

Utvrđivanje učinkovitosti primjene šećera u prahu i ispiranja odraslih pčela u vodenoj otopini detergenta kao dijagnostičkog postupka pri kvantifikaciji grinja *Varroa destructor*

Zdelar, Dinka

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:178:541194>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

DINKA ZDELAR

**UTVRĐIVANJE UČINKOVITOSTI PRIMJENE ŠEĆERA U PRAHU I ISPIRANJA
ODRASLIH PČELA U VODENOJ OTOPINI DETERGENTA KAO
DIJAGNOSTIČKOG POSTUPKA PRI KVANTIFIKACIJI GRINJA *Varroa destructor***

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet
Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela

O. d. PREDSTOJNIKA ZAVODA:

Izv. prof. dr. sc. Emil Gjurčević

MENTORICA:

Prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Doc. dr. sc. Krešimir Matanović
2. Doc. dr. sc. Jelena Šuran
3. Prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

Diplomski rad izrađen je na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger na pomoći pri izradi rada, strpljenju i volji za suradnjom. Također želim zahvaliti svim djelatnicima Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela na tehničkoj pomoći.

Posebnu zahvalnost dugujem preminulom izv. prof. dr. sc. Hrvoju Luciću i svojim dragim kolegama iz orkestra s kojima je boravak na fakultetu bio ispunjen glazbom i veseljem te uspomenama koje se ne zaboravljaju. Zahvalnost dugujem i svim ostalim djelatnicima fakulteta, kolegama te stečenim prijateljima.

Zahvalila bi i svojim najboljim prijateljicama koje su mi pružile potporu tijekom cijelog studija i u najtežim trenucima.

Također želim zahvaliti svojim roditeljima koji su „studirali“ zajedno sa mnom, proživljavali emotivno svaki ispit, svaku godinu, svaki pad i uspon.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURNIH PODATAKA.....	3
2.1. Varooza.....	3
2.2. Dijagnostički postupci pri utvrđivanju varooze	7
2.3. Liječenje / kontroliranje varooze	10
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Smještaj pčelinjaka, tip košnica i okolišni uvjeti.....	13
3.2. Određivanje jačine pčelinje zajednice po Liebefeldu.....	13
3.3. Primjena šećera u prahu u terenskim uvjetima.....	14
3.4. Višestruko ispiranje uzoraka pčela u vodenoj otopini detergenta	15
3.5. Prirodni dnevni pad grinja	16
3.6. Tretiranje pčelinjih zajednica oksalnom kiselinom.....	16
3.7. Procjenjivanje broja grinja <i>V. destructor</i> u pčelinjim zajednicama	16
3.8. Statistička obrada podataka	16
4. REZULTATI	17
5. RASPRAVA.....	22
6. ZAKLJUČCI	24
7. POPIS LITERATURE	25
8. SAŽETAK	32
9. SUMMARY.....	33
10. ŽIVOTOPIS.....	34

POPIS SLIKA, GRAFIKONA I TABLICA

Slika 1. Prikaz vrsne specifičnosti roda *Varroa*.

Slika 2. Rasprostranjenost grinje *V. destructor* u svijetu.

Slika 3. Prikaz životnog ciklusa grinje *V. destructor*.

Slika 4. Prikaz razlika u razvojnim stadijima i spolu *V. destructor* nakon otprilike 11 dana od poklapanja radilačkog legla.

Slika 5. Određivanje jačine pčelinje zajednice prema Liebefeldu.

Slika 6. Uzorkovanje i vaganje uzoraka odraslih pčela.

Slika 7. Prikaz uzorkovanih pčela u posudi s dvostrukim poklopcem i njihovo protresanje primjenom metode šećera u prahu.

Slika 8. Primjena dijagnostičke metode šećera u prahu i nalaz grinja *V. destructor* na svijetlo obojenoj plastičnoj podlošci.

Grafikon 1. Usporedni prikaz jačine pčelinjih zajednica između TP1 i TP2.

Grafikon 2. Usporedni prikaz učinkovitosti dijagnostičke metode primjenom šećera u prahu na TP1 i TP2.

Grafikon 3. Usporedni prikaz učinkovitosti dijagnostičke metode primjenom vodene otopine detergenta na TP1 i TP2.

Grafikon 4. Usporedni prikaz prirodnog pada grinja *V. destructor* između TP1 i TP2 prije uzorkovanja.

Grafikon 5. Usporedni prikaz ukupnog broja prirodnog pada grinja *V. destructor* prije uzorkovanja i nakon tretiranja pčelinjih zajednica oksalnom kiselinom između TP1 i TP2.

Tablica 1. Srednja vrijednost broja grinja *V. destructor* utvrđenih na TP1 i TP2 primjenom dijagnostiče metode šećera u prahu.

Tablica 2. Srednja vrijednost broja grinja *V. destructor* utvrđenih na TP1 i TP2 primjenom vodene otopine detergenta.

Tablica 3. Srednja vrijednost broja grinja *V. destructor* utvrđenih prirodnim padom na TP1 i TP2.

Tablica 4. Srednja vrijednost broja grinja *V. destructor* utvrđenih nakon tretiranja pčelinjih zajednica oksalnom kiselinom na TP1 i TP2.

1. UVOD

Varooza je nametnička bolest odraslih pčela i pčelinjeg legla uzrokovana hemofagnom grinjom *Varroa destructor*. Grinja je prije pola stoljeća čovjekovom nepažnjom prenesena s izvornog nosioca azijske pčele (*Apis cerana*) na europsku medonosnu pčelu (*Apis mellifera*). Značajan je problem u suvremenom pčelarstvu (MARTIN, 2001.). U Hrvatskoj je po prvi puta utvrđena na otoku Visu 1978. godine (SULIMANOVIĆ, 1978.), kad je kliničkom pretragom invazija utvrđena u 90% pretraženih pčelinjih zajednica (PETRINEC i sur., 1979.). Ženke nametnika žive i hrane se na odraslim pčelama, a jajašca polažu uz pčelinje leglo. Svi razvojni oblici grinje, osim jajašca, sišu hemolimfu i masno-bjelančevinasto tijelo koje koriste kao hranu pa se promjene karakteristične za bolest očituju na pčelinjem leglu, ali i na odraslim pčelama. Sišući hranu iz tijela odraslih pčela, ličnaka i kukuljica grinja dovodi do njihove smanjene otpornosti i vitalnosti (SHIMANUKI i KNOX, 1991.), a ponekad i uginuća pojedinih jedinki. Pčelinja zajednica koja se ne liječi, sigurno ugiba iste ili za nekoliko godina (ELZEN i sur., 2000.) što ovisi o jačini invazije te prisutnosti drugih patogenih uzročnika bolesti. *V. destructor* ima značajnu ulogu u pojavnosti i širenju drugih bolesti pčela zbog imunodepresivnog učinka na staničnoj i „humoralnoj“ razini imunskog sustava invadirane pčele. Primjerice virusima služi kao mehanički i/ili biološki prijenosnik i rezervoar infekcije.

U Republici Hrvatskoj (RH) je na snazi „Nacionalni pčelarski program“ za razdoblje od 2017. do 2019. godine te Program kontrole i suzbijanja varooze koji je naveden u važećoj Naredbi o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju. Prema Programu obavezno je tretiranje svih pčelinjaka u RH tijekom prvog ljetnog tretiranja primjenom odobrenog veterinarsko medicinskog proizvoda (VMP-a) u razdoblju od 1. srpnja do 31. kolovoza. Pravodobnost tretiranja procjenjuje se uzimajući u obzir zemljopisne, klimatske i pašne čimbenike, kao i stupanj invadiranosti pčelinjih zajednica. Na listi odobrenih VMP-a za 2019. godinu nalaze se: CheckMite+, Bayvarol, PolyVar, Oxuvar, API-Bioxal, Apiguard, ApilifeVar, Apitraz, Apivar, Thymovar i Varomed.

Zbog velikog značaja varooze kao nametničke bolesti nužno je zbog točnije procjene pri izboru VMP-a i potrebne doze akaricida odrediti jačinu invazije pčelinje zajednice. Za pčelare ona može biti korisna u određivanju pravodobnosti tretiranja pčelinjaka, ali i u svrhu izbora akaricida pri kontroliranju bolesti.

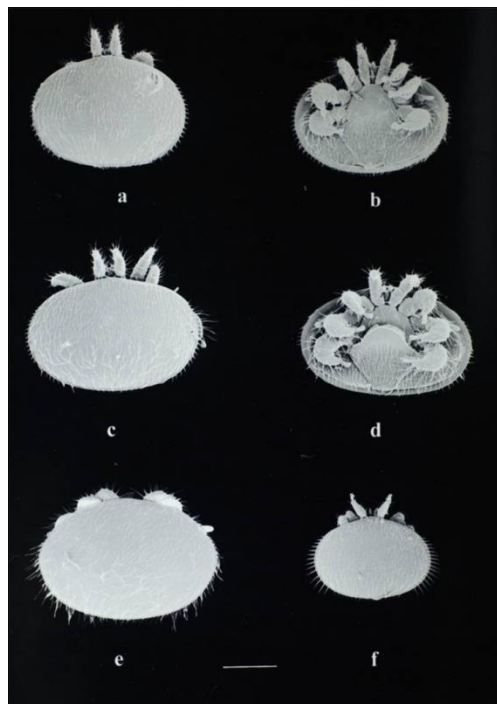
U dijagnostici se primjenjuje više metoda. Najjednostavnijom i učinkovitom pokazala se metoda primjene šećera u prahu u pčelinjaku (FAKIMZADEH 2000; LEE i sur., 2010.). Često se kombinira s laboratorijskom dijagnostičkom metodom višestrukog ispiranja odraslih pčela u otopini detergenta gdje dolazi do učinkovitog otpuštanja grinja u foretskoj životnoj fazi, a nakon najviše 30 minuta (RINDERER i sur., 2004.).

Cilj ovog rada je utvrđivanje učinkovitosti primjene šećera u prahu i višestrukog ispiranja odraslih pčela u vodenoj otopini detergenta kao kombiniranih dijagnostičkih postupaka pri utvrđivanju prisustva i kvantifikaciji grinja *V. destructor*.

2. PREGLED LITERATURNIH PODATAKA

2.1. Varooza

Varooza je nametnička bolest zajednica medonosne pčele uzrokovana grinjom *V. destructor*. Grinja parazitira na odraslim pčelama i pčelinjem leglu, a širi se izravnim kontaktom s pčele na pčelu te neposrednim kontaktom preko invadiranih pčela, pčelinjeg legla, pčelinjih proizvoda te pčelarske opreme. Rod *Varroa* sadrži četiri vrste za sad poznatih obveznih nametničkih grinja: *Varroa jacobsoni* (OUDEMANS, 1904.), *Varroa underwoodi* (DELFINADO-BAKER i AGGARWAL, 1987.), *Varroa rindereri* (DE GUZMAN i DELFINADO-BAKER, 1996.), *Varroa destructor* (ANDERSON i TRUEMAN, 2000.).

