciji, razumijevanju i podršci.

SADRŽAJ

1. UVOD……..…….1

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA……...….3

2.1. Bakterija *Peanibacillus larvae*…….…….……....3

2.2. Američka gnjiloća……...….4

2.2.1. Epizootiološka situacija …….4

2.2.2. Epizootiologija i patogeneza…….7

2.2.3. Klinički nalaz……....8

2.2.4. Dijagnostika i suzbijanje bolesti…….....9

2.2.5. Zakonska regulativa bolesti……12

2.3. Dezinfekcija u pčelarstvu……....12

2.3.1. Opći zahtjevi prije dezinfekcije……...……12

2.3.2. Vrste dezinfekcije……..…….....13

2.3.3. Pravila dezinfekcije i najčešće pogreške…….…….…….…... 18

2.3.4. Bee protect F…….…….....18

3. MATERIJALI I METODE…….……..20

3.1. Porijeko ispitivanog dezinfekcijskog sredstva… ……..…....20

3.2. Agar difuzija…….....21

3.3. Ispitivanje učinka EnSure luminometrom…….....23

3.4. Ispitivanje sporocidnog učinka Bee protect F……..……26

4. REZULTATI……..…....27

4.1. Rezultati agar gel difuzije……..…....27

4.2. Rezultati ATP testa bioluminiscencije…….....29

4.3. Rezultati dobiveni suspenzijskim testom……..31

5. RASPRAVA……..….....32

6. ZAKLJUČCI…….…..….35

7. POPIS LITERATURE……..…….....36

8. SAŽETAK…….……43

9. SUMMARY……....44

10. ŽIVOTOPIS…….....…....45

POPIS PRILOGA

SLIKE:

Slika 1. Proširenost američke gnjiloće u svijetu (CABI, 2021.).
Slika 2. Nepravilno raspoređeno poklopljeno i nepoklopljeno pčelinje leglo, te drugi znakovi. koji upućuju na sumnju klinički vidljive američke gnjiloće medonosne pčele.
Slika 3. Mjera sanacije američke gnjiloće spaljivanjem.
Slika 4. Uzorkovanje prilikom sumnje na američku gnjiloću.
Slika 5. Bee protect F.
Slika 6. Aplikacija dezinficijensa u Petrijevu zdjelicu.
Slika 7. Utvrđivanje broja bakterija densitometrom.
Slika 8. Izgled luminometra te UltraSnap ATP testa.
Slika 9. Aplikacija dezinficijensa u Eppendorf epruvetu.

GRAFIKONI:

Grafikon 1. Grafički prikaz zona inhibicije nakon primjene dezinficijensa.
Grafikon 2. Grafički prikaz očitavanja razine ATP-a, tijekom različitih vremenskih razdoblja.
Grafikon 3. Sporocidni učinak Bee protecta F, tijekom različitih vremenskih razdoblja.

TABLICE:

Tablica 1. Taksonomija *Paenibacillus larvae* (GENERSH i sur., 2006.).
Tablica 2. Epizootiološka situacija američke gnjiloće u RH, 2009. do 2020. godine.
Tablica 3. Grafički prikaz očitavanja razine ATP-a, tijekom različitih vremenskih razdoblja.
Tablica 4. Prikaz očitavanja vrijednosti ATP-a, izražen u relativnim svjetlosnim jedinicama, tijekom 30 sekundi.
Tablica 5. Prikaz očitavanja vrijednosti ATP-a, izražen u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU), tijekom 60 sekundi.
Tablica 6. Prikaz očitavanja vrijednosti ATP-a, izražen u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU), tijekom 120 sekundi.

1. UVOD

Pčelarstvo u Republici Hrvatskoj je važna tradicionalna poljoprivredna grana, koja ima veliki gospodarski značaj. To dokazuje i prvi pisani dokument o pčelarstvu, Vinodolski zakonik iz 1288. godine. Kako se pčelarstvo razvijalo, tako se ukazivala i potreba za osnivanjem prvog pčelarskog društva 1879. godine u Osijeku, kao i časopisa „ Slavonska pčela " koji je pokrenut dvije godine kasnije (WINTER, 2000.).

Medonosna pčela (*Apis mellifera*) ima važnu ekološku, ali i ekonomsku ulogu koju ostvaruje oprašivanjem, proizvodnjom hrane te niza pčelinjih proizvoda (MORSE i CALDERONE, 2000.). U Europskoj Uniji (EU) 78% vrsta divljih cvatućih biljaka i 84% vrsta poljoprivrednih kultura ovisi o oprašivanju korisnim kukcima (WILLIAMS,1998.). Oprašivanje omogućuje održavanje raznolikosti i veću kvalitetu voća, povrća, orašastih plodova i sjemenki. Preko 80% usjeva i divljeg bilja ovisi o oprašivanju kukcima, a oko 15 milijardi eura vrijednosti godišnje poljoprivredne proizvodnje EU izravno se pripisuje oprašivanju kukcima. Oprašivači su, osim opskrbe hranom i održavanjem bioraznolikosti, važni i za proizvodnju lijekova, drva, biogoriva, te vlakana (WILLIAMS, 1998.).

Procjena godišnje proizvodnje meda u RH temelji se na podacima o prosječnoj proizvodnji meda po košnici na temelju ankete koju je proveo Hrvatski pčelarski savez (HPS), a objavljena je u Nacionalnom pčelarskom programu za razdoblje 2020. do 2022. godine. Prikupljeni podaci pokazuju da je ukupna proizvodnja u 2017. godini bila 8.128 tona, dok je proizvodnja tijekom 2018. godine bila 7.440 tona meda.

Slijedom navedenog, zabrinjavajuć je rastući trend prijava gubitaka u pčelarstvu. Jedna od deset vrsta pčela u Europi je u opasnosti od izumiranja. Za propadanje pčelinjih zajednica nije odgovoran samo jedan uzrok, već je većinom riječ o skupini uzroka, od kojih su najpoznatiji čimbenici negativni utjecaj nametnika i patogenih mikroorganizama, globalnog zatopljenja, nedostatna prehrana te negativni antropogeni učinak u vidu degradacije prirodnih staništa, te prekomjerne uporabe pesticida (VANENGELSDORP i MEIXNER, 2009.).

Jedan od glavnih patogenih uzročnika bolesti pčela je sporogena bakterija *Paenibacillus larvae*, uzročnik američke gnjiloće pčelinje zajednice. Zbog posebnog načina suzbijanja bolesti, te visoke otpornosti spora, američka gnjiloća je jedna od najtežih pčelinjih bolesti, te u pojedinim zamljama uzrokuje i najveće ekonomske gubitke u pčelarstvu (TLAK GAJGER, 2017).

Bolest se manifestira na pčelinjem poklopljenom i nepoklopljenom leglu te uzrokuje ugibanje svake zaražene pčelinje ličinke, što rezultira propadanjem cijele pčelinje zajednice. Specifičnost bolesti je tvorba dugoživućih spora, koje su izrazito otporne na djelovanje vanjskih utjecaja, a sposobnost zaražavanja zadržavanju i nakon više desetljeća. Nadziranje i suzbijanje bolesti je na godišnjoj razini propisano Naredbom o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju (važeće izdanje). Završna dezinfekcija nakon sanacije klinički vidljive i laboratorijski potvrđene bolesti je od iznimne važnosti, kao i preventivna mjera tekuće dezinfekcije uz redovitu kontrolu pčelinjaka.

Slijedom navednog, postavljen je cilj ovog istraživanja, a to je utvrđivanje učinka određenog dezinficijensa u realnom vremenu i realnim koncentracijama na vegetativni i sporogeni oblik bakterije *P. larvae* u laboratorijskim uvjetima. Pretpostavka je da dezinficijens Bee protect F, kao i ostali na tržištu dostupni dezinficijensi, pokazuju različiti stupanj učinkovitosti na bakteriju *P. larvae*, te da dobiveni rezultati mogu imati značenje u provedbi preventivne i završne dezinfekcije i smanjenoj pojavi recidiva klinički vidljive američke gnjiloće na pčelinjacima.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Bakterija *Peanibacillus larvae*

P. larvae je gram pozitivna, štapičasta, fakultativno aerobna, sporogena bakterija. Uzročnik je američke gnjiloće, najrazornije bakterijske bolesti medonosnih pčela (JELINSKI, 1985.). Bakterije iz roda *Paenibacillus* uglavnom pokazuju optimalni rast pri neutralnom pH unutar temperaturnog raspona od 28 do 40 °C (PATOWARY i DEKA, 2020.). Vegetativni oblici bakterije uvelike se razlikuju po veličini, a prosječno su široki 0,5 µm i dugi između 1,5 i 6 µm; javljaju se i pojedinačno i u lancima te filamentima. Neki sojevi su pokretljivi.

TAKSONOMIJA	
Carstvo	Bacteria
Koljeno	Bacteroidetes
Razred	Sphingobacteria
Red	Sphingobacteriales
Porodica	Flexibacteraceae
Rod	*Paenibacillus*
Vrsta	*Paenibacillus larvae*

Tablica 1. Taksonomija bakterije *P. larvae* (GENERSH i sur.,2006.).

Infektivni oblik bakterije čine spore ovalnog oblika, prosječno široke 0,6 µm i duge 1,3 µm (DOBBELEARE i sur., 2001.). Svega 10 spora dovoljno je za uspješnu zaražavanje ličinke u dobi do 24 sata, kao i njeno posljedično ugibanje (ALVARADO, 2015.). Za izbijanje klinički vidljive bolesti u zajednici potrebno je ovisno o dobi ličinaka od nekoliko desetaka do nekoliko milijuna spora, a samo jedna uginula ličinka može sadržavati tri do pet milijardi novostvorenih infektivnih spora. Spora uzročnika bolesti u ličinku pčele ulazi onečišćenom hranom. Spore klijaju u srednjem crijevu ličinke, koloniziraju lumen crijeva te proteolitičkom aktivnošću razaraju međustanične veze crijevnog epitela što posljedično dovodi do probijanja u tjelesnu šupnjinu (hemocel) što ujedno označava trenutak ugibanja zaražene ličinke.

Tijekom kolonizacije crijeva proizvode se milijuni novih otpornih spora koje mogu biti izvor zaraze za druge pčelinje ličinke (YUE i sur., 2008.). Spore dugo preživljavaju u košnici (GENERSCH, 2008.), izrazito su otporne na kuhanje u vodi, u medu prežive temperaturu do 100 °C više od dva sata, a u rastaljenom vosku ugibaju na 120 °C nakon 20 do 30 minuta (FORSGREN i sur., 2008.; GENERSCH, 2008.).

Uporaba antibiotika za suzbijanje američke gnjiloće je zabranjena, zbog rezidua koje ostvljaju u pčelinjim proizvodima (CHAN i sur., 2011.; TIAN i sur., 2012.), zbog nedjelovanja na spore koje su jedini infektivni oblik, te mogućnosti pojave recidiva klinički vidljive bolesti (KOCHANSKY i sur., 2001.). Također, zbog specifičnosti života pčelinjih zajednica u košnicama koje nemaju "metabolizam" te svojstvima meda, nema mogućnosti za uspostavljanje najviših vrijednosti rezidua (eng. *Maximum Residues Limit*, MRL) za ostatke štetnih tvari u medu (Regulation EC 470/2009).

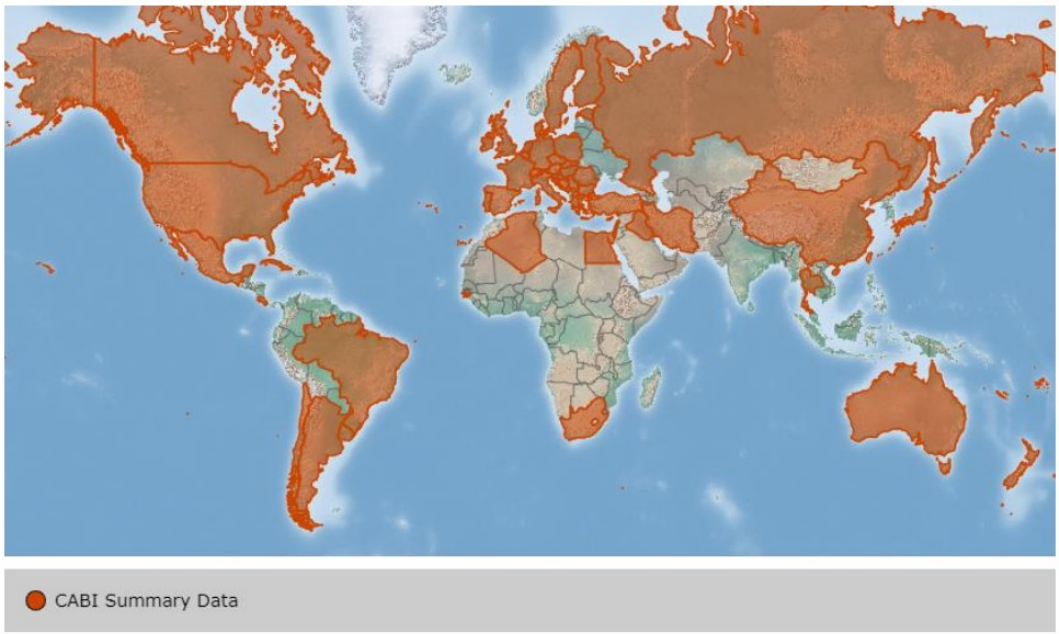
Genotipizacijom su utvrđena 4 serotipa američke gnjiloće, koji se razlikuju po obliku, biokemijski i po stupnju patogenosti (GENERSCH i sur., 2006.) ERIC I, ERIC II, ERIC III te ERIC IV. Nedavno provedenim istraživanjem na uzorcima španjolskog meda, utvrđene su spore američke gnjiloće, te je utvrđen još jedan genotip američke gnjiloće, ERIC V (BEIMS i sur., 2019.). Gentopizacijom provedenom u Sloveniji u razdoblju od 2017. do 2019. godine, utvrđena je pojavnost dvaju serotipa američke gnjiloće, ERIC II (70.2%.) i ERIC I (29.8%) (ŽUGELJ i sur., 2021.). Dobiveni podatci su nam značajni zbog geografske blizine Slovenije. Serotipovi američke gnjiloće se razliku prema brzini širenja uzročnika unutar zajednice, stupnju uklanjanja uginulih ličinki, broju proizvedenih spora, brzini napredovanja bolesti, te brzini propadanja same zajednice (CHAN i sur., 2011.; QUIN i sur., 2006, ŽUGELJ i sur., 2021.).

2.2. AMERIČKA GNJILOĆA MEDONOSNE PČELE

Američka gnjiloća medonosne pčele, nekad nazivana kuga pčelinjeg legla ili opaka gnjiloća, je zarazna kontagiozna bolest poklopljenog, ali i nepoklopljenog pčelinjeg legla. Bolest je uzrokovana gram pozitivnom, sporogenom bakterijom, *P. larvae*. Samo geografsko porijeklo bolesti nije utvrđeno, ali je danas ona proširena po cijelom svijetu (MATHESON, 1993.). Bolest je prvi put opisana 1771. godine, te nazvana gnjiloćom zbog "gnjilog" izgleda propale ličinke (SCHIRACH, 1771.). Do 1906. godine, američka i europska gnjiloća su se smatrale istom bolešću, gnjiloćom. Međutim, dokazano da je specifični uzročnik američke gnjiloće bakterija *Bacillus larvae* (WHITE, 1907.). Bakterije toga roda su se sve do 1993. godine svrstavale u rod *Bacillus*, a kasnije u poseban rod *Paenibacillus*.

2.2.1. EPIZOOTIOLOŠKA SITUACIJA

Bolest je proširena na šest kontinenata: Sjevernu i Južnu Ameriku, Europu, Aziju, Afriku, te Australiju. Drugim riječima, bolest je proširena na sve kontinente osim Antartike, gdje vladaju nepovoljni uvjeti za razvoj pčelinjih zajednica (GENERSCH, 2010).



CABI, 2021. Paenibacillus larvae. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. https://www.cabi.org/isc

Slika 1. Proširenost američke gnjiloće u svijetu (CABI, 2021.).

Na temelju redovitih izvještaja koje daje Uprava za veterinarstvo koja prati pojavu i kretanje bolesti životinja i zoonoza u RH (Pravilnik o načinu praćenja, prijavi i izvješćivanju o pojavi bolesti životinja) podaci o epizootiološkoj situaciji za američku gnjiloću pčelinjeg legla su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Epizootiološka situacija američke gnjiloće u RH, od 2009. do 2020. godine.

Godina	**Ukupan broj slučajeva**	**Županija s najvećim brojem zabilježenjih slučajeva**	**Broj slučaja u najpogođenijim županijama**
2009.	33	Sisačko-moslavačka	20
2010.	10	Nema podataka	Nema podataka
2011.	23	Nema podataka	Nema podataka
2012.	30	Nema podataka	Nema podataka
2013.	36	Požeško-slavonska	12
2014.	75	Požeško-slavonska	26
2015.	96	Požeško-slavonska	20
2016.	145	Požeško-slavonska	28
2017.	65	Bjelovarsko-bilogorska	21
2018.	35	Zagrebačka	8
2019.	150	Virovitičko-podravska	40
2020.	64	Varaždinska	6

Na temelju navedenih epizootioloških podataka (Tablica 2.) možemo zaključiti da je pojavnost američke gnjiloće bila najveća u Požeško-slavonskoj županiji, sve do 2017.-te godine, kad je ulogu vodeće županije preuzela Bjelovarsko-bilogorska županija. Također se može primijetiti kako se u zadnje dvije godine pojavljeno više manjih žarišta bolesti, za razliku od prethodnih godina, kada se većina žarišta u svega par županija. U 2019.-oj godini vidimo nagli porast broja slučajeva, za koji se pretpostavlja da je rezultat veće prijave sumnje na bolest,

a ne njene veće pojavnosti. Taj trend se nastavio i u nadolazećoj godini, a županija sa najviše broja slučajeva je bila Varaždinska županija.

2.2.2. EPIZOOTIOLOGIJA I PATOGENEZA

Primarni izvori zaraze su pčelinje zajednice zaražene ili uginule od američke gnjiloće, te sporama onečišćeni pčelinji proizvodi. Sekundarni izvori zaraze su: pčelarski pribor, oprema i hrana za pčele onečišćena uzročnikom američke gnjiloće.

Načini širenja spora *P. larvae* mogu biti izravni, neizravni i pomoću posrednika. Izravnim načinom bolest se može prenjeti rojevima, maticama (koji na sebi mogu mehanički prenositi spore uzročnika), te pčelama na okvirima. Od prirodnih načina prenošenja bolesti valja spomenuti zalijetanje u druge košnice i grabež. Od živih posrednika nam je najznačajnija nametnička grinja *Varroa destructor* (CONTE i sur., 2020.).

Iako u RH za sada nemamo zabilježene slučajeve pojave invazije malim kornjašem košnice (*Aethina tumida*), on je također mogući živi prenosioc uzročnika američke gnjiloće. Neizravni načini širenja su većinom povezani s pčelarskim priborom i opremom, peludom i medom, satnim osnovama, te ostalim dijelovima prethodno zaražene košnice.

Američka gnjiloća se javlja u dva oblika: tipičnom, koji se javlja na poklopljenom leglu, te atipičnom, koji se javlja na mlađem nepoklopljenom leglu. Za objašnjenje patogeneze jednog, odnosno drugog oblika bolesti, važno je razumjeti životni ciklus medonosne pčele, te njene uloge i zadatke kao kućne pčele ili kasnije skupljačice. Razvojni ciklus pčele se odvija u četiri životna stadija: jaje, ličinka, kukuljica, odrasla pčela. Od polaganja jaja, do izlaska mlade pčele iz stanice saća, potreban je 21 dan. Kad mlada pčela izađe iz stanice saća, budući da još ne može letjeti, ima ulogu čistačice. Nakon pet dana ona postaje hraniteljica i hrani starije nepoklopljeno leglo medom i peludom. S razvitkom mliječne žlijezde, naredna tri dana hrani mlađe leglo matičnom mliječi. Sljedeća uloga je uloga graditeljice, koju nakon šest dana zamjenjuje uloga stražarice. Nakon tri tjedna rada u košnici, pčele izlijeću iz košnice i postaju skupljačice.

Kada govorimo o tipičnom obliku bolesti, čiji su znaci bolesti vidljivi na poklopljenom leglu, važna nam je hranidbena povezanost ličinke i pčele hraniteljice. Budući da je mlada pčela prvo čistačica, na taj način može mehanički na tijelu prenijeti infektivne spore (WINSTON, 1992.) Do infekcije mlađeg pčelinjeg legla bakterijom *P. larvae* dolazi kada pčela hraniteljica

zarazi savijenu ličinku sporama, prilikom hranjenja matičnom mliječi. Drugim riječima ličinka se može inficirati sporama uzročnika u dobi od četvrtog do šestog dana života.

U crijevu ličinke spora proklija, a vegetativni oblik uzročnika se počinje umnažati kada se ličinka ispruži i počne hraniti medom, peludom i vodom, odnosno od sedmog do devetog dana starosti. Umnažanje uzročnika uvjetuje promjena hrane, to jest promjena kiselosti sadržaja crijeva u kiselo.

Vegetativni oblici *P. larvae* penetriraju između epitelnih stanica crijeva i hemolimfom se raznose po tijelu ličinke, a svojim daljnjim umnažanjem uzrokuju propadanje tkiva ličinke, koja se pretvara u bezobličnu, smeđu i viskoznu ili rastezljivu masu. Nakon devetog dana radilice poklapaju stanice saća voskovim poklapcima. Ubrzo klinički znakovi bolesti postaju vidljivi na poklopljenom leglu.

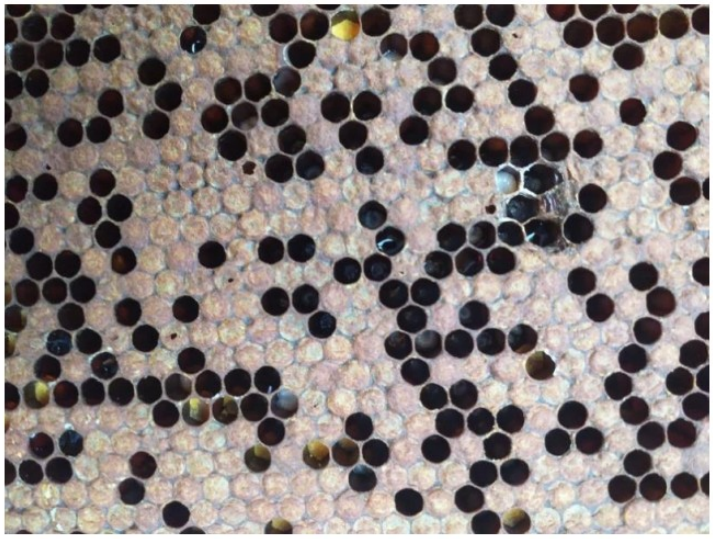
Za razvoj atipičnog oblika bolesti uglavnom je zaslužna grinja *V. destructor*. Odrasla pčela na svom zatku prenosi spolno zrelu ženku grinje, te prilikom hranjenja ličinke, grinja se zavlači u stanicu saća gdje je i pčelinja ličinka, te započinje na njoj parazitirati uzimanjem hemolimfe i masno-bjelančevinastog tijela, te polagati vlastita jaja. Odrasle grinje, kao i njeni razvojni oblici protonimfa i deutonimfa, se hrane hemolimfom nosioca, a preko hranidbenog mjesta (rane na koži) na ličinci pčele. Na taj način prilikom hranjenja može ubaciti spore uzročnika američke gnjiloće u hemolimfu ličinke, infektivne spore će se početi umnažati, te će uzrokovati ugibanje nosioca. Ovaj oblik bolesti je atipičan jer se promjene može vidjeti i na nepoklopljenom pčelinjem leglu.

2.2.3. KLINIČKA SLIKA

Promjene su vidljive na poklopcima saća iznad pčelinjeg legla, te u izgledu zaražene ili uginule ličinke. Poklopljeno i nepoklopljeno leglo je nepravilno raspoređeno. Poklopci nad zdravim leglom uobičajeno su blago izbočeni, suhi, porozni, i bez rupica. Boja poklopaca nad zdravim leglom je boje okolnog saća. Poklopci nad leglom uginulim od posljedica američke gnjiloće su naborani, udubljeni s rupicama nepravilno izgriženih rubova, mramorirano promjenjene boje i vlažnog izgleda.

Zdrava ličinka uobičajeno je bijele boje, sedefastog sjaja, kolutićava te napeta. Bolesna ličinka mijenja izgled i konzistenciju, boja se mijenja u smeđu, postaje ljepljiva i rastezljiva, a starenjem procesa se suši i prilijepi za dno stanice saća (GENERSCH., 2010.). Nakon dva

mjeseca masa propale ličinke je potpuno osušena, pa stanica izgleda kao prazna. Raspadnuta ličinka može imati specifičan miris po truleži.



Slika 2. Nepravilno raspoređeno poklopljeno i nepoklopljeno pčelinje leglo, te drugi znakovi koji upućuju na sumnju klinički vidljive američke gnjiloće medonosne pčele.