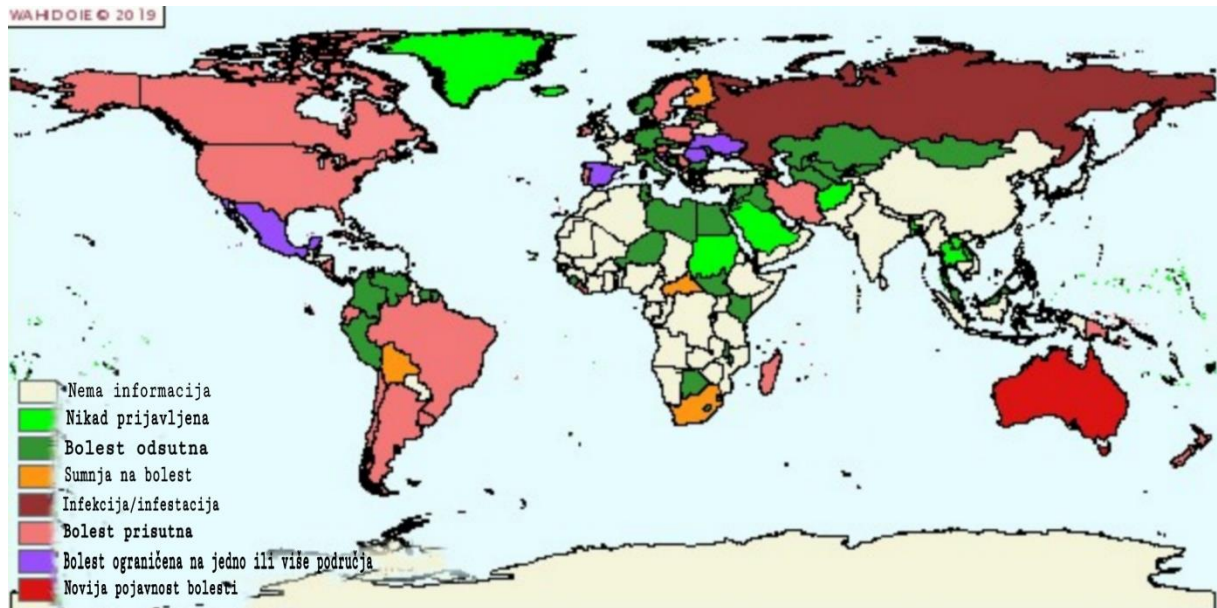


Slika 1. Prikaz vrsne specifičnosti roda *Varroa* (ANDERSON i TRUEMAN, 2000.).

a) *V. jacobsoni*; b) *V. jacobsoni*; c) *V. destructor*; d) *V. destructor*; e) *V. rindereri*; f) *V. underwoodi*.

Dugo se smatralo kako je uzročnik varooze kod europske medonosne pčele (*A. mellifera*) *V. jacobsoni*. Međutim, 2000. godine je dokazano da se zapravo radi o *V. destructor* kojoj je prirodni nosioc azijska pčela *A. cerana* (ANDERSON i TRUEMAN, 2000.). Pretpostavlja se da se grinja proširila transportom zajednica azijske pčele u istočni dio Rusije ili Dalekog istoka u prvoj polovici 20. stoljeća te se nastavila širiti na ostale zemlje

(OLDROYD, 1999.). Danas je *V. destructor* kozmopolitska vrsta pa je tako 2018. godine unos prijavljen i u Australiji koja je do tada bila slobodna od varooze (ANON, 2018.).

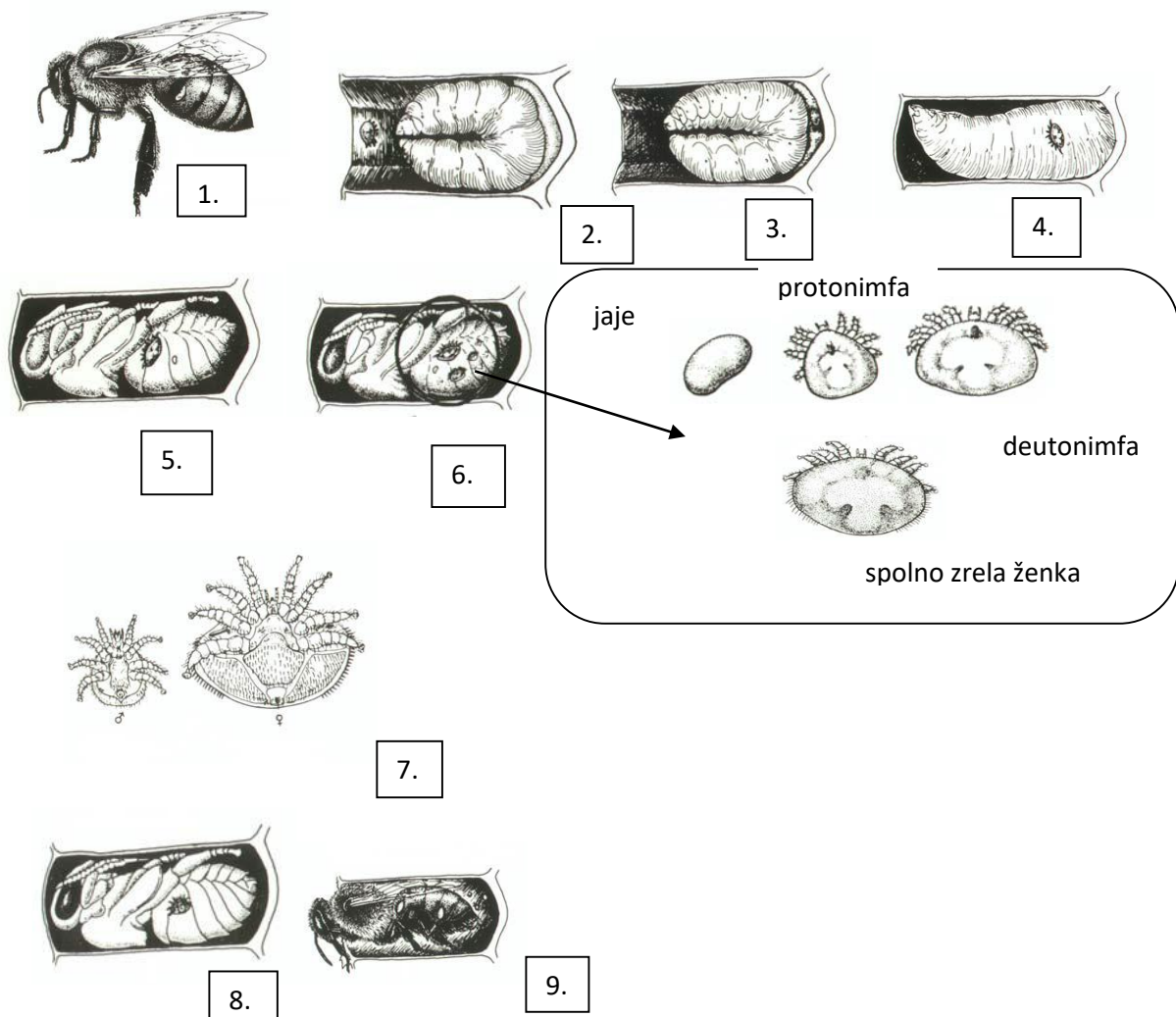


Slika 2. Rasprostranjenost grinje *V. destructor* u svijetu (WAHIS, 2018).

Kod grinja *V. destructor* vidljiv je spolni dimorfizmom pa tako ženka ima spljoštenu, elipsoidnu idiosomu. Također ima snažne, kratke noge specijalizirane za prianjanje na tijelo nosioca pomoću apotela dok su joj dorzalni i ventralni štitovi izrazito sklerotizirani. Mužjak za razliku od ženke ima kruškoliko tijelo sa slabijom sklerozacijom, znatno su manji te imaju duže noge u odnosu na veličinu tijela. Zajedničko obilježje ženke i mužjaka grinje je jasna podjela tijela na idiosomu koja predstavlja veći dio tijela s dorzalnim štitom i ventralnim dijelom kojeg sačinjava više različitih štitova te gnatosomu smještenu anteroventralno čineći usni aparat koji se sastoji od dvije senzorne pedipalpe i dvije helicere. Cijelo tijelo je prekriveno hitinskim dlačicama koje imaju mehaničku i kemoreptornu funkciju (CHAPMAN, 2013.).

Životni ciklus *V. destructor* podijeljen je u dvije faze: foretsku fazu koja se odvija parazitiranjem na odraslim pčelama i reproduktivna koja se odvija u poklopljenom trutovskom i radilačkom pčelinjem leglu. Mužjaci i spolno nezreli razvojni stadiji grinje žive kratko i mogu se naći samo unutar poklopljenog legla dok se odrasle ženke grinje mehanički prenose između odraslih pčela na pčelinje leglo radi razmnožavanja ili se pak prenose rojenjem ili zalijetanjem tijekom povratka s paše. Na nosiocu se prihvaćaju između trbušnih ljuščica zatka gdje otvaraju tzv. hranidbena mjesta (FERNÁNDEZ i sur., 1993.). Hrane se hemolimfom kako na odraslim pčelama tako i na samom leglu (ROSENKRANZ i sur., 2010.). Novija istraživanja pokazala su

da se ove nametničke grinje hrane i masno-bjelančevinastim tijelom odraslih pčela (RAMSEY i sur., 2018.).

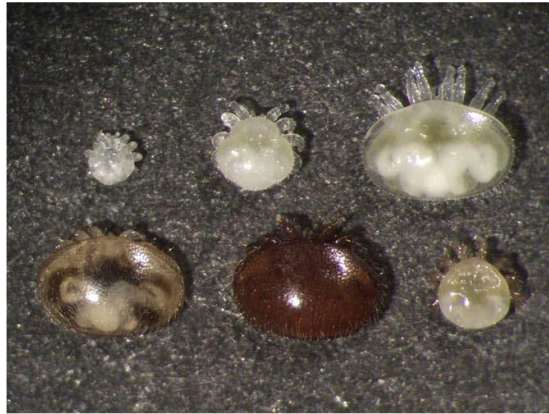


Slika 3. Prikaz životnog ciklusa grinje *V. destructor* (SHIMANUKI i sur., 2000.).