2.2.4. DIJAGNOSTIKA I SUZBIJANJE BOLESTI

Uloga pčelara je da pri pojavi sumnje na bolest obavijesti nadležnog veterinara na području gdje je smješten pčelinjak. Sumnju na bolest može potvrditi ovlašteni veterinar, nakon obavljenog kliničkog pregleda pčelinje zajednice. Njegov zadatak je uzeti odgovarajući uzorak materijala iz košnice i poslati ga u ovlašteni dijagnostički laboratorij za bolesti pčela. Službeni uzorak predstavlja komad saća s promijenjenim pčelinjim leglom veličine 10×10 cm, zapakiran u zrakopropusnu ambalažu, označen oznakom s košnice, uz službenu uputnicu. Službeni, referentni, nacionalni laboratorij za bolesti pčela APISlab u RH smješten je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pri Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela.

Mikroskopska pretraga na prisutnost spora *P. larvae* podrazumijeva pripremu obojenog preparata razmaska propale pčelinje ličinke. Priprema se tako da razmaz mase propale ličinke na predmetnom stakalcu fiksira plamenom, a zatim oboji karbol- fuksinom tijekom 30 do 60 sekundi prema Ziehl-Neelsenu. Ako je masa propale ličinke osušena u stanici saća treba

nakapati malo vode pa pričekati uobičajeno tijekom noći, a zatim napraviti razmaz. Dobiveni preparat se promatra pod svjetlosnim mikroskopom uz primjenu imverzije (1000 x povećanje). Nalaz je pozitivan ukoliko se utvrdi prisutnost spora *P. larvae*.

Ukoliko je pretraživani uzorak pozitivan, dužnost laboratorija je poslati nalaz veterinarskoj stanici koja je uputila uzorak na pretraživanje, Upravi za ministarstvo i poljoprivredu, te županijskoj inspekciji, čija je uloga pisanje rješenja o mjerama koje je potrebno poduzeti u svrhu suzbijanja američke gnjiloće na zaraženom pčelinjaku i tzv. Zaraženom području. Veterinarski inspektor tada naređuje mjere koje će se provoditi u zaraženom pčelinjaku. Mjere se odnose na zabranu selidbe, prodaje pčela i opreme, obavezan klinički pregled preostalih zajednica (sumnjive zajednice se podvrgavaju uzorkovanju i uzorci se pretražuju u laboratorijskim uvjetima).

U zaraženim zajednicama naređuje mjeru uništenja legla i pčela, spaljivanjem i zakapanjem, te dezinfekcijom pribora. Također naređuje zabranu držanja pčela bez matice, zabranu rojenja pčela, te obvezan klinički pregled svih pčelinjih zajednica u području tri kilometra od zaraženog pčelinjaka. Vlasnik pčelinjaka ima pravo na naknadu štete, ukoliko bolest nije starija od dva mjeseca, te ukoliko je proveo sve ostale mjere propisane Naredbom, te provodi dobru pčelarsku i okolišnu praksu.

Spaljivanje pčelinjih zajednica je najučinkovitija mjera sanacije američke gnjiloće. Obavlja se predvečer, kad se sve pčele vrate s paše. Košnica se zatvori, odrasle pčele se uguše uobičajeno ubacivanjem zapaljene sumporne trakice u košnicu, a zatim se u pripremljenu jamu na rubu pčelinjaka ubacuje sav material namijenjen spaljivanju, ili se zapakira u nepropusne vreće i prevozi u kafileriju na neškodljivo uklanjanje.

U iznimno jakim pčelinjim zajednicama smještenim u novim košnicama koje ranije nisu dezinficirane, moguća naređena mjera sanacije je tehnološki postupak pretresanja. Budući da odrasle pčele ne obolijevaju od američke gnjiloće, cilj pretresanja je uništavanje spora koje one prenose na svome tijelu. Odrasle pčele se zatvore u novu košnicu, na tri dana, gdje se tijekom izgradnje novog saća, mehanički očiste od spora uzročnika bolesti. Nakon tri dana, odrasle pčele se ponovno pretresaju i postupak se ponavlja. Leglo iz zaraženih košnica se obavezno spaljuje, neovisno o metodi sanacije. Kod iznimno jakih pčelinjih zajednica, uz pretresanje pčela, očuva se i medišta košnica.

Drveni okviri iz plodišta se spaljuju, a preporučljivo je da se spale i oni iz medišta. Med se može vrcati, te je siguran za ljudsku uporabu, ali ne smije doći kao prihrana niti u izravni kontakt s pčelama. Saće se pretopi i dezinficira, suhom dezinfekcijom, bez dodatka vode na 120 ºC do 125 ºC, pola sata, pod pritiskom jednog bara. Preostali drveni dijelovi košnice se

opaljuju plamenom, a okviri iz medišta, pribor i sitni dijelovi se iskuhavaju u 5 do 7% otopini natrijeve lužine.

Za liječenje pčelinjih bolesti, pa tako i američke gnjiloće nije dopuštena uporaba antibiotika (EU 3/01/081). Razlozi tome su nedjelovanje na spore koje su jedini infektivni oblik uzročnika bolesti i posljedično moguće prikrivanje bolesti, mogućnost pojave recidiva bolesti, te utvrđivanje ostataka štetnih tvari (rezidua) antibiotika ili njihovih sekundarnih metabolita u pčelinjim proizvodima, a posljedično i mogućih štetnih posljedica za zdravlje ljudi.

Slika 3. Mjera sanacije američke gnjiloće medonosne pčele spaljivanjem.

Slika 4. Uzorkovanje prilikom sumnje na američku gnjiloću.

2.2.5. ZAKONSKA REGULATIVA

Američka gnjiloća je bolest čije se nadziranje i suzbijanje propisuje Naredbom o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2021. godini (NN 2/2021). Blest je također regulirana Pravilnikom o mjerama suzbijanja i iskorjenjivanja pčelinjih bolesti (NN 114/2004), Pravilnikom o uvjetima zdravlja životinja i uvjetima za izdavanje certifikata za uvoz pčela (*Apis melifera* i *Bombus spp.*) iz određenih trećih zemalja (NN 101/2009)", te Zakonom o veterinarstvu (NN 88/13, 148/13, 115/18).

2.3. DEZINFEKCIJA U PČELARSTVU

Dezinfekcija je proces uništavanja mikroorganizama na površinama, u vodi, u zraku i s površine tijela. Cilj dezinfekcije je uništiti patogene mikroorganizme, tako da ne dođe do pojave zaraznih klinički vidljivih znakova ekonomski važnih pčelinjih bolesti. Dezinfekcija može biti preventivna ali i završna mjera po sanaciji bolesti. Preventivnu dezinfekciju obavlja pčelar. Ona uključuje čišćenje alata, pčelarskog pribora, opreme, te samih košnica. Dezinfekcija može biti i žarišna, ukoliko dođe do pojave bolesti, a njen cilj je sprječavanje daljenjeg širenja infekcije (BEDNAR i sur., 2008.) Prilikom dezinfekcije, važno je znati mehanizme širenja infekcije, svojstva dezinficijensa i moguće nuspojave pojedinog dezinficijensa (BEDNAR i sur., 2008.).

2.3.1. OPĆI ZAHTJEVI PRIJE DEZINFEKCIJE

Da bi dezinfekcija bila uspješna, pčelar mora biti zadovoljavajuće educiran, ali i zaštićen. Poželjno je da pčelar prilikom dezinfekcije nosi zaštitnu masku, zaštitne naočale, rukavice, gumenu pregaču i gumene čizme. Odjeća se, nakon dezinfekcije, opere vodom na temperaturi od najmanje 60 ºC (LAŽEC, 2020.). O uspješnosti same dezinfekcije ovisi odabrano dezinfekcijsko sredstvo. Važan je način na koji se nanosi, njegova preporučena koncentracija, vrijeme izlaganja, pa i sami uvjeti u okolišu, odnosno kako druge tvari iz okoliša mijenjaju njegov učinak (UV zrake, temperatura, svijetlost itd.). Pčelari moraju uzeti u obzir i financijsku isplativost pojedinog dezinficijensa, kao i učinka na materijal koji se dezinficira (promjena svojstva materijala, korozija itd.). Čak i kada je dezinfekcija obavljena prema

uputama proizvođača, poštujući sve navedeno, ona ne mora biti potpuno uspješna jer učinkovitost ovisi i o otpornosti patogenih mikroorganizma.

Učinci pojedinog dezinfekcijskog sredstva mogu bili raznoliki, odnosno mogu dovesti od uništenja patogenih mikoorganizma ili do inhibicije njegovog rasta, odnosno onemogućavanja daljnjeg razmnožavanja.

2.3.2. VRSTE DEZINFEKCIJE

Dezinfekcija može biti kemijska i fizikalna (BLOCK i sur., 2001.).

Fizikalna dezinfekcija

Najstarija vrsta dezinfekcije, koja se često koristi zbog svoje jednostavnosti, niske cijene, učinkovitosti, te najmanje štetnosti za okoliš (BLOCK, 1991.). Temelji se na uporabi suhe ili vlažne topline, te zračenja. Najučinkovitija metoda, koja je ujedno i naređena mjera nakon sanacije američke gnjiloće (NN 2/2021), je opaljivanje većih drvenih dijelova košnice, a provodi se nakon detaljnog mehaničkog čišćenja. Iako najstarija, često se koristi radi visoke otpornosti pojedinih uzročnika bolesti i još uvijek je nezamjenjiva. Ukoliko nije bilo bolesti legla i pčela, košnice se može i preventivno opaljivati. Svi dijelovi košnice se očiste od ostataka propolisa, voska i meda. Plinskim plamenikom se prolazi po svim površinama dok drvo ne postane svjetlo smeđe boje. Važno je izbjeći zapaljivanje. Ova metoda se često koristi i nakon kemijske dezinfekcije, kao zadnji korak dezinfekcije, te je česta i u preventivnoj dezinfekciji. (LAŽEC, 2020.)

Druga, često upotrebljavana metoda je i kuhavanje u vodi. Predmeti se prokuhavaju u vreloj vodi, pod atmosferskim tlakom, tijekom 30 minuta. Većinom se u vodu dodaju različita kemijska sredstva, koja pospješuju dezinfekciju, poput kristalne sode, kaustične sode ili varikine, te se na taj način kombiniraju primjena fizikalne i kemijske metode dezinfekcije (DOBBELEARE i sur., 2001.).

Viša temperatura i viši postotak vlage poboljšavaju učinak dezinfekcije, stoga je korištenje vrućeg zraka izrazito učinkovito. Predmeti se u pećnici / sušilici ostavljaju na temperaturi 110 do150 ºC, tijekom 30 minuta. Mana metoda zagrijavanja vrućim zrakom je da se ona može koristiti samo za manje predmete.

Metode koje su učinkovite, ali nisu često u uporabi u dezinfekciji u pčelarstvu su pasterizacija i autoklaviranje. Pasterizacija se temelji na izmjeni brzog zagrijavanja i brzog hlađenja, na temperaturama 85 do 90 ºC. Autoklaviranje, odnosno dezinfekcija parom se odvija na temperaturi višoj od 100 ºC, srednjim tlakom, kroz 45 minuta (NAVARRETE i sur., 2001.). Obje metode su učinkovite, ali upotrebljive za manji pribor i alat, najčešće u laboratoriju, što ih čini skupljima i manje proširenim u terenskim uvjetima.

Premda u pčelarstvu u RH nisu često korištena, u fizikalne metode dezinfekcije uključujemo i zračenja, odnosno ultraljubičasto zračenje te ionizirajuće zračenje, odnosno gama zračenje (BEDNAR i sur., 2008.). Ultraljubičasto zračenje valnih duljina 253 do 280 nm ima baktericidni učinak, a on se postiže uporabom fluorescentnih svjetiljki (KRAMER i sur., 2017). Mane ove metode dezinfekcije su što djeluje samo površinski, a površina treba biti primjereno očišćena jer prašina i ostale nečistoće smanjuju njegovu djelotvornost. Nadalje, zračenje ne djeluje na spore bakterija, a učinkovitost lampi se smanjuje s njihovom uporabom. Najveća prednost ultraljubičastog zračenja je uništavanje pojedinih virusa, ali to nije dostatno istraženo u pčelarstvu (BEDNAR i sur., 2008.). Ionizirajuće zračenje, odnosno gama zračenje, jakosti 5 kGy ima velik učinak na uništavanje bakterija (MCARTHUR i sur., 2017.). Mane ove metode su komore potrebne za obavljanje zračenja, te je za njihovo korištenje potreban stručnjak koji bi njome upravljao. Ova metoda dezinfekcije je preskupa, te pčelaru nije isplativa. bez obzira na veliku učinkovitost.

Od fizikalnih metoda, pčelari najčešće koriste metode opaljivanja i prokuhavanja, zbog svoje jednostavnosti, učinkovitosti, te pristupačne cijene. Ostale navedene metode, bez obzira na ponekad i veću učinkovitost, nisu u širojuporabi u suvremenom pčelarenju (LAŽEC, 2020.).

Kemijske metode dezinfekcije

Kemijski dezinficijensi su razvrstani u različite skupine, ovisno o mehanizmu kemijske reakcije koji potiču njihovom uporabom. Najčešće upotrebljavani dezinficijensi djeluju na principu oksidacije i hidrolize, ali mogu djelovati i na proteine (koagulacija ili stvaranje soli proteina), mogu mijenjati permeabilnost membrane, uzrokovati mehaničke poremećaje u stanicama ili enzimskom sustavu (BEDNAR i sur., 2008.).