1) Grinja *V. destructor* na odrasloj pčeli; 2) *V. destructor* ulazi u stanicu saća i smješta se ispod pčelinje ličinke dobi oko pet dana; 3) Grinja se hrani na pčelinjoj ličinki; 4) *V. destructor* se hrani na ispruženoj ličinki; 5) Ženka grinje polaže prvo jajašce 60 sati nakon poklapanja stanice saća te nakon toga u razmacima svakih 30 sati; 6) Istodobna prisutnost različitih razvojnih stadija *V. destructor*; 7a) Spolno zreli mužjak star pet do šest dana; 7b) Spolno zrela ženka stara sedam do osam dana; 8) Razmnožavanje spolno zrelih jedinki grinje; 9) Spolno zrele ženke grinje napuštaju saće zajedno s mladom pčelom.

Ženka *V. destructor* ulazi u stanice saća s pčelinjim ličinkama u petom stadiju razvoja te se nastanjuje na dno stanice saća izbjegavajući pčele čistačice. Nakon otprilike 70 sati od zatvaranja poklopca nad stanicom saća grinja polaže prvo neoplođeno jajašce (STEINER i sur., 1994.) koje se razvije u haploidnog mužjaka, a iz kasnije položenih oplođenih jajašaca razvijaju se ženke grinje (MARTIN, 1994.). Obično ženka grinje polaže do pet jajašaca u radilačku i do

šest jajašaca u stanicu saća s trutovskom leglom (GARRIDO i ROSENKRANZ, 2003.). Od jajašca potom prolaze razvojne stadije protonimfe i deutonimfe pa cjelokupan razvoj mužjaka traje između 6,5 do 6,9 dana, a ženki 5,5 do 6,2 dana (MARTIN 1994; DE JONG, 1997.).



Slika 4. Prikaz razlika u razvojnim stadijima i spolu *V. destructor* nakon otprilike 11 dana od poklapanja radilačkog legla (ROSENKRANZ i sur., 2010.).

Gornji red s lijeva na desno: stadij protonife, deutonimfe, deutokristala. Donji red s lijeva na desno: netom presvučena ženka, odrasla ženka, mužjak.

Razvojni stadiji nimfe *V. destructor* hrane se hemolimfom pčele kad je ona u razvojnom stadiju kukuljice (KANBAR i ENGELS, 2003.) preko sitnog otvora kojeg probuši odrasla ženka grinje što je važno kao dio tzv. “parentalne skrbi” jer nimfe ženke imaju mekane helicere, a mužjacima su modificirane za prijenos sperme (DONZÉ i GUERIN, 1994.). Grinje postaju spolno zrele odmah nakon zadnjeg presvlačenja s time da mužjaci sazrijevaju 20 sati prije ženki (DONZÉ i sur., 1996.). Stopa razmnožavanja (broj grinja sposobnih za život po majci) iznosi 1,3 do 1,45 grinja za radilačko, odnosno 2,2 do 2,6 za trutovsko leglo, a zbog dužeg razdoblja potrebnog za poklapanje trutovskog legla (MARTIN, 1994.).

U samo nekoliko godina nakon prve invazije pčelinje zajednice može doći do izrazitog povećanja broja grinja (BÜCHLER, 1994; FRIES i sur., 2003.). Njihov broj je varijabilan i ovisi o raznim čimbenicima kao što su primjerice učestalost primjene akaricida, reproduktivna sposobnost grinja, dostupnost trutovskog legla, razina obrambenog ponašanja pčela, klimatski uvjeti i količina nektara (CURRIE i TAHMASBI, 2008.). Tri do četiri godine nakon prve invazije može doći do uginuća pčelinje zajednice ako se ne poduzimaju određene mjere za suzbijanje varooze (BÜCHLER, 1994.). Postoje značajne razlike u broju grinja između tropskih/suptropskih te umjerenih klimatskih područja sa znatno manjom tendencijom porasta populacije grinja u tropskim/suptropskim dijelovima (ROSENKRANZ i sur., 2006.) što je

iznenadujuće s obzirom na dostupnost pčelinjeg legla tijekom cijele godine, a za razliku od umjerenog klimatskog područja, osobito tijekom zimskih mjeseci. Zimi, ali i tijekom jeseni dolazi do slabljenja pčelinjih zajednica te smanjenja populacije odraslih pčela, a samim time i do relativnog povećanja populacije grinja (AMDAM i sur., 2004.). Oštećenje pčela na individualnoj razini očitovat će se gubitkom tjelesne mase što nastaje kao posljedica gubitka hemolimfe, slabijeg leta kod trutova (DUAY i sur., 2002.), prijevremenog odlaska radilica odnosno pčela skupljačica na pašu te kraćim životnim vijekom (AMDAM i sur., 2004.). Također, pčele skupljačice pokazuju smanjenu sposobnost neasocijativnog učenja, produženo vrijeme do povratka u košnicu i zalijetanje u tuđe košnice (KRALJ i sur., 2007.). Važno je istaknuti da je *V. destructor* prijenosnik mnogih virusnih bolesti (BOECKING i GENERSCH, 2008.).

2.2. Dijagnostički postupci pri utvrđivanju varooze

2.2.1. Višestruko ispiranje uzorka odraslih pčela u vodenoj otopini detergenta

Za ovu metodu prema BAKU i suradnicima (2009.) koristi se uzorak od 250 do 300 prethodno pothlađenih živih odraslih pčela smještenih u posudu s poklopcem od 0,9 L koje je potrebno potopiti s 200 do 300 mL 1% vodene otopine detergenta. Posuda se zatim postavlja na magnetsku miješalicu i vrti tijekom pet minuta. Nakon toga uzorak se prelije u dvostruko cjedilo s različitim širinama okanaca. Otvori okanaca gornjeg cjedila su dimenzija 3 mm x 3 mm kako bi zadržali pčele dok su dimenzije okanaca donjeg cjedila 0,5 mm x 0,5 mm koje zadržavaju prisutne grinje. Uzorak se potom ispire toplom vodom na 30 sekundi nakon čega grinje ispadaju i zadržavaju se na donjem cjedilu gdje ih je potrebno prebrojati. Za razliku od navedene metode primjena šećera u prahu je etički bolji izbor jer ne uključuje žrtvovanje pčela, no obje metode su podjednako točne. FAKIMZADEH (2001.) navodi da prilikom korištenja šećera u prahu mortalitet pčela iznosi 8% što je zanemarivo u odnosu na žrtvovanje svih pčela primjenom drugih dijagnostičkih metoda.

2.2.2. Primjena šećera u prahu u terenskim uvjetima

Ova metoda zahtjeva uzorkovanje živih pčela i to s pčelinjaka od najmanje 15 pčelinjih zajednica. Ako je moguće korisno je uzorkovati dva do tri ili više pčelinjaka unutar kruga od 100 km kako bi mogli procijeniti invadiranost na epizootiološkom području. Prije samog uzorkovanja potrebno je odrediti jačinu zajednice prema Liebefeldu (DELAPLANE i sur.,

2013.). Pčele uzorkujemo s perifernog okvira smještenog na poznatoj udaljenosti od pčelinjeg legla (primjerice 1. okvir do pčelinjeg legla) pomoću četke te ih stresemo u posudu od 120 mL. Nakon toga uzorak pčela potrebno je izvagati pri čemu težina pravilnog uzorka ne smije biti manja od 40 g. U posebnu plastičnu posudu s rešetkastim i punim poklopcem dodaje se 35 g šećera u prahu (dvije žlice), a potom se dodaju i odrasle pčele, poklopac se zatvara te se posuda lagano rotira 60 sekundi kako bi šećer pokrio pčele. Tako se ostavlja sljedeće 3 minute u okomitoj poziciji i nakon toga se posudu energično protrese nekoliko minuta što posljedično dovodi do otpuštanja grinja. Na prethodno pripremljenoj bijeloj podlozi sadržaj posude se istrese s time da se otvara gornji puni poklopac dok rešetkasti ostaje i sprječava ispadanje pčela, ali omogućuje prohodnost grinjama i šećeru. Otpale grinje zatim je potrebno prebrojati.

Učinkovitost ove metode prema DIAZU i suradnicima (2017.) se pokazala lošijom od primjene višekratnog ispiranja uzorka odraslih pčela u vodenoj otopini detergenta iako razlika u osjetljivosti nije bila značajna. Ali, jačina invadiranosti grinjama pokazala se značajnom. Kada je invadiranost bila manja od 3% metoda korištenja šećera u prahu je imala manji učinak i osjetljivost od primjene dijagnostičke metode ispiranja u vodenoj otopini detergenta, a kad je invadiranost bila veća od 3,01% osjetljivost je bila jednaka. Za razliku od DIAZA i suradnika (2017.), BAK i suradnici (2009.) su došli do zaključka da su obje metode podjednako točne te da nije potrebno rezultate dobivene primjenom metode šećera u prahu dodatno potvrđivati metodom višestrukog ispiranja pčela u vodenoj otopini detergenta.

2.2.3. Otklapanje poklopaca saća nad trutovskim leglom

Otklapanje poklopaca saća nad trutovskim leglom se provodi pomoću vilice za otklapanje poklopaca saća nad medom, a kad su pčelinje kukuljice u razvojnem stadiju ružičastih očiju. Odabrano područje poklopljenog trutovskog legla probode se vilicom, a kukuljice se potom izvlače u jednom potezu. Zbog bolje procjene invadiranosti grinjama *V. destructor* nužno je otklopiti barem stotinjak stanica saća s leglom. Kod pregleda legla potrebno je izbrojati broj kukuljica invadiranih grinjama i ukupan broj kukuljica. Konačni rezultat se izražava u postotku invadiranih kukuljica. Ako otklopimo i pregledamo primjerice 223 kukuljice od kojih je 72 invadirano tada je stupanj invadiranosti trutovskog legla 32,3%. Pčelinju zajednicu je potrebno tretirati ako je invadiranost veća od 25%, a ako je manja od 5% tretiranje akaricidima se može odgoditi. Podneblja u kojima je leglo prisutno tijekom cijele godine, a invadiranost je 15% tada je također nužno provoditi tretiranje.

Za procjenjivanje brojnosti populacije grinja *V. destructor* BRANCO i suradnici (2006.) su koristili metodu otklapanja poklopaca saća nad trutovskim leglom zajedno s procjenom invadiranosti radiličkog legla. Pokazalo se da je procjenjivanje brojnosti populacije grinja kombinacijom pregleda odraslih pčela i pčelinjeg legla na pčelinjaku i laboratoriju vrlo pouzdano, ali istovremeno i zahtjevno.

2.2.4. Praćenje prirodnog dnevnog pada grinja *V. destructor*

Prirodni pad grinja je jednostavna metoda praćenja porasta populacije grinja *V. destructor* bez potrebe otvaranja košnice. Njen nedostatak je utjecaj drugih čimbenika koji dovode do ugibanja i otpadanja grinja. Ova metoda može se učestalo primjenjivati pomoću tzv. antivaroozne podnice. Podnica ima žičanu mrežu unutar drvenog okvira koji se može izvlačiti poput ladice i smješten je ispod plodišta košnice. Ispod žičane mreže nalazi se pomičan uložak koji olakšava brojanje grinja. Uginuće jedne grinje tijekom dana ukazuje na vjerojatnost prisutnosti 120 do 130 grinja u pčelinjoj zajednici (PUŠKADIJA i sur., 2004.) dok je kritična granica prirodno otpalih grinja u umjerenim klimatskim uvjetima od pet do šest jedinki tijekom 24 sata tijekom srpnja (KULINČEVIĆ, 2006.).

Prema Programu za kontroliranje i suzbijanje varooze u RH za 2019. godinu kontrola pada grinja provodi se prije, tijekom i nakon prvog obveznog ljetnog tretiranja, na pet pčelinjih zajednica u pčelinjacima s do 50 pčelinjih zajednica, te na 10% pčelinjih zajednica ako ih je više od 50 smještenih na istoj lokaciji. Kontrolu treba započeti sedam dana prije tretiranja VMP-om. Pčelar provodi kontrolu postavljajući testne uloške na podnicu košnica. Sedmi dan od postavljanja ulošci se vade, a ukupni broj grinja se bilježi u obrazac. Kod tretiranja nekim od VMP-a u košnice se postavljaju čisti testni ulošci koji se pregledavaju 7. i 14. dana, a broj otpalih grinja bilježi se u obrazac.

2.2.5. CO₂ test

U ovoj metodi ugljikov dioksid djeluje kao anestetik čime pčele budu omamljene, a što omogućuje lakše protresanje posude i ispadanje grinja. GERULA i suradnici (2018.) su proveli istraživanje o učinkovitosti uređaja s ugljikovim dioksidom u svrhu kontroliranja invadiranosti s grinjama *V. destructor*. Istraživanje je provedeno na 12 netretiranih pčelinjih zajednica. Za svaku zajednicu pčele radilice su prikupljene i stavljene u posudu od 100 mL, izvagane i prebačene u uređaj za testiranje. U prosjeku je u posudi bilo 427 pčela radilica.

2.2.6. Ether roll

Prednosti ove metode su mogućnost brze primjene u terenskim uvjetima. Kod primjene ove metode potrebno je prikupiti 200 do 300 pčela u staklenu posudu i omamiti ih pomoću etera. Nakon toga staklenka se rola desetak sekundi. Većina grinja se odvoji od pčela i prilijepi za unutarnje stijenke staklene posude. Zaostale grinje mogu otpasti ako pčele stavimo na bijelu površinu te ih raspršimo. Pčele treba što prije izvaditi iz staklenke jer se u protivnom grinje zalijepi za njih ako ostanu unutra više od nekoliko minuta. U svrhu kvantifikacije grinja uzorak pčela se može isprati u nekoj od tekućina kao što je vruća voda, alkohol ili otopina detergenta (SHIMANUKI i KNOX, 1991.).

2.2.7. Slanje pčela na laboratorijsku dijagnostiku

Uzorkovanje pčela provodi ovlaštenu veterinar koji uzima 250 do 300 živih odraslih pčela po pčelinjoj zajednici iz 10% pčelinjih zajednica na pčelinjaku. Pčele se stavljaju u čistu plastičnu vrećicu volumena 2 L koje se zatim pohranjuju u zamrzivač tijekom 12 sati nakon čega se takav uzorak šalje u ovlaštenu laboratorij na daljnju analizu uz popratni dopis odnosno Obrazac za slanje materijala na laboratorijsku dijagnostiku.

2.3. Liječenje / kontroliranje varooze

Zbog prisutnosti *V. destructor* već više od pola stoljeća na medonosnoj europskoj pčeli i velikih posljedičnih gubitaka razvile su se mnoge metode i načini kontroliranja, suzbijanja i tretiranja ove bolesti. U RH provodi se obavezno tretiranje protiv varooze jednom godišnje u ljetnom razdoblju od 1. srpnja do 31. kolovoza odabirom jednog registriranog i za uporabu u pčelarstvu odobrenog VMP-a. Tretiranje se mora provesti nakon vrcanja meda. Ovisno o zdravstvenom stanju pčelinjih zajednica, preporukama ovlaštenog veterinara i odabranom VMP-u tretiranje se može ponoviti još jedanput ili dvaput kao jesensko tretiranje. Također je preporučeno provesti tretman i zimi u razdoblju od studenog do siječnja.

Danas su na tržištu kod nas dostupni proizvodi koji sadrže djelatne tvari kao što je amitraz (Apitraz 500 mg traka za košnicu za pčele medarice, Apivar 500 mg traka za košnicu za pčele medarice), timol (APIGUARD, THYMOVAR, APILIFE VAR- timol), kamfor, eukaliptusovo ulje, racemični levomentol, flumetrin (BAYVAROL), kumafos (CheckMite +), dihidrat oksalne kiseline (API-Bioxal), oksalna kiselina (Oxovar 5,7%) i flumetrin (BAYVAROL, PolyVar Yellow).

2.3.1. “Hard” sintetski akaricidi

Zadnjih petnaestak godina najviše se koriste sintetski akaricidi bazirani na različitim aktivnim tvarima poput kumafosa, flumetrina, tau-fluvalinata i amitraza (FERNANDEZ i COINEAU, 2006.; CHLEBO, 2016.). Većina navedenih pesticida je jednostavna za upotrebu, ekonomski prihvatljiva i ne zahtijeva posebno znanje o biologiji nametnika. Zbog lipofilnih svojstava njihove rezidue se mogu apsorbirati u pčelinji vosak (BOGDANOV, 2006.) što ne utječe izravno na kvalitetu meda. Međutim postoje i određeni nedostaci pa tako mogu naštetiti pčelama ako su one istovremeno izložene raznovrsnim pesticidima i/ili drugim ksenobioticima koji se pohranjuju u vosak (CHAUZAT i sur., 2009.; JOHNSON i sur., 2009.; TLAK GAJGER i sur., 2019.). Tijekom uzastopnog korištenja zagađuju med i ostale pčelinje proizvode te se dugo mogu zadržati u vosku čak i nakon njegova recikliranja (TLAK GAJGER i sur., 2016.). Zbog nastalih rezidua u vosku korištenjem određenih akaricida dolazi do stvaranja rezistencije grinja u poklopljenom leglu što dovodi do problema u kontroli bolesti i značajnih šteta u pčelarstvu. Rezistencija na već poznate akaricide predstavlja sve veći problem (MAGGI i sur., 2010.). Zbog toga je potrebno koristiti alternativne metode zajedno s kemijskim sredstvima u kontroli varooze (STANIMIROVIĆ i sur., 2017.; TLAK GAJGER i SUŠEC, 2019.).

2.3.2. “Soft” akaricidi

Ovu skupinu čine prirodni spojevi kao što su esencijalna ulja poput timola i organske kiseline među kojima se koriste mravlja, oksalna i mliječna. Mravlja kiselina je primjer učinkovitog akaricida koja uspješno uništava grinje i u poklopljenom pčelinjem leglu (PIETROPAOLI i FORMATO, 2017.). Druga prednost je smanjeni rizik od mogućnosti zaostajanja rezidua i njihove akumulacije u pčelinjim proizvodima. Većina ovih spojeva topiva je u vodi a dio su sastavnih komponenti meda pa je stoga mogućnost onečišćenja meda i voska manje vjerojatna (BOGDANOV, 2006.). Također manja je vjerojatnost stvaranja rezistencije kod višekratnih tretmana. Nedostatak primjerice mliječne i oksalne kiseline je u tome što je njihova primjena i djelovanje ograničeno na razdoblja kada u pčelinjim zajednicama nema legla. Kod njihovog korištenja treba paziti na klimatske uvjete i uvjete u košnici radi optimalnog učinka ponajviše zbog uske granice između učinkovitosti za grinje i toksičnosti za pčele (MARTIN-HERNANDEZ i sur., 2007.).

2.3.3. Biotehničke i biološke mjere u kontroliranju varooze

Za korištenje ovih metoda bitno je poznavanje biologije pčela i grinja *V. destructor* radi pristupa i kontrole varooze. Jedan od načina je izrezivanje trutovskog legla kao biotehnička mjera koja se pokazala učinkovitom. Cilj je izrezati i neškodljivo ukloniti poklopljeno pčelinje leglo čime se postiže i mehaničko uklanjanje grinja. Zbog najveće zastupljenosti grinja na trutovskom leglu ono se najčešće izrezuje, a da pri tome nema neželjenih posljedica na jačinu pčelinjih zajednica ili pak na proizvodnju meda (CALDERONE, 2005.). Uklanjanjem tri do četiri okvira građevnjaka (u prosjeku 3374 stanica saća) po pčelinjoj zajednici na početku sezone u konačnici dovodi do smanjenja populacije grinja za 50 do 70% (CHARRIÈRE i sur., 2003.). Ova metoda zahtijeva puno rada, ali zato daje željene rezultate u pogledu znatnog smanjenja grinja kod jako invadiranih pčelinjih zajednica bez ikakvog kemijskog tretiranja (CALDERONE, 2005.).

Od ostalih metoda u suzbijanju varooze koristi se termoterapija koja se primjenjuje na pčelinjem leglu ili cijeloj pčelinjoj zajednici. Vrlo je učinkovita, primjena kemijskih pripravaka nije potrebna i tehnološki je sve naprednija (BIČÍK i sur., 2016.).

Upotrebu antagonističkih parazitarnih ili patogenih organizama koji bi služili kao „prirodni kontrolori grinja“ bez njihova utjecaja na pčelinje proizvode pokazuju obećavajuću učinkovitost. Takvi bi se antagonisti mogli samostalno širiti i time omogućiti dugoročni pozitivan učinak (VAN DER GEEST i sur., 2000.). SHAW i sur. (2002.) su u laboratorijskim uvjetima postigli jako dobre rezultate s izrazitim letalnim ishodom *V. destructor* koristeći konidije (aseksualne spore) roda *Metarhizium*, *Beauveria* ili *Verticillium*. Provođenjem dodatnih istraživanja neki znanstvenici su došli do sličnih zaključaka (GARCIA-FERNANDEZ i sur., 2008.; MEIKLE i sur., 2008.) dok drugi nisu uočili značajne pomake u korištenju entomopatogenih gljivica u kontroli varooze.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Smještaj pčelinjaka, tip košnica i okolišni uvjeti

Testni pčelinjak 1 (TP1) smješten je na području Markuševca u gradu Zagrebu (GPS koordinate: $x=45393478$, $y=15574229$). Mjesto se nalazi sjeveroistočno od Zagreba gdje prevladava umjerena kontinentalna klima.