Kemijski spojevi koji mogu djelovati dezinfekcijski su:

1) Hidroksidi i alkalne soli

Hidroksidi su anorganski kemijski spojevi koji se sastoje od metalnih kationa i hidroksidnih aniona, OH^-, ionske ili složenije slojevite strukture. Često se koriste u pčelarstvu jer su lako dostupni, jeftini, a mogu otapati vosak i lipide. Ukoliko se koriste s drugim dezinfekcijskim sredstvima, povećavaju ukupnu učinkovitost. Najčešće korišteni hidroksidi, a i kemijski dezinficijensi su: natrijev hidroksid (natrijeva lužina, kaustična soda) i natrijev karbonat (kristalna soda) (OKAYAMA i sur., 1997.).

Natrijev karbonat, odnosno kristalnu sodu, upotrebljavamo kao 3% lužinu, a sama dezinfekcija traje pet do sedam minuta (BEDNAR i sur., 2008.). Ovom metodom dezinfekcije se učinkovito uklanjaju ostaci propolisa i voska, te druge mehaničke nečistoće. Varikina je učinkovita vodena otopina za dezinfekciju, koja se koristi u koncentraciji 3 do 5%, kroz pet minuta, ali ostavlja miris po kloru, koji onemogućuje korištenje opreme na određeno vremensko razdoblje.

Natrijeva lužina, odnosno kaustična soda, je najopasnija ali i najučinkovitija metoda dezinfekcije. Za remont okvira, odnosno za preventivnu dezinfekciju se upotrebljava u 2% koncentraciji, kroz dvije do tri minute. U slučaju završne dezinfekcije nakon sanacije američke gnjiloće, upotrebljava se veća koncentracija, od 5 do 7% (LAŽEC, 2020.). Prokuhani drveni dijelovi okvira nakon dezinfekcije natrijevom lužinom ostaju sluzavi, pa ih je potrebno isprati vodom, najbolje vodom pod pritiskom. Prilikom navedenih načina dezinfekcija opreme, otopina će se zamutiti, pa ju je potrebno zamijeniti. Važno je voditi računa i o koncentraciji dezinficijensa, koji vremenom i uporabom slabi. Nakon iskuhavanja opreme, oprema se ispire vodom, te se okviri slažu jedan na drugi i ostavljaju sušiti na zraku.

2) Oksidacijska sredstva

Kisik je izrazito reaktivan, te ima dobra dezinfekcijska svojstva. Ukoliko je visoka koncentracija organskih tvari, učinak će biti kratkoročan, dok će neki metali (srebro i magnezij) povećavati njegov učinak (CASTILO i sur., 2017). Vodikov peroksid (H_2O_2) je često korištena otopina u pčelarstvu. Može se kupiti kao 3%, 10% kao i 30% vodena otopina, ali se najčešće koristi u koncentracijama od 0,5 do 3 % . Mana joj je kratki rok trajanja, čime joj se učinkovitost smanjuje (LAŽEC, 2020.). Kalijev permanganat ($KMnO_4$) čine tamnoljubičasti kristali, lako topljivi u vodi.

Kada vodena otopina dođe u kontakt s organskom tvari, oslobađa se kisik, te otopina mijenja boju u smeđu, čime joj se smanjuje učinkovitost. $KMnO_4$ se najčešće koristi u koncentraciji od 0.3%, što učinkovito djeluje na osjetljivije viruse i bakterije. Nova skupina sredstava, koja nema široku primjenu, su organski peroksidi. Nisu štetni za okoliš, te mogu djelovati i na spore bakterija, ali im je velika mana visoka cijena, koja prosječnom pčelaru onemogućuje svakodnevnu primjenu.

3) Organske kiseline

Organske kiseline se često koriste u ekološkom pčelarstvu, zbog akaricidnog učinka na grinju *V. destructor*, ali one imaju i dezinfekcijski učinak. Djeluju na različite vrste bakterija i gljivica, od kojih su najvažnije spore *Nosema* spp., te *Aspergillus flavus i Ascosphaera apis,* koji uzrokuju vapnenasto i kamenito leglo. Najčešće korištene kiseline su: oksalna, mravlja, octena te sumporna (CONTE i sur., 2020.).

Prednosti korištenja kiselina su: laka dostupnost, povoljna cijena, nisu otrovne za pčele, ne ostavljaju rezidue u pčelinjim proizvodima, jednostavne su za primjenu i skladištenje, nema opasnosti od gubitka matice ili pčelinjeg legla. Prilikom pripremanja otopine za dezinfekciju, važno se držati uputa proizvođača, te pravila da se kiselina ulijeva u vodu, a ne obratno. Navedene kiseline se mogu koristiti u većim koncentracijama, jednokratno, ili u nižim koncentracijama kroz duže razdoblje. Pčelari se većinom odlučuju za tretiranje nižim koncentracijama kroz duže vremensko razdoblje (BEDNAR i sur., 2008.).

4) Anorganske kiseline

Anorganske kiseline se ne koriste puno u pčelarstvu, zbog nagrizajućih svojstava. Što je pH niži, otopina je snažnija. U preradi voska se koriste fosforna (H_7PO_4) te sumporna kiselina (H_2SO_4), najčešće u koncentracijama 0,5 do 5 %.

5) Halogeni

Halogeni su izrazito oksidacijski spojevi, topljivi u vodi. Najvažniji predstavnik skupine je natrijev hipoklorit (NaClO), u narodu poznat i kao varikina. U pčelarstvu ima široku primjenu zbog svojih baktericidnih i virucidnih svojstava. Najčešće se koristi u koncentraciji od 3 do 5

% tijekom 30 minuta izlaganja (BEDNAR i sur., 2008.). Nedostatak ovog dezinficijensa je neugodan miris klora koji ostaje na opremi, što onemogućuje korištenje opreme na određeno vrijeme. Potreban je i oprez prilikom rukovanja samim dezinficijensom, jer ukoliko dođe u kontakt s kiselinama (ili drugim dezinficijensima nižeg pH), može doći do oslobađanja vodikovog klorida koji je izrazito iritantan i otrovan za ljude.

6) Metali i njihovi spojevi

Metali mogu biti izrazito otrovni za pčele (BURDEN i sur., 2019.), stoga je potreban oprez s njihovom uporabom. Spojevi srebra se najčešće koriste u dezinfekciji vode, a pčele dobro podnose koloidno srebro, kao i bakar. Premda mogu biti učinkoviti dezinficijensi, ostali spojevi metala se ne koriste u pčelarstvu.

7) Alkoholi i eteri

Alkoholi se većinom ne koriste kao samostalna sredstva za dezinfekciju, već kao sastavina određenog dezinficijensa, a optimalna koncentracija je oko 70%. Dobro djeluju na viruse, ali nije dokazano djelovanje na bakterijske spore (BUTTKE i sur., 1985.). Korisni su kao otapala određenim aktivnim tvarima, ali njihovo samostalno djelovanje nije istraženo.

8) Aldehidi

Aldehidi kemijskim reakcijama redukcije i alkilacije denaturiraju proteine te na taj način dovode do oštećenja, odnosno smrti stanice na koju djeluju. Najjednostavniji aldehid je formaldehid, plin koji se ujedno i najčešće koristi u pčelarstvu, čak i u ekološkom načinu pčelarenja (BURDEN i sur., 2019.). Formaldehid je otrovan, bezbojan plin, specifičnog mirisa, te s njime treba oprezno rukovati, prema uputama proizvođača. Korištenje formaldehida je najčešće za dezinfekciju bačvi i drugih metalnih predmeta, koji se moraju temeljito isprati. Drveni predmeti, kao i vosak se ne dezinficiraju formaldehidom jer ostavlja rezidue koje ne bi smjele doći u kontakt s pčelama, odnosno s pčelinjim proizvodima. Kao dio smjesa za dezinfekciju se često koristi i glutaraldehid. On izrazito učinkovito djeluje na bakterije, viruse, čak i na spore. Većinom se koristi razrijeđen na 2%, u kombinaciji s 0.3% natrijeva bikarbonata.

9) Površinski aktivne tvari- tenzidi, detrdženti

Sapuni i druge površinski aktivne tvari, nam nisu toliko važne u samoj dezinfekciji, već u otapanju masnoća, odnosno u čišćenju kao pripremi za dezinfekciju. Imaju široku primjenu u pčelarstvu, ali mogu smanjivati djelovanje određenih dezinficijensa.

2.3.3. PRAVILA DEZINFEKCIJE I NAJČEŠĆE POGREŠKE

Prilikom odabira dezinficijensa, važno je uzeti u obzir njegovu učinkovitost, rezidue koje može ostavljati na dezinficiranim predmetima i u pčelinjim proizvodima, cijenu i rok trajanja. Prilikom pripremanja otopine za dezinfekciju, ključno je postići određenu koncentraciju, jer o tome ovisi sama uspješnost dezinfekcije (BURDEN i sur., 2019.).

Pripremljenu otopinu dezinficijensa treba koristiti odmah, a neki dezinficijensi imaju pojačanu učinkovitost pri određenim temperaturama. Pojedini dezinficijensi djeluju tako da inaktiviraju djelovanje drugih, zato je važno dobro pročitati upute proizvođača, ali i redovito mijenjati aktivne tvari dezinficijensa, kako bi se smanjila mogućnost pojave otpornosti.

Prije postupka dezinfekcije, opremu treba primjereno očistiti, te ne smanjivati preporučeno vrijeme izlaganja dezinficijensu. Pčelar treba biti prikladno zaštićen, a to uključuje nošenje zaštitne opreme, odnosno rukavica, zaštitnih naočala, prikladne odjeće i obuće. Ukoliko se pčelar pridržava navedenih uputa, dezinfekcija bi trebala biti uspješna.

Svaki komercijalno plasiran proizvod, kao i uputa za njegovu uporabu, mora proći službenu registraciju prije stavljanja na tržište.

2.3.4. BEE PROTECT F

Proizvođač ovaj proizvod deklarira kao dodatak hrani za pčele s mineralima. Sastav čine: voda, saharoza, te makronutrijenti. Proizvođač na deklaraciji navodi da pomaže u sprječavanju nozemoze (uzrokovane sporama mikrosporidija *Nosema apis* i *Nosema ceranae*), u suzbijanju europske gnjiloće (uzrokovane bakterijom *Mellisocoocus pluton*) i američke gnjiloće (uzrokovane bakterijom *P. larvae*), te smanjuje pojavu vapnenastog legla s popratim akaricidnim djelovanjem na *V. destructor*.

Bee Protect F sadrži prirodne sastojke te poboljšava opće stanje organizma pčele i ima pozitivan utjecaj na fiziološke funkcije što pridonosi većoj fizičkoj aktivnosti i izdržljivosti pčela. Pčele svoje košnice održavaju čistima, pčelinjak se regenerira na prirodan način i daje med vrhunske kakvoće. Makronutrijenti koji tome pripomažu su bakar i cink koji doprinose zaštiti od oksidativnog stresa te normalnoj funkciji imunološkog sustava kao i željezo, magnezij i mangan.

Preporučena primjena je od rane jeseni kada se izvrca med iz košnica do proljeća u obliku prihrane pčelinjih zajednica. U nekoliko navrata se dodaje po jedan čep na jednu litru šećernog sirupa, u zimskom razdoblju se preporuča dodavanje jednog čepa na jedan kilogram pogače, a ista doza se primjenjuje i u razdoblju bez paše. Svaki od navedenih tretmana se provodi četiri do šest dana uzastopno.

Bee Protect F je tekućina svijetloplave boje, katakterističnog mirisa, kiselog pH (1.16), te je pakiran u PET ambalažu zapremine 500 ml s čepom/dozatorom. Potrebno je osigurati čuvanje u dobro zatvorenoj originalnoj ambalaži na sobnoj temperaturi, dobro prozračivanom mjestu, zaštićeno od izravnog sunčevog svjetla.

Prilikom rukovanja s opisanim dezinfekcijskim sredstvom, preporučeno je nošenje zaštitne maske, zaštitne obuće i gumenih rukavica, te je potrebno osigurati prozračivanje prostora. Ukoliko dođe u kontakt s kožom, moguće je crvenilo, peckanje, prilikom dodira s očima crvenilo, žarenje i suzenje, a u slučaju gutanja žarenje sluznica, mučnina i povraćanje. Podataka o akutnoj i kroničnoj otrovnosti za ribe, rakove, alge/vodene biljke, nema.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Podrijeklo ispitivanog dezinfekcijskog sredstva

Bee Protect F je nabavljen kupnjom u trgovini pčelarskim priborom i opremom. Kupljena je jedna boca volumena 500 mL. Sredstvo je skladišteno prema uputama proizvođača, na sobnoj temperaturi, zaštićeno od izravnog sunčevog svijetla.