Testni pčelinjak 2 (TP2) smješten je na području Sv. Križa Začretja u Krapinsko - zagorskoj županiji (GPS koordinate: $x=4605599$, $y=1553903$) te se nalazi na udaljenosti manjoj od 100 kilometara u odnosu na TP1.

Istraživanjem su obuhvaćena dva pčelinjaka na kojim je smješteno po 15 pčelinjih zajednica naseljenih u Langstroth Root (LR) košnicama. Pčelinje zajednice na TP1 tijekom dvije uzastopne godine nisu bile tretirane akaricidima, dok je TP2 redovito tretiran uporabom registriranih i u pčelarstvu za uporabu odobrenih VMP-a.

3.2. Određivanje jačine pčelinje zajednice po Liebefeldu

Metodom po Liebefeldu određena je jačina pčelinjih zajednica odnosno procijenjen broj odraslih pčela, poklopljenog i nepoklopljenog pčelinjeg legla. Da bi konačni rezultati bili što precizniji procjena jačine zajednica obavljena je tijekom jutra prije nego što su pčele otišle na pašu (IMDORF i GERIG, 2001.). Za procjenu korišten je pomoćni okvir koji je iste veličine kao i okvir u LR košnici te podijeljen pomoću najlonske mreže u kvadrate površine 1 dm^2 . Kod primijenjene metode je vizualno procijenjen broj odraslih pčela i površine legla na svakoj strani pojedinog okvira. Svaka strana LR okvira ima površinu saća od $8,8 \text{ dm}^2$ dok su dimenzije okvira $43 \text{ cm} \times 23 \text{ cm}$. Jedan kvadratni decimetar obuhvaća oko 130 odraslih pčela što znači da jedna strana LR okvira ima oko 1100 pčela. Ako su pčele okrenute glavama prema saću tada taj broj može iznositi i do 400 pčela.

Kod pregleda pčelinje zajednice prvo je pregledan periferni okvir s bilo koje strane pa redom sve do posljednjeg desetog okvira. Pri tome je pomoćni okvir prislanjan uz svaki okvir te je procijenjen broj pčela koje zaposjedaju saće i površina legla u dm^2 nakon čega su procijenjene vrijednosti zapisane. Ukupni broj pčela u pčelinjoj zajednici dobiva se zbrajanjem ukupne površine saća zaposjednutog odraslim pčelama množenjem s faktorom 130, a broj pčela

u leglu dobiva se množenjem ukupne procijenjene površine saća u dm^2 koje zauzima leglo s faktorom 400.



Slika 5. Određivanje jačine pčelinje zajednice prema Liebefeldu. (Jurković; Tlak Gajger, 2015.).

3.3. Primjena šećera u prahu u terenskim uvjetima

U cilju određivanja kvantitativnog broja grinja korištena je dijagnostička metoda primjene šećera u prahu na oba pčelinjaka na kojima je pregledano po 15 pčelinjih zajednica. Za procjenu prirodnog pada grinja *V. destructor* korištena je antivaroozna podnica. Prije primjene šećera u prahu određena je jačina pčelinjih zajednica. Nakon toga pčele su uzorkovane i izvagane (primijenjena vaga preciznosti od 1 g; Gorenje).



Slika 6. Uzorkovanje i vaganje uzoraka odraslih pčela (Tlak Gajger, 2015.).

U specijalnu plastičnu posudu s dvostrukim poklopcem dodano je 35 g šećera u prahu što odgovara količini od otprilike dvije jušne žlice, a nakon čega je u tu posudu presipan uzorak odraslih pčela. Tu specijalnu posudu je potom lagano rotirati tijekom 60 sekundi kako bi šećer

u prahu prekrio pčele, a nakon čega je ostavljena u okomitom položaju u trajanju od tri minute. Zatim je uslijedilo energično protresanje posude tijekom dvadesetak sekundi. Na svijetlo obojenom plastičnom podlošku je nakon skidanja punog poklopca stresen sadržaj posude. Time je kroz rešetkasti poklopac iz nje uklonjen šećer zajedno s otpuštenim grinjama *V. destructor*. Uzorak odraslih pčela je sačuvan za laboratorijsku pretragu primjenom metode višestrukog ispiranja pčela u vodenoj otopini detergenta.



Slika 7. Prikaz uzorkovanih odraslih pčela u posudi s dvostrukim poklopcem i njihovo protresanje primjenom metode šećera u prahu (Tlak Gajger, 2015.).



Slika 8. Primjena dijagnostičke metode šećera u prahu i nalaz grinja *V. destructor* na svijetlo obojenoj plastičnoj podlošci (Tlak Gajger, 2015.).

3.4. Višestruko ispiranje uzoraka pčela u vodenoj otopini detergenta

Nakon određivanja broja otpalih grinja metodom šećera u prahu preostali broj grinja utvrđen je pomoću ispiranja uzoraka odraslih pčela u vodenoj otopini detergenta. Za matičnu

otopinu uzeto je 5 mL detergenta i 1L vodovodne vode. Uzorkovane pčele su stavljene u laboratorijsku čašu u koju je dodana prethodno pripremljena otopina detergenta. Nakon toga je uzorak izmiješan pomoću magnetske miješalice tijekom 30 minuta brzinom od 900 okretaja po minuti. Uzorak je potom procijeđen kroz dva sita, jedan u kojemu su se zadržale pčele i drugi manjeg promjera okanaca u kojemu su zadržane izdvojene grinje. Pčele u situ isprane su pod većim pritiskom vode kako bi se zaostale grinje na pčelama lakše odvojile. Grinje sa sita su izbrojane uz pomoć povećala. Pčele iz svakog uzorka su također prebrojane.

3.5. Prirodni dnevni pad grinja

Prirodni pad grinja *V. destructor* praćen je 10 dana prije uzorkovanja odraslih pčela. Pri tome su korišteni nauljeni papirnati podlošci koje smo postavljali na podnice košnica i mijenjali nakon svakog brojenja otpalih nametničkih grinja, odnosno svaki drugi dan.

3.6. Tretiranje pčelinjih zajednica oksalnom kiselinom

Za pripremu otopine oksalne kiseline 60 g kristala oksalne kiseline otopljeno je u vrućoj otopini šećernog sirupa omjera 1:1 (3,5% otopina). Pomoću brizgaljke od 5 mL pripremljena otopina je aplicirana izravno po pčelama smještenima u ulicama između okvira košnice.

3.7. Procjenjivanje broja grinja *V. destructor* u pčelinjim zajednicama

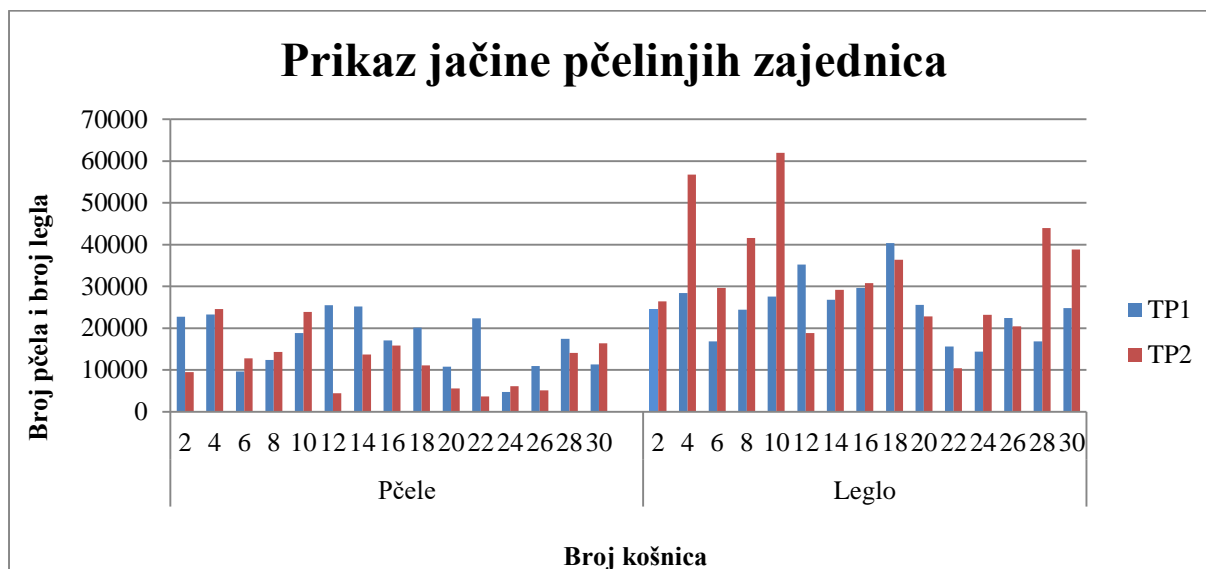
U svrhu procjenjivanja ukupnog broja grinja *V. destructor* (foretske i reproduktivne faze) unutar pčelinje zajednice i radi korelacije dobivenih podataka više primijenjenih dijagnostičkih metoda o stupnju njihove invadiranosti proveden je „vrlo kratak protokol“ u razdoblju od 15 dana. Od 0. do 10. dana praćen je prirodni pad grinja svakog drugog dana; 10. dana izvršeno je uzorkovanje odraslih pčela, procijenjena jačina pčelinjih zajednica i tretiranje oksalnom kiselinom; Od 10. do 15. dana praćen je pad grinja *V. destructor* nakon provedenog tretmana oksalnom kiselinom.

3.8. Statistička obrada podataka

Prilikom obrade podataka korišten je IBM SPSS Statistics Subscription program i Microsoft Office Excel 2007.

4. REZULTATI

Određivanjem jačine pčelinjih zajednica po Liebefeldu utvrđen je prosječni broj od 16.813,33 pčela uz standardnu devijaciju od 6.488,23 na TP1 (koeficijent varijacije 39%) za razliku od TP2 gdje prosječan broj iznosio 12.055,33 pčela uz standardnu devijaciju od 6574,87 (koeficijent varijacije 55%).



Grafikon 1. Usporedni prikaz jačine pčelinjih zajednica između TP1 i TP2.

Prosječan broj stanica saća s leglom na TP1 iznosi 24.880 uz standardnu devijaciju od 7.205,08 (koeficijent varijacije 29%) dok na TP2 iznosi 32.746,67 uz standardnu devijaciju od 14.122,62 (koeficijent varijacije 43%).

Prilikom uzorkovanja odraslih pčela u terenskim uvjetima na TP1 utvrđena je prosječna vrijednost mase pčela od 42,67 grama uz standardnu devijaciju od 2,35 grama (koeficijent varijacije 6%), a na TP2 srednja vrijednost mase pčela iznosila je 43,93 grama uz standardnu devijaciju od 3,49 grama (koeficijent varijacije 8%).

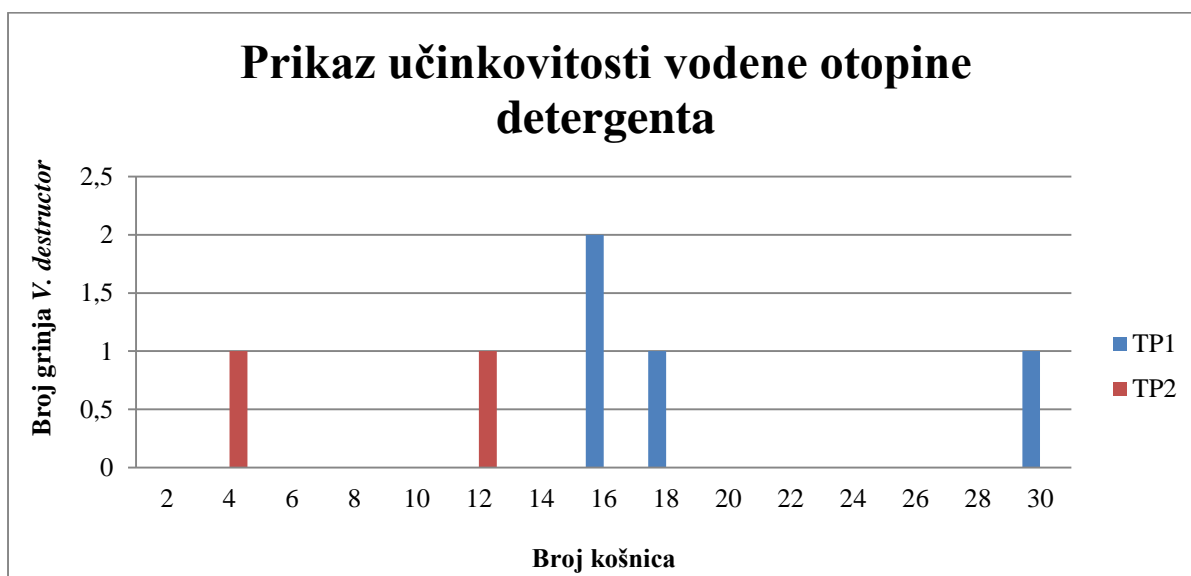
Zanimljivo je da je prosječni broj pčela po pojedinačnom uzorku iznosio 355,87 pčela uz standardnu devijaciju od 29,53 na TP1 (koeficijent varijacije 8%), a 318,29 pčela uz standardnu devijaciju od 34,05 na TP2 (koeficijent varijacije 11%).



Grafikon 2. Usporedni prikaz učinkovitosti dijagnostičke metode primjenom šećera u prahu na TP1 i TP2.

Broj grinja <i>V. destructor</i> utvrđenih primjenom dijagnostičke metode šećera u prahu					
	Srednja vrijednost (SV)	Min.	Max.	Standardna devijacija (SD)	Koeficijent varijacije (KV)
TP1	3,6	0	25	6,3	175%
TP2	0,73	0	5	1,58	215%

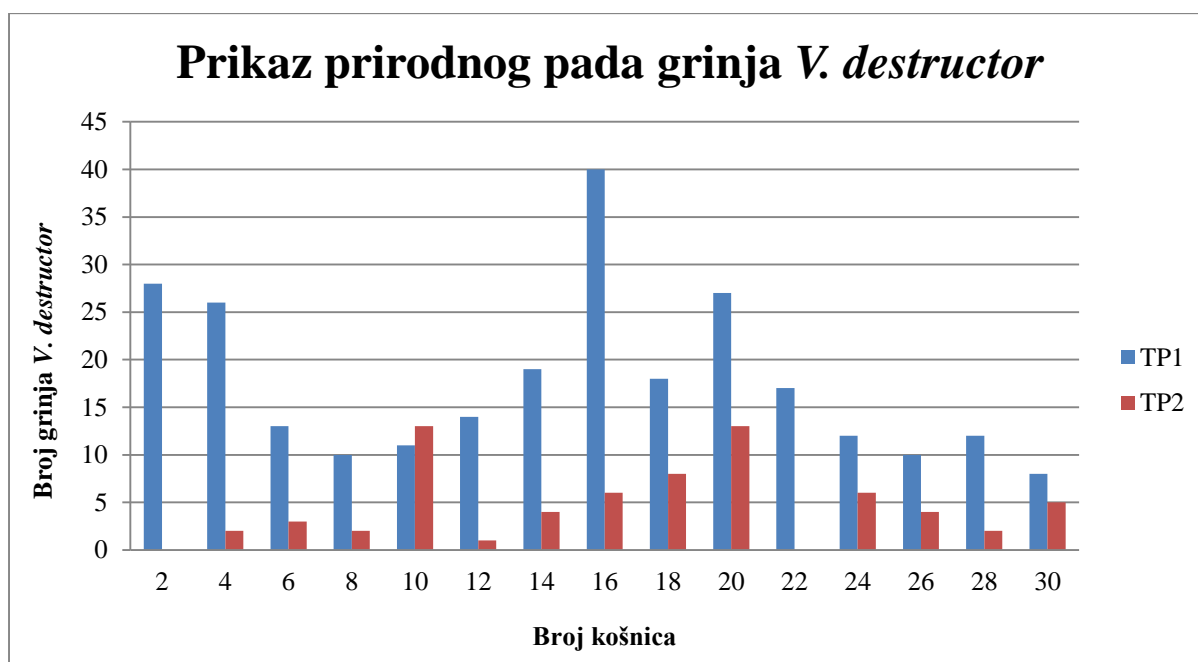
Tablica 1. Srednja vrijednost broja grinja *V. destructor* utvrđenih na TP1 i TP2 primjenom dijagnostičke metode šećera u prahu.



Grafikon 3. Usporedni prikaz učinkovitosti dijagnostičke metode primjenom vodene otopine detergenta na TP1 i TP2.

Broj grinja <i>V. destructor</i> utvrđenih primjenom vodene otopine detergenta					
	Srednja vrijednost (SV)	Min.	Max.	Standardna devijacija (SD)	Koeficijent varijacije (KV)
TP1	0,27	0	2	0,59	223%
TP2	0,13	0	1	0,35	264%

Tablica 2. Srednja vrijednost broja grinja *V. destructor* utvrđenih na TP1 i TP2 primjenom vodene otopine detergenta.

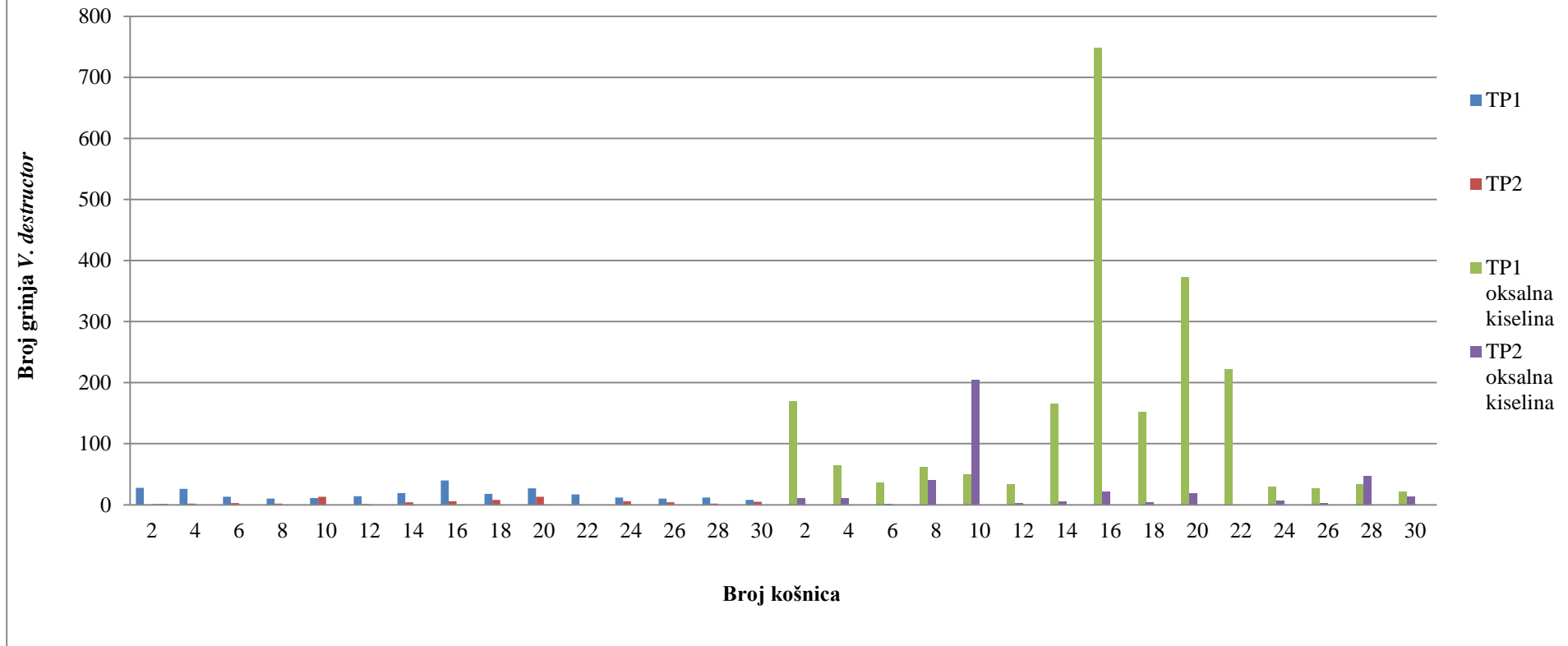


Grafikon 4. Usporedni prikaz prirodnog pada grinja *V. destructor* između TP1 i TP2 prije uzorkovanja.

Broj grinja <i>V. destructor</i> utvrđenih prirodnim padom grinja					
	Srednja vrijednost (SV)	Min.	Max.	Standardna devijacija (SD)	Koeficijent varijacije (KV)
TP1	17,67	8	40	8,94	51%
TP2	4,6	0	13	4,10	89%

Tablica 3. Srednja vrijednost broja grinja *V. destructor* utvrđenih prirodnim padom na TP1 i TP2.