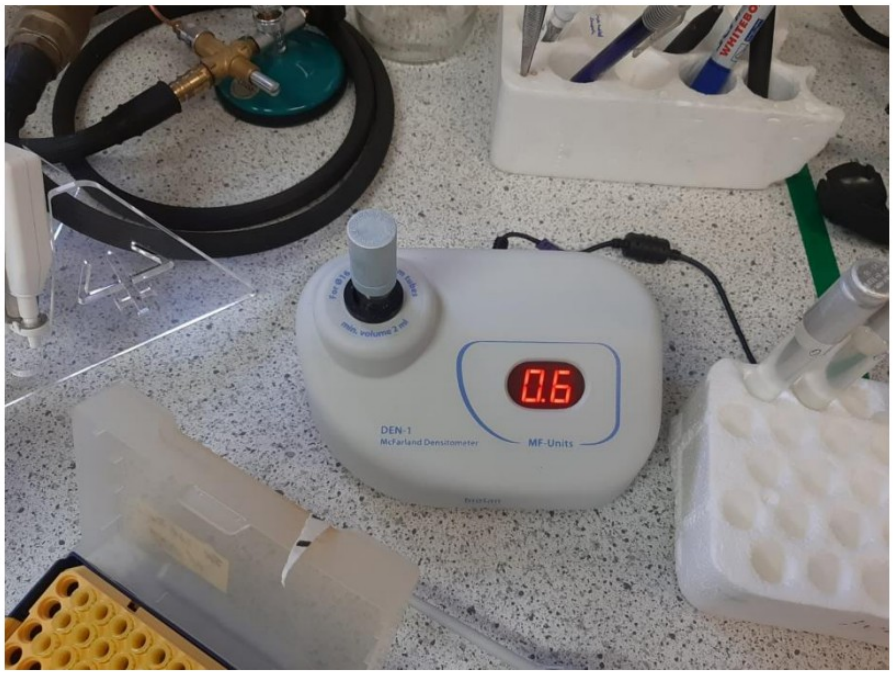
Slika 5. Bee protect F.

3.2. Agar difuzija

Agar difuzija je jednostavna, kvalitativna metoda u kojoj se bakterijski inokulum ravnomjerno širi pomoću sterilne vate na sterilnoj Petrijevoj zdjelici, na koju je nasađen Müller-Hintonov agar. Postoji više varijacija same metode, a ovdje je korištena je „agar-well diffusion“ metoda (BALOUIRI i sur.,2016.). Bakterije *P. larvae* koje su korištene pripadaju certificiranom soju ERIC 1 (EURL, Francuska), za koji se predpostavlja da je najrasprostraniji u RH. Bakterije *P. larvae* su razrijeđene na 0.6 McF (točna vrijednost je utvrđena densitometrom). Pripremljene bakterije su razrijeđivane s puferiranom fiziološkom otopinom (PBS), u omjeru 1:9, odnosno 1000 µL bakterija i 9000 µL medija, te je tako dobiven ukupni volumen od 1 mL. U međuvremenu je u sterilne Petrijeve zdjelice ulijan otopljeni agar. Sterilni bris umočen je u pripremljeni inokulum pojedinog bakterijskog soja te ravnomjerno razmazan po površini odgovarajućeg agara u vodoravnim i okomitim smjerovima. Pomoću sterilnih čeličnih cilindara promjera 6 mm i visine 10 mm u podlozi su izbušene rupice, pri čemu je njihova međusobna udaljenost, kao i udaljenost od ruba Petrijeve zdjelice iznosila najmanje 50 mm (kako bi se jasno mogla očitati zona inhibicije). U jednu rupicu je apliciran dezinficijens, a u preostale rupice bakterije te 76% etanol. Označena je negativna proba (bakterije), pozitivna proba (etanol), dezinficijens, te datum nasađivanja. Isti proces je ponovljen i s drugom Petrijevom zdjelicom.

Difuzija ispitivanih dezinfekcijskih sredstava u hranjivu podlogu omogućena je poranjivanjem Petrijeve zdjelice u hladnjaku na 4 °C, tijekom 60 minuta, a nakon toga se provedena inkubacija bakterijskih kultura. Bakterijske kulture inkubirane su tijekom 18 sati (Sanyo MIR-533, Sanyo, Japan). Test je proveden u triplikatu. Rezultati su očitani kao zona inhibicije oko rupice u kojoj nema rasta mikroorganizama, odnosno prisutnost antimikrobne aktivnosti ukazuje na odsutnost rasta bakterija naposredno ispod ispitnog uzorka (BAUER i sur., 1966.). Promjeri zona inhibicija mjereni su ravnalom, s točnošću od 1 mm.

Slika 7. Aplikacija dezinficijensa na hranjivi medij u Petrijevoj zdjelici.



Slika 8. Utvrđivanje broja bakterija densitometrom.

3.3. Ispitivanje učinka dezinficijensa EnSURE luminometrom

EnSURE luminometar je instrument koji prikuplja, analizira i izvještava o podacima iz više pokazatelja kvalitete. Njegova uporaba je proširena na različite sektore, uključujući farmaceutsku industriju, prehrambenu industriju, ugostiteljstvo, te se primjenjuje u većini laboratorija za različita znanstvena istraživanja. Sustav za detekciju uključuje tri komponente, ENSURE luminometar, Supersnap ili Ultrasnap testove, te SureTrend softver, čije je uloga uporaba bioluminiscencije za otkrivanje adenozin trifosfata (ATP), odnosno ispitivanje, evidentiranje, te praćenje bioloških onečišćenja na površinama ali i u uzorcima vode. Adenozin trifosfat je molekula energije koja se nalazi u svim biljnim, životinjskim, te mikrobnim stanicama. Budući da je to kemijski oblik energije u stanicama, ATP je prisutan u otprilike konstantnim količinama. Zbog toga se njegova kvantifikacija može koristiti za procjenu količine mikroorganizama u uzorku. Kada ATP molekula dođe u kontakt s luciferazom, diluciferin se konvertira u oksiluciferin, te dolazi do kemijske reakcije emitiranja svjetlosti, odnosno bioluminiscencije. Supersnap i Ultrasnap testovi koriste bioluminscentu tehnologiju, dovodeći u kontakt luciferazu s molekulom ATP-a. Umetanjem testa u luminometer, dolazi do očitavanja i izrazito niskih razina ATP-a, odnosno razina svjetlosti koja nastaje reakcijom je izravno proporcionalna količini ATP-a. Luminometar nakon 15 sekundi očitava rezultat, koji je izražen kao relativna svjetlosna jedinica (RLU), koja se može pretvoriti u RLU/mol ATP-a.

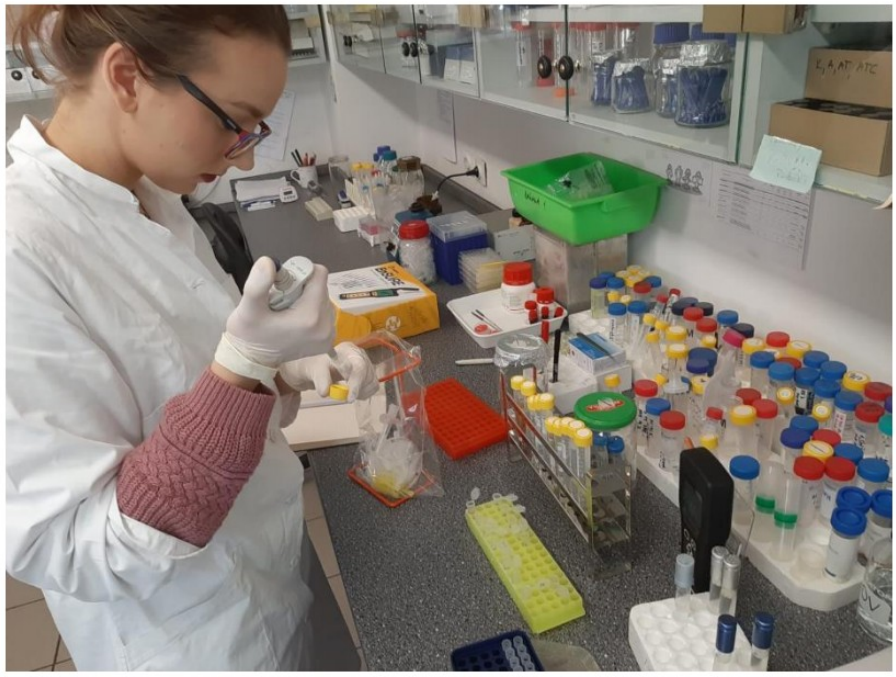
Testovi koji se mogu koristiti ovise o uzorku, a to su ATP testovi, testovi za mikroorganizme, te testovi za mjerenje aktivnosti enzima. Test koji je korišten u ovom istraživanju je Super snap High sensitivity ATP test, koji je ujedno i najosjetljiviji test jer otkriva i izrazito niske koncentracije ATP-a. Uređaj dovodi u kontakt uzorak (bakterije) s jedinstvenim reagensom. Emitira se svjetlost proporcionalna količini ATP-a prisutnog u uzorku, te se na taj način očitava razina onečišćenja u sekundama. Prednost ove metode je njezina brzina: za tri do pet dana mogu se dobiti rezultati, dok konvencionalne metode obično traju tri do četiri tjedna (FINGER i sur., 2013.). U istraživanju o pouzdanosti mjerača bioluminiscencije je dokazana prihvatljiva lineranost i ponovljivost rezultata različitih luminometara, ali je dokazano da dezinfekcijska sredstva prigušuju očitanje ATP-a (OMBIDBAKSH i sur., 2014.).

Cilj je bio ispitati aktivnost bakterija u različitim koncentracijama dezinficijensa, u različitim vremenima izlaganja. Prvi korak je bila priprema suspenzije bakerija na standardiziranu jedinicu u mikrobiološkim testiranjima, McFarland. McFarland standardi se koriste za približnu procjenu broja bakterija (CFU/mL) u tekućini, uspoređujući mutnoću

bakterijske suspenzije s McFarland standardom. Bakterije su razrijeđene na 0.8 McF (točna vrijednost je utvrđena densitometrom). Koncentracije dezinficijensa koje su korištene su: 1 %, 2 %, 5 %, te 10 % u razdobljima izlaganja od 30 sekundi, jedne minute te dvije minute. Prilikom svakog mjerenja je napravljena i pozitivna i negativna kontrola. Pozitivnu kontrolu su činile bakterije, a negativnu 76% etanol.

Da bi dobili 5% koncentraciju dezinficijensa u suspenziji bakterija (0.8 McF), ispipetirano je u Eppendorf epruvetu, 950 µL bakterija i 50 µL dezinficijensa, te su promiješane. Nakon 10 sekundi inkubacije, pomoću EnSure luminometra su očitani rezultati, odnosno količina bakterija. Super snap High sensitivity ATP test, je nakon 10 sekundi uronjen u 5 % otopinu. Tri sekunde nakon uranjanja štapić je izvađen iz 5 % otopine, te je prema uputama, presavinut njegov gornji dio. Na taj način je reagens (luciferaza) došao u kontakt s 5 % otopinom. Štapić je promućkan 5 sekundi, te je umetnut u za to predviđeni otvor na EnSure luminometru, koji je bio upaljen i spreman za očitavanje. Nakon umetanja štapića, a nakon 15 sekundi očitavanja dobiven je rezultat. Isti postupak je ponovljen s različitim koncentracijama dezinficijensa, u različitim vremenima izlaganja.

Slika 9. Izgled luminometra i UltraSnap ATP testa.



Slika 10. Aplikacija dezinficijensa u Eppendorf epruvetu.

3.4. Ispitivanje sporocidnog učinka Bee protect F

Suspendiranjem pčelinjih ličinki propalih od posljedica američke gnjiloće u sterilnoj vodi dobivena je osnovna suspenzija spora bakterije *P. larvae*. Zatim, da se oslobode spore iz probavnog sustava ličinke, toplinskom šokom, odnosno zagrijavanjem osnovne supenzije na 80 ºC, tijekom 10 minuta je tretirana osnovna suspenzija spora. Koncentracija spora osnovne otopine je određena nanošenjem serijskih razrijeđenja (10^{-1} to 10^{-8}) na poluselektivni medij, MYPGP. Poluselektivni medij, se sastoji od normalnog MYPGP medija (za koji je utvrđeno da *P. larvae* dobro sporulira) nadopunjenog s 20 µg ml^{-1} pipemidne kiseline i 9 µg ml^{-1} nalidiksinske kiseline. Ovakav poluselekivni medij se pokazao najuspješnijim za sporulaciju bakterija *P. larvae* (ALIPPI, 1995.). Osnovna suspenzija je pohranjena na 4 °C do uporabe. Spore su stavljene na inkubaciju na 37 °C, tijekom četiri dana. Nakon inkubacije spora, utvrđen je broj jedinica formiranih kolonija (CFU).