Prikaz prirodnog pada grinja *V. destructor* prije uzorkovanja i nakon tretmana s oksalnom kiselinom



Grafikon 5. Usporedni prikaz ukupnog broja prirodnog pada grinja *V. destructor* prije uzorkovanja i nakon tretiranja pčelinjih zajednica oksalnom kiselinom između TP1 i TP2.

Broj grinja <i>V. destructor</i> utvrđenih nakon primjene oksalne kiseline					
	Srednja vrijednost (SV)	Min.	Max.	Standardna devijacija (SD)	Koeficijent varijacije (KV)
TP1	146	22	748	193,45	132%
TP2	25,87	0	204	51,19	198%

Tablica 4. Srednja vrijednost broja grinja *V. destructor* utvrđenih nakon tretiranja pčelinjih zajednica oksalnom kiselinom na TP1 i TP2.

Za određivanje korelacije između primijenjenih dijagnostičkih metoda u svrhu određivanja broja grinja *V. destructor* korišten je Kendallov koeficijent korelacije. Na TP1 utvrđena je statistički jaka korelacija između broja otpalih grinja primjenom metode šećera u prahu i s naknadnom primjenom otopine detergenta (0.930; $p < 0,01$; $R = 86,49\%$) kao i kod TP2 (0.810; $p < 0,01$; $R = 65,61\%$), relativno slaba korelacija s prirodnim padom grinja (0.495; $p < 0,05$; $R = 24,50\%$) za razliku od TP2 bez korelacijske značajnosti i srednje jake korelacije s padom grinja nakon tretiranja pčelinjih zajednica s oksalnom kiselinom (0.503; $p < 0,05$; $R = 25,30\%$) kao i kod TP2 (0.546; $p < 0,05$; $R = 29,81\%$). Dijagnostička metoda primjene šećera u prahu pokazala se vrlo učinkovitom na TP1 (Kendallov koeficijent konkordancije = 0.800) i manje učinkovitom na TP2 (Kendallov koeficijent konkordancije = 0.044).

Broj utvrđenih grinja metodom višestrukog ispiranja vodenom otopinom detergenta na TP1 korelacija je relativno slaba u odnosu na pad grinja nakon tretiranja pčelinjih zajednica oksalnom kiselinom (0,429; $p < 0,05$; $R = 18,40\%$) kao što je to također i kod prirodnog pada grinja (0,420; $p < 0,05$; $R = 17,64\%$), ali je korelacija jaka u odnosu na metodu korištenja šećera u prahu (0,930; $p < 0,01$; $R = 86,49\%$) kao što je dobiveno i na TP2 (0,810; $p < 0,01$; $R = 65,61\%$). Prirodnim padom grinja na TP1 utvrđena je srednje jaka korelacija u odnosu na pad grinja nakon tretiranja pčelinjih zajednica oksalnom kiselinom (0,657; $p < 0,01$; $R = 43,16\%$) i relativno slaba korelacija u odnosu na metodu šećera u prahu (0,495; $p < 0,05$; $R = 24,50\%$) i vodenu otopinu detergenta (0,420; $p < 0,01$; $R = 17,64\%$). Na TP2 nije utvrđena korelacijska značajnost u odnosu na ostale tri metode. Padom grinja nakon tretiranja pčelinjih zajednica oksalnom kiselinom na TP1 utvrđena je relativno slaba korelacija u odnosu na metodu vodene otopine detergenta (0,429; $p < 0,05$; $R = 18,40\%$), ali je srednje jaka u odnosu na metodu šećera u prahu (0,503; $p < 0,05$; $R = 25,30\%$) kao i kod TP2 (0,546; $p < 0,05$; $R = 29,81\%$) te kod prirodnog pada grinja (0,657; $p < 0,01$; $R = 43,16\%$) na TP1.

5. RASPRAVA

Određivanjem jačine pčelinjih zajednica metodom po Liebefildu uočeno je da su pokusne zajednice smještene na TP1 slabije u usporedbi s pokusnim zajednicama smještenim na TP2. Takav rezultat bio je očekivan s obzirom na razlike u provedbi tehnoloških postupaka na pčelinjacima, a posebice s obzirom na primjenjivane strategije kontroliranja varooze. Svakako tome doprinosi i rezultat utvrđenog značajno većeg prosječnog broja otpalih grinja *V. destructor* u pokusnim zajednicama smještenim na TP1, a kao posljedice netretiranja pčelinjih zajednica protiv varooze tijekom dvije godine.

Značajnije manja površina saća zaposjednuta položenim pčelinjim leglom, kao i masa uzorkovanih odraslih pčela prikupljenih u posudi iste zapremine na TP1 u odnosu na TP2 je očekivana. Naime, to je posljedica jake invadiranosti pčelinjih zajednica na TP1, kao i prisutnosti odraslih primjeraka i svih razvojnih oblika grinja *V. destructor* unutar stanica saća u kojima se uobičajeno istodobno odvija razvoj pčelinjeg legla. Uz utvrđenu manju prosječnu ukupnu masu pojedinog uzorka odraslih pčela uzorkovanih u pčelinjim zajednicama na TP1, shodno tome utvrđen je i značajnije veći broj jedinki odraslih pčela po pojedinačnom uzorku.

Navedeno se može obrazložiti velikim gubitkom hemolimfe kao i količine masno-bjelančevinastog tijela kod nosioca, a tijekom aktivnog parazitiranja ove nametničke grinje. Gubitak mase pojedinačnih odraslih pčela govori u prilog tome da je na TP1 u odnosu na TP2 prosječni broj pčela po pojedinačnom uzorku bio veći a shodno tome je bilo potrebno izdvojiti značajnije veći broj pčela iz pčelinjih zajednica na TP1 kako bi se dostigla minimalna masa odraslih pčela od 40 grama po uzorku.

Broj grinja *V. destructor* utvrđenih primjenom dijagnostičke metode šećera u prahu provedene u poljskim uvjetima, kao i primjene laboratorijske dijagnostičke metode višestrukog ispiranja u vodenoj otopini detergenta u ovom je istraživanju očekivano bio veći na TP1. Zanimljivo je da je postotak učinkovitosti primijenjenih dijagnostičkih metoda utvrđenih grinja *V. destructor* primjenom šećera u prahu na TP1 (92,59%) bio značajnije veći u usporedbi s učinkovitošću istih primijenjenih metoda na TP2 (83,33%).

Iz navedenih rezultata razvidno je da se s višim stupnjem invadiranosti pčelinjih zajednica grinjama *V. destructor* povećava i učinkovitost primijenjenog dijagnostičkog testiranja na uzorku odraslih pčela. Također, ako je u pčelinjim zajednicama prisutna slabija invazija varoozom, time je i primjena višestrukog ispiranja uzorka odraslih pčela u vodenoj otopini detergenta bolji dijagnostički izbor.

Sličnim rezultatima naš nalaz potvrdili su DIAZ i suradnici (2017.) te BAK i suradnici (2009.). Sukladno navedenim podacima u ovom istraživanju prema Kendalllovu koeficijentu konkordancije utvrđena je statistički značajna razlika između navedenih dijagnostičkih testova.

Prirodnim padom grinja *V. destructor* u pčelinjim zajednicama smještenim na TP1 utvrđena je očekivano veća brojnost grinja u odnosu na TP2, osim u košnici 10 gdje je broj utvrđenih grinja *V. destructor* na TP1 bio manji.

Sukladno dosad navedenim podacima nakon tretmana s tzv. „shock“ terapijom oksalnom kiselinom za koju smo smatrali da će uzrokovati konačno otpadanje grinja zaostalih u pčelinjim zajednicama nakon provedenih dijagnostičkih postupaka, u pokusnim pčelinjim zajednicama smještenim na oba pčelinjaka utvrđen je očekivani značajno veći broj otpalih grinja *V. destructor*, s iznimkom košnice 10.

Neobično je da je prosječno utvrđena brojnost prirodnog pada grinja *V. destructor* na pčelinjim zajednicama smještenim na TP1 u košnici 28 bila očekivano veća u usporedbi s invadiranošću pčelinjih zajednica na TP2, ali nakon tretmana oksalnom kiselinom u istoj košnici utvrđena je veća brojnost grinja na TP2. Na TP1 brojnost grinja *V. destructor* kod prirodnog pada je statistički značajna, odnosno postoji pozitivna korelacija u odnosu na brojnost grinja *V. destructor* utvrđenu nakon tretmana oksalnom kiselinom. Takav rezultat potvrdili su i BRANCO i suradnici (2006.).

6. ZAKLJUČCI

- Parazitiranje nametničkih grinja *V. destructor* na medonosnoj pčeli (*Apis mellifera*) pri jakim invazijama pčelinjih zajednica dovodi do značajnog smanjenja tjelesne mase pojedinačnih odraslih pčela, kao i smanjene površine saća zaposjednutog položenim pčelinjim leglom.
- Dijagnostička metoda uporabe šećera u prahu u terenskim uvjetima pokazala se učinkovitom pri utvrđivanju i kvantifikaciji broja grinja *V. destructor*, a uspješnost provedbe ovisi o stupnju invadiranosti pojedine pčelinje zajednice.
- Laboratorijska dijagnostička metoda višestrukog ispiranja uzorka odraslih pčela u vodenoj otopini detergenta je učinkovita i relevantna laboratorijska pretraga.
- Brojnost grinja *V. destructor* utvrđena prilikom praćenja prirodnog pada grinja i posebice nakon tretmana oksalnom kiselinom je bila veća u zajednicama smještenim na TP1.
- Kod većeg stupnja invadiranosti pčelinje zajednice grinjama *V. destructor* pouzdanost primjene šećera u prahu kao dijagnostičke metode je veća i predstavlja dobar izbor, dok je kod manjeg stupnja invazije pčelinje zajednice bolji odabir laboratorijska dijagnostička pretraga višestrukog ispiranja uzorka pčela u vodenoj otopini detergenta.

7. POPIS LITERATURE

AMDAM, G. V., K. HARTFELDER, K. NORBERG, A. HAGEN, S. W. OMHOLT (2004): Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A Factor in Colony Loss During Overwintering? J. Econ. Entomol. 97, 3, 741–747.

ANDERSON, D. L., J. H. W. TRUEMAN (2000): *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. Exp. Appl. Acarol. 24, 165–189.

ANON (2016): Nacionalni pčelarski Program za razdoblje od 2017. do 2019. godine. Ministarstvo poljoprivrede.

ANON (2018): <http://agriculture.vic.gov.au/agriculture/pests-diseases-and-weeds/pest-insects-and-mites/varroa-an-exotic-parasite-mite-of-honey-bees>). Pristupljeno 4. ožujka 2019.

ANON (2018): Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2018. godini. N. N. 10/2018.