Nakon inkubacije spora *P. larvae*, učinjen je suspenzijski test. Suspenzijski testovi, kao što i samo ime govori, mjere učinkovitost dezinficijensa u inaktivaciji određenih testnih mikroorganizama unutar određenog razdoblja izlaganja u suspenziji. Postoje dva osnovna ispitivanja u europskoj normi, a ovdje je korišten kvantitativni test suspenzije za procjenu osnovnog baktericidnog djelovanja kemijskih dezinficijensa i antiseptika (EN 1040: 2005).

U testu suspenzije, dodan je dezinficijens Bee protect F, izravno testnim sporama *P. larvae* u suspenziji. Sterilni neutralizator dodan je odmah po odrešenom razdoblju izlaganja kako bi se zaustavili učinci ispitivanog dezinficijensa, a uzorak smjese ulije se u pločicu za izlijevanje i inkubira. Broji se broj preživjelih spora i uspoređuje s izvornom veličinom kulture. Sterilni neutralizator je dodan nakon 5, 10 i 30 minuta, kako bi se zaustavilo djelovanje dezinficijensa. Nakon inkubacije na temperaturi 37 °C, tijekom četiri dana, prebrojane su preživjele spore.

4. REZULTATI

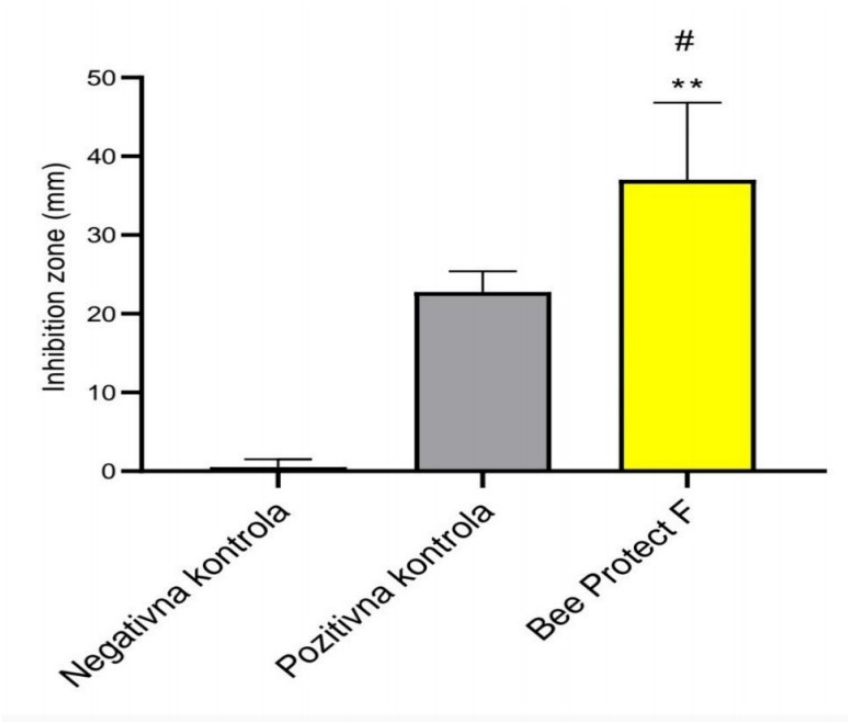
4.2. Rezultati dobiveni očitanjem zone inhibicije

Nakon provedene inkubacije, ravnalom su izmjerene zone inhibicije. U Petrijevim zdjelicama gdje su bile nasađene bakterije, zone inhibicije su iznosile: 36 mm, 38 mm, 25 mm, te 49 mm (rezultati prikazani u Tablici 2.). Negativnu kontrolu čine bakterije, a pozitivnu kontrolu 76% etanol, koji su takoder nasađeni u Petrijeve zdjelice, te inkubirani (rezultati prikazani u Tablici 2). Rezultati metode difuzije u agaru prikazani su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija triju nezavisnih eksperimenata (negativna kontrola, pozitivna kontrola, te učinak Bee protect F) a izraženi u milimetrima.

Postojanje statistički značajne razlike među rezultatima određeno je primjenom jednosmjerne analize varijance (one-way ANOVA) uz Tukeyev post-hoc test. Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) korištena je za utvrđivanje postojanja statistički značajnih razlika između tri ili više neovisnih (nepovezanih) skupina, odnosno uspoređuje svojstvo koje nas zanima (inhibicijske zone) i pokazuje značajnost razlika. Značajnost (signifikantnost) testa unaprijed se zadaje i obično je 0,05 (5%) ili 0,01 (1%). Prema tome, ukoliko je testiranjem P vrijednost iznosila <0.05 ili <0.01, postoje statistički značajne razlike između testiranih skupina. U ovom slučaju je P vrijednost je iznosila <0.0001, što smatramo statistički značajnim rezultatom. Mana ANOVA testa je što nam govori da postoji statistički značajna razlika između najmanje dvije skupine, ali ne i između kojih skupina. Zato je izveden i Turkeyev post hoc test, koji je uspoređivana svaku skupinu međusobno, kako bi utvrdili između kojih ispitivanih skupina postoji značajna razlika. Značajna razlika je utvrđena između skupina negativne kontrole i skupine Bee protect F, gdje je P iznosio <0.0001. Statistička analiza provedena je korištenjem programa GraphPad Prism 9.0 (Grafikon 1).

Tablica 2. Prikaz izmjerenih vrijednosti zona inhbicije, izražen u milimetrima.

Negativna kontrola (mm)	Pozitivna kontrola (mm)	BEE PROTECT F (mm)
0	25	38
2	21	36
0	25	25
0	20	49



Grafikon 1. Grafički prikaz zona inhibicije.

(Oznake na slici: # poz kontrola naspram Bee Protect F , ** negativna kontrola naspram Bee Protect F).

4.2. Rezultati ATP testa bioluminiscencije

Dobiveni rezultati vrijednosti ATP-a, očitani ENSURE luminometrom su prikazani u Tablicama 3., 4. i 5., te u Grafikonu 2. Pozitivne i negativne kontrole su jednake kao i kod zona inhibicije, odnosno pozitivna kontrola je 76% etanol, dok su negativna bakterije.

Postojanje statistički značajne razlike među rezultatima određeno je primjenom jednosmjerne analize varijance (one-way ANOVA) uz Tukeyev post-hoc test. Jednosmjernom analizom varijance je dobiven statistički značajan rezultat, odnosno P vrijednost je iznosila <0.05. Sljedeći korak je bio Turkeyev post hoc test, kako bi utvrdili između kojih skupina postoj statistički značajna razlika. Ona je utvrđena između Bee protect F skupine i negativne kontrole. Statistička analiza provedena je korištenjem programa GraphPad Prism 9.0 (Grafikon 2).

Tablica 3. Prikaz očitanih vrijednosti ATP-a, izražen u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU), tijekom 30 sekundi.

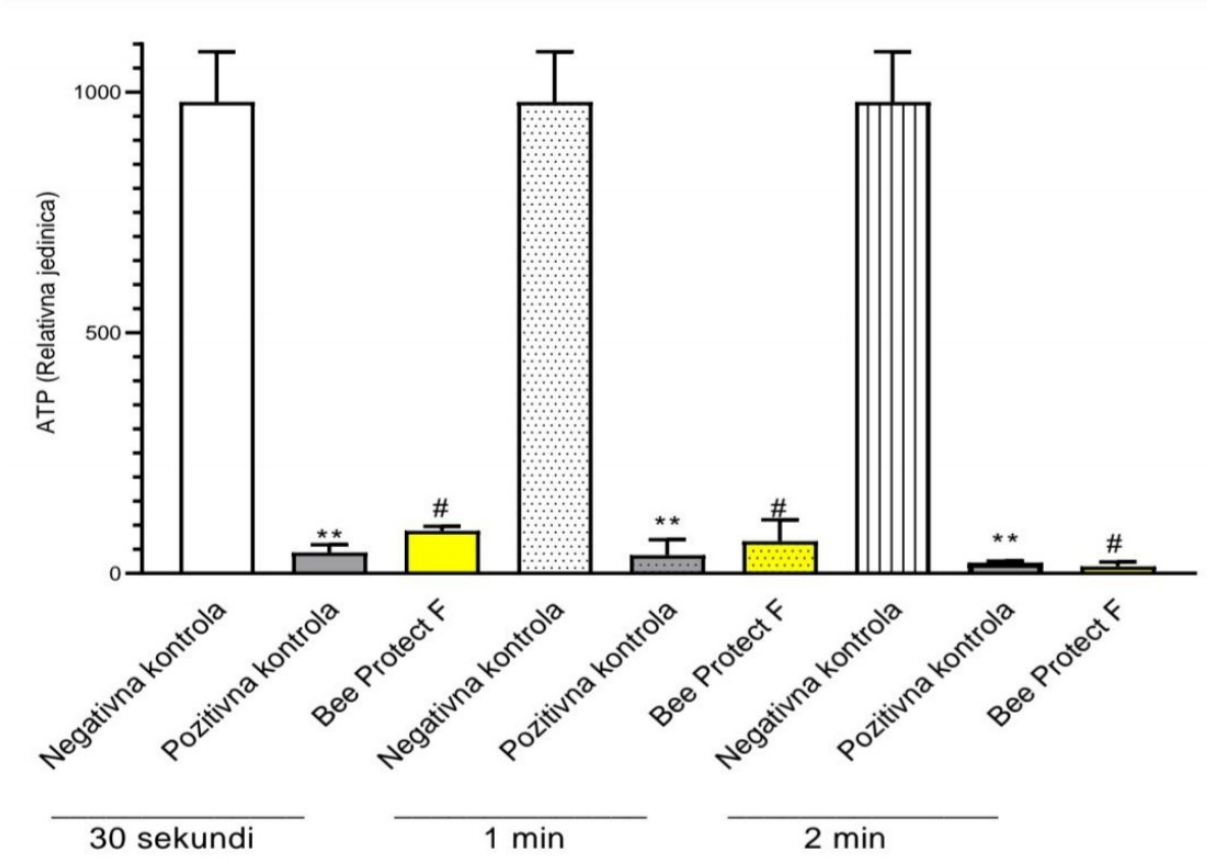
30 s		
Negativna kontrola (RLU)	Pozitivna kontrola (RLU)	BEE PROTECT F (RLU)
1100	25	90
1030	49	89
920	39	100
870	62	78

Tablica 4. Prikaz očitanih vrijednosti ATP-a, izražen u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU), tijekom 60 sekundi.

60 s		
Negativna kontorola (RLU)	Pozitivna kontorola (RLU)	BEE PROTECT F (RLU)
1100	86	88
1030	22	79
920	25	2
870	20	100

Tablica 5. Prikaz očitanih vrijednosti ATP-a, izražen u relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU), tijekom 120 sekundi.

120 s		
Negativna kontorola (RLU)	Pozitivna kontrola (RLU)	BEE PROTECT F (RLU)
1100	25	19
1030	21	22
920	25	1
870	20	15

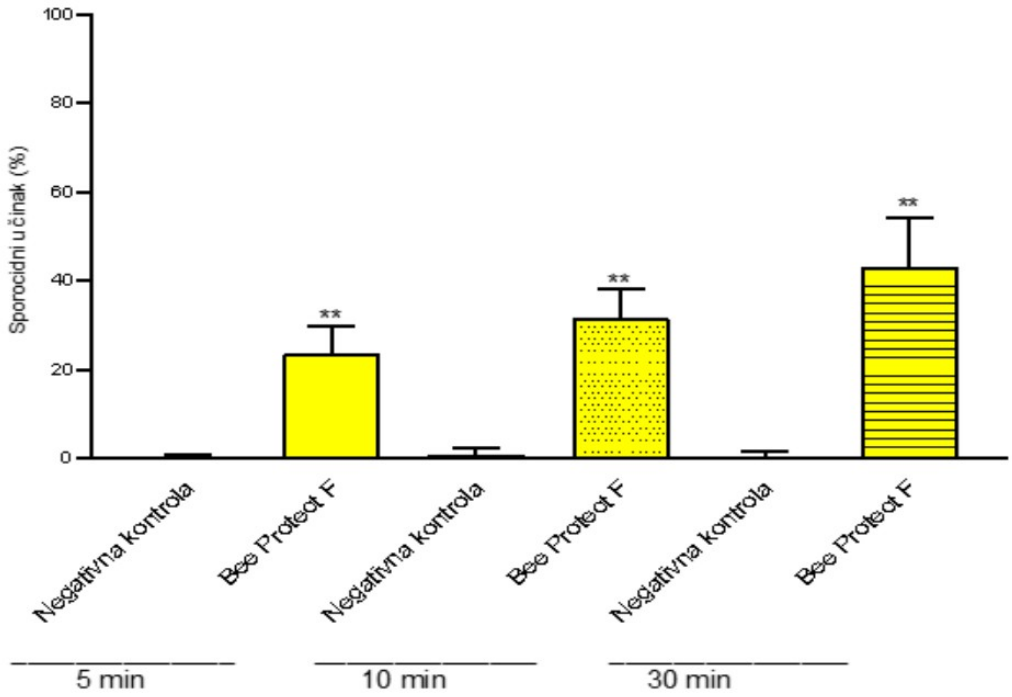


Grafikon 2. Grafički prikaz očitavanja razine ATP-a, tijekom različitih vremenskih intervala.

4.3. Rezultati dobiveni suspenzijskim testom

Nakon inkubacije, prebrojane su preživjele spore, te je dobiveni broj uspoređen s negativnom kontrolom, koju čine spore uzgojene na poluselektivnom mediju, MYPGP. Dobivene podatke smo obradili jednosmjernom analize varijance (one-way ANOVA). ANOVA testom smo dobili statistički značajan rezultat, odnosno P vrijednost je bila manja od <0.05, iznosila je <0.0001. Budući da ANOVA testom ne možemo utvrditi između kojih skupina je utvrđena značajna razlika, napravili smo i Turkeyev post hoc test. Značajna razlika je utvrđena između negativne kontrole i Bee protecta F, za svaku od tri promatrane neovisne skupine (5, 10 te 30 min.).

Rezultati su prikazani u Grafikonu 3., te je iz njega jasno vidljivo kako se sporocidni učinak povećava s vremenom izlaganja spora dezinficijensu.



Grafikon 3. Sporocidni učinak Bee protecta F, tijekom različitih vremenskih razdoblja.

5. RASPRAVA

U današnje vrijeme, pčele su u sve većoj opasnosti od izumiranja. Najveću opasnost i dalje predstavljaju nametnici, te patogeni mikroorganizmi, ali je važan antropološki učinak u vidu degradacije staništa, globalnog zatopljenja, te uporabe pesticida (VANENGELSDORP i MEIXNER, 2009.). Američka gnjiloća spada u najrazornije bakterijske bolesti pčela (JELINSKI, 1985.), proširena je po cijelom svijetu (MATHESON, 1993.), te je jedan od glavnih uzroka slabljenja i propadanja pčelinjih zajednica, a samim time uzrokuje i velike ekonomske gubitke u pčelarstvu (JOHNSON, 2007.).

Bolest je iznimno teško suzbiti, zbog tvrdokornosti spora uzročnika. Za uspješno zaražavanje jedne ličinke, dovoljno je 10 spora, koje su izrazito otporne na visoke temperature (FORSGREN i sur., 2008.; GENERSCH, 2008.). Najučinkovitija metoda sanacije bolesti je spaljivanje košnica, a uporaba antibiotika je zabranjena zbog pojave recidiva bolesti (KOCHANSKY i sur., 2001.), rezidua koje ostavljaju u pčelinjim proizvodima (CHAN i sur., 2011.; TIAN i sur., 2012.), a i nedjelovanju na spore. Slijedom navednog, važno je istražiti alternativne metode dezinfekcije radi što uspješnijeg suzbijanja bolesti.

Nema puno istraživanja o učincima dostupnih dezinficijensa na bakteriju *P. larvae*. U istraživanju iz 2021. godine, KIRIAMBURI i sur., uspoređuju učinkovitost dvaju dezinficijensa: Disinfection for beekeeping (DFB) (Swienty, Denmark) i Virkon S (Lanxess, Germany), odnosno njihov biocidni učinak na različitim materijalima, uključujući drvo. Proizvođač navodi da DFB imaju 99.99% učinak na bakterije, spore, gljivice i bakterije, te je namijenjen dezinfekciji u pčelarstvu, dok je Virkon dezinfekcijsko sredstvo razvijeno za poljoprivrednu i stočarsku proizvodnju. Međutim, istraživanjem je dokazano da je učinkovitost DFB-a zanemarivo viša nego učinkovitost Virkon-a S, ali da se njihov biocidni učinak kretao od 88,6% do 96,8 %, što ne zadovoljava standard AFNOR NFT72, koji govore da bi biocidni učinak dezinficijensa za bakterije trebao iznositi 5 log, odnosno 99,999%.

U istraživanju iz 2000. godine, HERNANDEZ i sur., također su istraživali učinak Virkon-a, na bakterije, spore, viruse i plijesni, prema smjernicama AFNORA. Ispitivani dezinficijens nije pokazao zadovoljavajući sporicidni učinak.

U ovom istraživanju fokusirali smo se na biocidni učinak Bee protecta F u laboratorijskim, *in vitro*, kontroliranim uvjetima.

Proizvođač navodi da dezinficijens pomaže u suzbijanju američke gnjiloće, a proizvod je deklariran kao dodatak prehrani. Provedeno je istraživanje djelovanja sredstva u različitim koncentracijama i u različitim vremenima izlaganja, ispitivanjem ATP aktivnosti te agar difuzijom. Nakon mjerenja inhibicijskih zona, odlučili smo se za ANOVA test, kojim je utvrđena statistički značajna razlika ($P<0.05$) izmešu pokusne i kontrolnih skupina. Tukeyevim post hoc testom je utvrđena značajna razlika između negativne probe i Bee protect F-a. Ovi rezultati su značajni jer govore o djelotvornosti ispitivanog dezinfekcijskog sredstva.

Slične rezultate smo dobili i obradom podataka nakon ATP testa bioluminiscencije. ANOVOM je utvrđena statički značajna razlika, koja je Tukeyevim post hoc testom potvrđena. Statistički značajna razlika je utvrđena između Bee protect F i negativne probe, te je jasno vidljivo da se povećanje učinka sredstva povećava s njegovom koncentracijom (Grafikon 2.).

AFNOR NFT72-110 je standard koji služi kao normativni okvir za određivanje baktericidne, fungicidne, sporocidne i virucidne aktivnosti uključujući i bakteriofage. Ovi standardi se, osim u veterini, primjenjuju i u medicini, poljoprivredi, te prehrambenoj industriji. Prema AFNOR NFT72 -110 normi, dezinfekcijsko sredstvo ima zadovoljavajuć baktericidni učinak, ako dosegne aktivnost od 5 log. Logaritamska skala se često upotrebljava u mikrobiologiji, kako bi se lakše prikazale promjene u broju mikroorgamizama. Ekvivalentna vrijednost 5 log bi bio baktericidni učinak od 99,999 %.

Obradom dobivenih podataka u ovom istraživanju, baktericidna aktivnost se kretala od 1 log do 2 log, odnosno ispitivano sredstvo ima baktericidni učinak od 90% do 99%, što ne zadovoljava AFNOR normu.

Ispitivano sredstvo je polučilo određeni učinak, koji se povećavao s vremenom izloženosti. Budući da je istraživanje izvedeno u *in vitro* laboratorijskim uvjetima, te nije zadovoljilo propisane norme, ono se ne bi moglo preporučiti za završnu dezinfekciju niti za potpuno suzbijanje američke gnjiloće, već kao pomoć u dezinfekciji. Nadalje, FORSGREN i sur. (2008), su u svojem istraživanju "Variability in germination and in temperature i storage resistance among *Peanibacillus larvae* genotypes" zaključili da bi svako istraživanje s *P. larvae,* trebalo uključivati sojeve različitih genotipova jer je dokazano da je njihova sposobnost razmnožavanja, kao i otpornosti na temperature, različita.

Također, KIRIAMBURI i sur. (2008.), u svome istraživanju "Efficacy of two commercial disinfectants on *Peanibacillus larvae* spores", zaključili da dezinfekcijska sredstva imaju smanjeno djelovanje na nekim materijalima, poput drveta, te da je njihova sporocidna aktivnost značajno manja nego baktericidna.

Budući da je sporocidnost dezinficijensa iznimno bitna u pokušaju suzbijanja bolesti, rezultate dobivene suspenzijskim testom smo obradili ANOVA testom, te Turkeyevim post hoc testom. Utvrđen je sporocidni učinak sredstva, koji se povećavao s vremenom izloženosti, te je najveći zabilježen iznosio oko 48%. Prema AFNOR NFT72 -110 normi, dezinfekcijsko sredstvo ima zadovoljavajuć sporocidni učinak, ako dosegne aktivnost od 5 log. Ekvivalentna vrijednost 5 log bi bio sporocidni učinak od 99.999%. Ispitivano sredstvo je polučilo određen učinak, koji nije zadovoljavajuć za terensku upotrebu.

Rezultati ovog istraživanja su slični kao i kod onih prethodno izvedenih, gdje ni jedno ispitano sredstvo nije zadovoljilo AFNOR NFT72 -110 standard, odnosno nije imalo propisani baktericidni i sporocidni učinak. Istraživanje je provedeno u laboratorijskim, *in vitro* uvjetima, koji se razlikuju od terenskih uvjeta. Također nije uspoređivana djelotvornost sredstva na različitim materijalima, kao ni učinak sredstva na različite sojeve, pri različitim temperaturama. Ali budući da proizvođač ovo sredstvo ne deklarira kao dezinfekcijsko sredstvo, već kao dodatak prehrani koji bi trebao pomoći u suzbijanju američke gnjiloće, možemo zaključiti da je ovo sredstvo, u in vitro uvjetima, ostvarilo određeni, zadovoljavajući baktericidni učinak, dok je sporocidni učinak bio nezadovoljavajuć za terensku uporabu.

6. ZAKLJUČCI

1. ATP testom bioluminiscencije, kao i testom agar gel difuzije utvrđen je baktericidni učinak dezinficijensa Bee Protect F na bakteriju *P. larvae*.

2. Suspenzijskim testom utvrđen je sporocidni učinak dezinficijensa Bee Protect F na bakteriju *P. larvae.*

3. Dobiveni rezultati nisu zadovoljili propisane standarde AFNOR norme, stoga se dezinficijens Bee Protect F može koristiti i preporučiti samo kao pomoćno sredstvo u završnoj dezinfekciji nakon sanacije američke gnjiloće.

4. Ispitani učinak dezinficijensa Bee Protect F na bakteriju *P. larvae* nije pokazao zadovoljavajući sporocidni učinak, a prilikom odabira dezinficijensa najveću ulogu treba pridati upravo njegovoj sporocidnosti.

7. POPIS LITERATURE

AGUDELO, F., I. ALVARADO, J. W. MARGOTTA, M. M. AOKI, F. FLORES, G. MICHAEL, M. M. ELEKONICH, E. ABEL-SANTOS (2017): Inhibitory effect of indole analogs against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease. J Insect Sci. 17, 104-128.

AHMADPUR, F., N. OMBDAKHSH, N. KENNY (2014): How reliable are ATP bioluminescence meters in assessing decontamination of environmental surfaces in healthcare settings? PLoS One 18, 6.

AKOL, A. M., M. BRUNAIN, M. CHEMUROT, T. DESCAMPS, D. C GRAAF (2016): First detection of *Paenibacillus larvae* the causative agent of American Foulbrood in a Ugandan honeybee colony. SpringerPlus 15, 1090.

AL, K. F., B. A. DAISLEY, A. P. PITEL, J. A. CHMIEL, A. M. CHERNYSHOVA, K. M. FARAGALLA, J. P. BURTON, G. J. THOMSPON, G. REID (2020): Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. ISME J. 476-491.

ALIPPI, A. M. (1995): Detection of Bacillus larvae spores in Argentinian honeys by using a semniselectiv medium. Microbiologia SEM 8, 115-118.

ALIPPI, A. M., F. J. REYNALDI, A. C. LOPEZ, M. R. DE GUSTI, O. M. AGUILAR (2004): Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinian honeys from Buenos Aires province. J. Apic. Res. 43. 135–143.

ALVARADO, I., A. PHUI, M. M. E. ABEL - SANTOS (2013): Requirements for *In Vitro* Germination of *Paenibacillus larvae* Spores. J Bacteriol. 195, 1005–1011.

AMDAM, G. G., C. M. BURDEN, M. O MORGAN, K. R. HALDUN, J. J. TRUMBLE, B.H. SMITH (2019): Acute sublethal exposure to toxic heavy metals alters honey bee (*Apis mellifera*) feeding behavior. Sci Rep. 12, 4253.

AMDAM, G. V., S. W. OMHOLT (2002): The regulatory anatomy of honey bee lifespan. J. Theor. Biol. 216. 209–228.

ANON (2004): Pravilnik o mjerama suzbijanja i iskorjenjivanja pčelinjih bolesti. Narodne novine br: 114/2004.

ANON (2009): Pravilnik o uvjetima zdravlja životinja i uvjetima za izdavanje certifikata za uvoz pčela (*Apis melifera* i *Bombus spp.*) iz određenih trećih zemalja. Narodne novine br. 101/2009.

ANON (2014): Pravilnik o načinu praćenja, prijavi i izvješćivanju o pojavi bolesti životinja, Narodne novine br: 135/14.

ANON (2021): Naredba o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2021. godini, Narodne novine br. 2/2021.

ANON (2021): Zakon o veterinarstvu. Narodne novine br. 88/13, 148/13, 115/18, 52/21.

AUSINA, V., A. HERNANDEZ, E. MARTO, L. MATAS, M. MARTIN (2000): Assessment of *in-vitro* efficacy of 1% Virkon® against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. J. Hosp. Infect. 46, 203-209.

BAGINSKA, N., B.W. DABROWSKA, A. GORSKI, E. JOANZYK - MATYSIAK, K.S.E. POPIELA, A. ROMAN, K.H. STEFANIAK, SWITALA-JELEN, N. LODEJ, D. KULA, J. NEUBERG, P. MIGDA, F. ORWAT, B. OWCZAREK (2020): Phages in therapy and prophylaxis of American Foulbrood – Recent Implications From Practical Applications. Front. Microbiol. 11, 1913.

BASULANDO, M., M. DEL HOYO, J. TORRES, E. BEDASCARRASBURE (1998): Use of DHT-Equpment for Disinfection of AFB-Contaminated Beehive Materials in Argentina. Am. Bee. J. 138, 738–740.

BEDNAR, M., J. DOLINEK, M. HAKLOVA, T. JAŠA, F. KAMLER, D. TITERA, V. VESELY (2008.): Hygiene in the apiary. BeeShop. Chech Republic. 1-25.

BEIMS, H., B. BUNK, S. ERLER, K.I. MOHR, C. SPRÖER, S. PRADELLA, G. GÜNTHER, M. ROHDE, M. STEINERT (2020): Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. Int. Med. Microbiol. 310, 2.

BELLAMY, E. (2012): An audit of cleaning effectiveness using adenosine triphosphate (ATP) bioluminescence assay following outbreaks of infection. J. Infect. Prev. 13, 154–157.

BELČIĆ, J., J. KATALINIĆ, D. LOC, S. LONČAREVIĆ, L. PERADIN, F. ŠIMIĆ, I. TOMAŠEC (1982): Pčelarstvo. Nakladni zavod, Znanje, Zagreb.

BERNARD, V. M S., M. J. HERNANDES NAVARRETE, J. J. CELORRIO-PASCUAL, C. L. MOROS (2014): Principles of antisepsis, disinfection and sterilization. Enferm. Infec. Microbiol. Clin. 32,681-688.

BLOCK, S. (1991): Disinfection, Sterilization, and Preservation. 4th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 27-59.

BOMMARCO, R., T. BREEZE, L. G. CARVALHEIRO, J. P. GONZALES-VARO, S. POTTS (2015): Key findings of the STEP project. Pensoft Publishers, Sofija, 72.

BRYAN, L., J. V. MCARTHUR, C. A. DICKS, R. C. TUCKFIELD (2017): The effects of low-level ionizing radiation and copper exposure on the incidence of antibiotic resistance in lentic biofilm bacteria. Environ Pollut. 228, 390-397.

BUTTKE, M., L. O'NEALL (1985): Effects of Alcoholos on Micro-Organisms. Advances in Microbial Physiology, 25, 253-300.

CASTILLO, A.G., F. GONZALES-RIVAS, J. J. RODRIGUEZ- JEREZ (2017): Bactericidal Efficacy of Hydrogen Peroxide-Based Disinfectants Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria on Stainless Steel Surfaces. J Food Sci. 82, 2351-2356.

CONTE, Y., A. NOEL, R. MONDET (2020): *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? Emer Top Life Sci. 4, 45-57.

CORTESE, M. C., V.R. OLATE-OLAVE, M. VERDE, L. VALLEJOS, L. P. RAYMONDA, M. DOORN (2021): Bee Health and Productivity in *Apis mellifera,* a Consequence of Multiple Factors. Vet Sci.8, 76-89.

DINGMAN, D.W., D.P. STAHLY (1983): Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. App. Environ. Microbiol. 46, 860-869.

DOBBELEARE, W. (2001): Disinfection of wooden structures contaminated with *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores. J. Appl. Microbiol. 9, 212-216.

EBELING, J., H. KNISPEL, G. HERTLEIN, A. FUNTHAUS, E. GENERSCH (2016): Biology of *Paenibacillus larvae,* a deadly pathogen of honey bee larvae. Appl Microbiol Biotehnol. 100, 17.

EVANS, J. D., K. ARONSTEIN, Y., P. CHEN, C. HETRU, J., L. IMLER, H. JIANG, M. KANOST, G. J. THOMPSON, Z. ZOU, D. HULTMARK (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera.* Insect Mol. Biol. 15, 645-656.

FISHER, N. A., O. S. MAHDI (2018): Sporulation and Germination of *Paenibacillus larvae* Cells. Curr Protoc Microbiol. 48, 9.

FORSGREN, E., J. STEVANOVIC, I. FRIES (2008): Variability in germination and in temperature and storage resistance among *Paenibacillus larvae* genotypes. Vet.Microbiol.129, 342-349.

GALLAIA, B., J. M SALLESC, J. SETTELED, B. E. VAISSIEREA (2009): Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. Ecol. Econ. 3, 810–821.

GAGGÌA, F., L. BAFFONI, D. ALBERONI (2018): Probiotics for Honeybees' Health. U: Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety (Di Gioia, D., B. Biavati, ur.). Springer International Publishing, Switzerland, 219-245.

GENERSCH, E. (2007): *Paenibacillus larvae* and American foulbrood in honeybees. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 120, 26-33.

GENERSCH E. (2010): American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. J. Invertebr. Pathol. 103, 10-19.

GENERSCH, E., L. POPPINGA (2015): Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae. Curr Opin Insect Sci.10, 29-36.

GOSSELIN, P., R. CHARBONNEAU (1990): Disinfection of the bee hive's American foulbrood by gamma radiation from Cobalt-60. Int. J. Radiat. Appl. Instrum. C. Radiat. Phys. Chem. 35, 292-295.

GRADY, E. N., J. MACDONALD, L. LIU, A. RICHMAN, Z.C. YUAN (2016): Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. Microb Cell Fact. 15, 203.

HANSEN, H., C. J. BRØDSGAARD (1999): American foulbrood: A review of its biology, diagnosis and control. Bee World 80, 5–23.

HASEMAN, L. (1961): How Long Can Spores of American Foulbrood Live? Am. Bee. J. 298–299.

JELINSKI, M. (1985): Some biochemical properties of *Bacillus larvae.* Apidologie 16, 69-76.

KATO, K., I. OHASHI, M. OKAMOTO, S. KOBAYASHI, D. TAKAMATSU (2020): Microbicidal effects of slightly acidic hypochlorous acid water and weakly acidified chorus acid water on foulbrood pathogens. J Vet Med Sci. 82, 261-271.

KOCHANSKI A., J. PETTIS (2005): Screening additional antibiotics for efficacy against American foulbrood. J. Apic. Res. 44, 24–28.

KRAMER, A., I. SCHWEBKE, G. KAMPF (2006): How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infect. Dis. 16, 130-138.

KUO, J., N. MUNAKATA (2016): Disinfection Processes Water Environ. Res. 88, 1192-1229.

LARSON, E. L., H. E. MORTON (1991): Alcohols, Disinfection, Sterilization, and Preservation. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, p.p. 191-203.

LAŽEC, K. (2020): Dezinfekcija pčelarske opreme. Hrvatska pčela 139, 331-334.

MAIXNER, M .D., D. VAENGELSDORP (2010): A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. J. Invertebr. Pathol. 103, 80-95.

MEEK, R.W., H. VYAS, L. J. V. PIDDOCK (2015): Nonmedical Uses of Antibiotics: Time to Restrict Their Use? PLos Biol. 13, 10.

MORSE, R. A., W.N. CALDERONE (2000.): The value of honey bee pollination in the United States. Bee Cult. 128, 1–15.

NORDSTROM, S., I. FRIES (1995): A comparison of media and cultural conditions for identification of *Bacillus larvae* in honey. J. Apic. Res. 34, 97– 103.

OKAYAMA, A. (1997): Sporicidal Activities of Disinfectants on *Paenibacillus larvae.* J. Vet. Med. Sci. 59, 953–954.

PATOWARY, R., H. DEKA (2020): Beneficial Microbes in Agro-Ecology Academic press, New York, p.p. 107-132.

SAACS, R., J. TUELL (2007): Conserving Native Bees on Farmland. Michigan State University Extension, USA, Bulletin E-2985, p.p.1-4.

SNODGRASS, R. E., E. H. ERICKSON (1992): The anatomy of the honey bee. U: The Hive and the Honey Bee (Graham, J. M., ur.). Dadant and Sons, Hamilton, Ilinois, 103- 169.

SPIVAK, M. G., S. REUTER (2001): Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. Apidologie 32, 555-565.

TOMAŠEC, I. (1949): Biologija pčela. Nakladni zavod Hrvatske. Zagreb.

TLAK GAJGER, I. (2017): Prepoznavanje bolesti medonosne pčele. Hrvatski pčelarski savez, Zagreb.

WILLIAMS, J.R. (1998.): The inhibitory effect of azadirachtin on *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood in the honeybee, *Apis mellifera* L. J. Invertebr. Pathol. 72, 252–257.

WINSTON, M. L. (1987): The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, Cambridge.

8. SAŽETAK

Američka gnjiloća, kao najrazornija, te najproširenija bakterijska bolest pčela, je ujedno i jedan od glavnih uzroka propadanja pčelinjih zajednica. Uzrokuje velike ekonomske gubitke u pčelarstvu. Uzročnik *Peanibacillus larvae*, je sporogena, gram-pozitivna bakterija, iznimno otporna na vanjske uvjete, osobito visoke temperature. Spore su ujedno i infektivni oblik bakterije. Uporaba antiobiotika u suzbijanju bolesti je zabranjena, zbog rezidua koje ostavljaju u pčelinjim proizvodima, zbog mogućnosti pojava recidiva bolesti, te neučinkovitosti antibiotika na spore. Suzbijanje američke gnjiloće je propisano naredbom za tekuću godinu, a najčešće naređivana i najuspješnija mjera suzbijanja bolesti je spaljivanje košnica s leglom, uz prethodno gušenje odraslih pčela.

Cilj ovog rada je bio dobiti uvid u učinak dezinficijensa u realnom vremenu i koncentracijama za vegetativni oblik *P. larvae*, te da će dobiveni rezultati imati značenje u praktičnom pčelarstvu, pri provedbi preventivne i završne dezinfekcije. Nakon provedenog istraživanja, zaključeno je da ispitivani dodatak hrani Bee Protect F pokazao određeni dezinfekcijski učinak, ali nedostatan za provođenje završne dezinfekcije nakon sanacije američke gnjiloće. Budući da proizvođač ovo sredstvo deklarira kao dodatak hrani za pčele s mineralima, može se preporučiti samo kao pomoćno sredstvo u preventivnoj dezinfekciji te time smanjiti vjerojatnost pojave klinički vidljive bolesti.

Ključne riječi: američka gnjiloća medonosne pčele, *Peanibacillus larvae*, spore, dezinfekcija, Bee Protect F

9. SUMMARY

Effectivness of *in vitro* application of "Bee Protect F" disinfectant to *Peanibacillus larvae*

American foulbrood, as the most destructive and widespread bacterial disease of honeybees, is also one of the main causes of bee extinction, but it also causes great losses in beekeeping. The causative agent *Peanibacillus larvae* is a sporogenic, gram-positive bacterium, extremely resistant to external conditions, especially high temperatures. Spores are also an infectious source of infection, and a dose of 10 spores is sufficient for larval infection. The use of antibiotics in the control of the disease is prohibited, due to the residues they leave in bee products, due to the possibility of recurrence of the disease itself, and the ineffectiveness of antibiotics on spores, which are an infectious form and source of infection.

Control of the disease is prescribed by an order for the current year, and the most commonly ordered and most successful measure of eradication of the disease is the burning of hives with a brood, and the suffocation of adult bees.

The aim of this study was to gain insight into the effect of a certain disinfectant in real time and concentrations for the vegetative form of *P. larvae*, and that the obtained results will be important in practical beekeeping, in the implementation of preventive and final disinfection, and will reduce disease recurrence. After the research, it was concluded that the tested agent "Bee Protect F" has a certain disinfectant effect, but insufficient for final disinfection after sanitation od disease. Since the manufacturer declares this product as mineral food with added bees, the assumption is that the use of this product can onla help in preventive disinfection.

Keywords: American foulbrood, *Peanibacillus larvae*, spores, disinfection, Bee protect F

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 24.02.1996. u Zagrebu, gdje sam pohađala prva dva razreda osnovne škole Petar Preradović. Svoje školovanje sam nastavila u osnovnoj školi Eugen Kumičić u Velikoj Gorici, gdje sam i upisala opću gimnaziju, GVG. Integrirani preddiplomski i diplomski studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2014. godine. Tokom studija sam bila učlanjena u udrugu "IVSA", te sam kao aktivni član sudjelovala u izvannastavnim aktivnostima, kao i na razmjenama studenata.