BAK, B., J. WILDE, M. SIUDA, M. KOBYLINSKA (2009): Comparison of two methods of monitoring honeybee infestation with *Varroa destructor* mite. Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Anim. Sci. 46, 33–38.

BIČÍK V., J. VAGER, H. SÁDOVSKÁ (2016): The effectiveness of thermotherapy in the elimination of *Varroa destructor*. – Acta Mus. Siles. Sci. Natur. 65, 263-269.

BOECKING, O., E. GENERSCH (2008): Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping. J. Consum. Protect. Food Safety 3, 2, 221–228.

BOGDANOV, S. (2006): Contaminants of bee products. Apidologie 37, 1, 1–18.

BRANCO, M. R., N. A. KIDD, R. S. PICKARD (2006): A comparative evaluation of sampling methods for *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) population estimation. Apidologie, 37, 4, 452.

BÜCHLER, R. (1994): *Varroa* tolerance in honey bees – occurrence, characters and breeding. Bee World 49, 6–18.

- CALDERONE, N.W. (2005): Evaluation of drone brood removal for management of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the northeastern United States. *J. Econ. Entomol.* 98, 3, 645–650.
- CHAPMAN, R. F. (2013): The insects – structure and function. SIMPSON, S. J.; A. E. DOUGLAS (Eds.). Cambridge University Press, 4th edition, Cambridge, UK.
- CHARRIÈRE, J. D., A. IMDORF, B. BACHOFEN, A. TSCHAN (2003): The removal of capped drone brood: an effective means of reducing the infestation of *Varroa* in honey bee colonies. *Bee World* 84, 3, 117–124.
- CHAUZAT, M. P., P. CARPENTIER, A. C. MARTEL, S. BOUGEARD, N. COUGOULE, P. PORTA, J. LACHAIZE, F. MADEC, M. AUBERT, J. P. FAUCON (2009): Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environ. Entomol.* 38, 514–523.
- CHLEBO, R. (2016.): Treating varroasis and monitoring bee colony losses in Slovakia. U: 8. setkání uživatelů *Varroa* Monitoring Systému, 10th January 2016. Brno, Czech Republic.
- CURRIE, R. W., G. H. TAHMASBI (2008): The ability of high- and low-grooming lines of honey bees to remove the parasitic mite *Varroa destructor* is affected by environmental conditions. *J. Can. Zool.* 86, 9, 1059–1067.
- DE GUZMAN, L.I., M. DELFINADO-BAKER (1996): A new species of *Varroa* (Acari: Varroidae) associated with *Apis koschevnikovi* (Apidae: Hymenoptera) in Borneo. *Int. J. Acarol.* 22, 2327.
- DE JONG, D. (1997): *Varroa* and other parasites of brood. In: Morse R, Flottum K (eds.) *Honey bee pest, predators, and diseases*, 3rd ed. A. I. Root Company, Ohio, USA, pp. 280–327.
- DELAPLANE, K. S., J. VAN DER STEEN, E. GUZMAN-NOVOA (2013): Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *J. Apic. Res.* 52, 1, 1–12.
- DELFINADO-BAKER, M., K. AGGARWAL (1987): A new *Varroa* (Acari: Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae). *Int. J. Acarol.* 13, 233–237.

DIAZ R., N. DURAN, P. HENRIQUEZ, P. ALDEA SANCHEZ (2017): Comparison of the effectiveness and sensitivity of the sugar shake method to detect phoretic varroa mites versus the goal standard method of soapy water washing. COLOSS Workshop: “Assessment of alternative methods for Varroa control”. Bologna (Italy), 21-22 March 2017.

DONZÉ, G., P. M. GUERIN (1994): Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 34, 305–319.

DONZÉ, G., M. HERRMANN, B. BACHOFEN, P. M. GUERIN (1996): Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Ecol. Entomol.* 21, 17–26.

DUAY, P., D. DE JONG, W. ENGELS (2002): Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genet. Mol. Res.* 1, 227–232.

ELZEN, P. J., J. R. BAXTER, M. SPIVAK, W. T. WILSON, (2000): Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie* 31, 437–441.

FAKIMZADEH, K. (2000): Potential of super fine ground, plain white sugar dusting as an ecological tool for the control of varroasis in the honey bee (*Apis mellifera*), *Am. Bee J.* 140, 487-491.

FAKIMZADEH, K. (2001): Effectiveness of confectioner sugar dusting to knock down Varra destructor from adult honey bees in laboratory trials. *Apidologie*, 32, 2, 139-148.

FERNÁNDEZ, N., M. EGUARAS, D. HERNÁNDEZ (1993): Distribution patterns of *Varroa jacobsoni* Oud. on *Apis mellifera* L. during winter in Argentina. *Apidologie* 24, 397–401.

FERNANDEZ, N., Y. COINEAU (2006): *Varroa – The Serial Bee Killer Mite*. Atlantica, Biarritz, France.

FRIES, I., H. HANSEN, A. IMDORF, P. ROSENKRANZ (2003): Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie* 34, 389–398.

GARCIA-FERNANDEZ, P., C. SANTIAGO-ALVAREZ, E. QUESADA-MORAGA (2008): Pathogenicity and thermal biology of mitosporic fungi as potential microbial control agents of *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 39, 6, 662–673.

GARRIDO, C., P. ROSENKRANZ (2003): The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*. *Exp. Appl. Acarol.* 31, 269-273.

GERULA D., P. WĘGRZYNOWICZ, B. PANASIUK, M. BIEŃKOWSKA (2018): Testing a CO2 counter for assessment of phoretic varroa mites in bee colonies. Research Institute of Horticulture, Apiculture Division in Puławy, Poland. Proceedings of the 2017 COLOSS Conference. *Bee world*. Vol. 95, 26.

IMDORF, A; L. GERIG (2001): Course in determination of colony strength. Swiss Federal Dairy Research Institute, Liebefeld CH3003 Bern Switzerland (after L Gerig, 1983. *Lehrgang zur Erfassung der Volksstärke*). *Schweiz Bienen-Zeitung* 106, 199-204.

JOHNSON, R.M., H. S. POLLOCK, M.R. BERENBAUM (2009): Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *J. Econ. Entomol.* 102, 2, 474–479.

KANBAR, G., W. ENGELS (2003): Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitol. Res.* 90, 5, 349–354.

KOSANOVIĆ, M., N. BILANDŽIĆ, M. SEDAK, S. KOS, I. TLAK GAJGER (2019): Koncentracije arsena, kadmija i žive u pčelinjem vosku (*Apis mellifera*) tijekom njegove prerade iz saća u satne osnove. *Vet. Stn.* 50, 1, 19-25.

KRALJ, J., A. BROCKMANN, S. FUCHS, J. TAUTZ (2007): The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L.. *J. Compar. Physiol. A: Neuroethol. Sens. Neu. Behav. Physiol.* 193, 3, 363–370.

LEE, K., G. REUTER, M. SPIVAK (2010): Standardized sampling plan to detect *Varroa* density in colonies and apiaries. *J. Econ. Entomol.* 103, 4, 1039-50.

MAGGI, M. D., S. R. RUFFINENGO, P. NEGRI, M. J. EGUARAS (2010): Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *J. Parasitol. Res.* 107, 1189-1192.

MARTIN, S. J. (1994): Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions. Exp. Appl. Acarol. 18, 87–100.

MARTIN, S. J. (2001): The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honey bee colonies: a modeling approach. J. App. Ecol. 38, 1082-1093.

MARTIN-HERNANDEZ, R., M. HIGES, J. L. PEREZ, M. J. NOZAL, L. GOMEZ, A. MEANA (2007): Short term negative effect of oxalic acid in *Apis mellifera iberiensis*. Span. J. Agr. Res. 5, 4, 474–480.

MEIKLE, W.G., G. MERCADIER, N. HOLST, V. GIROD (2008): Impact of two treatments of a formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) conidia on *Varroa* mites (Acari: Varroidae) and on honeybee (Hymenoptera: Apidae) colony health. Exp. Appl. Acarol. 46, 1–4, 105–117.

OLDROYD, B.P. (1999): Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. Trends Ecol. Evol. 14, 312–315.

OUDEMANS, A.C. (1904): On a new genus and species of parasitic acari. Notes from the Leyden Museum 24, 216–222.

PETRINEC, Z., I. RAČIĆ, Đ. SULIMANOVIĆ, Ž. KRPAN, N. ZUJIĆ, LJ. NARDELI, Z. ŠVER, N. FIJAN (1979): Prikaz raširenosti varooze u SR Hrvatskoj i njezino suzbijanje. Vet. arhiv 49, 59-60.

PIETROPAOLI, M., G. FORMATO (2017): Liquid formic acid 60% to control varroa mites (*Varroa destructor*) in honey bee colonies (*Apis mellifera*): protocol evaluation. J. Apic. Res. DOI: 10.1080/00218839.2017.1376767.

PUŠKADIJA, Z., D. BUBALO, M., DRAŽIĆ, N. KEZIĆ (2004): Varooza - kontrola alternativnim pristupom. Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek.

RAMSEY S. D., R. OCHOA, G. BAUCHAN, C. GULBRONSON, J. D. MOWERY, A. COHEN, D. LIM, J. JOKLIK, J. M. CICERO, J. D. ELLIS, D. HAWTHORNE, D. VANENGELSDORP (2018): *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. PNAS 29, 1792-1801. DOI: 10.1073/pnas.1818371116.

- RINDERER, T., L. DE GUZMAN, H. A. SYLVESTER (2004): Re-examination of the accuracy of a detergent solution for varroa mite detection. *American Bee J.* 144, 7, 560-562.
- ROSENKRANZ, P., R. KIRSCH, R. RENZ (2006): Population dynamics of honey bee colonies and *Varroa* tolerance: a comparison between Uruguay and Germany. U: Santana, Lobo, Hartfelder (Eds.), *Proceedings 7th Encontro Sobre Abelhas*, USP, Ribeirão Preto, Brazil.
- ROSENKRANZ P, P. AUMEIER, B. ZIEGELMANN (2010): Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S96–119.
- SHAW, K.E., G. DAVIDSON, S. J. CLARK, B. V. BALL, J. K. PELL, D. CHANDLER, K. D. SUNDERLAND (2002): Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasitic mite of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Biol. Contr.* 24, 266–276.
- SHIMANUKI, H., D. A. KNOX (1991): *Diagnosis of honeybee diseases*. USDA, Washington D. C., USA Agriculture handbook AH-670.
- SHIMANUKI, H., D. A. KNOX (2000): *Diagnosis of Honey Bee Diseases*. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook No. AH–690, pp. 61.
- STANIMIROVIĆ, Z., U. GLAVINIĆ, N. LAKIĆ, D. RADOVIĆ, M. RISTANIĆ, E. TARIĆ, J. STEVANOVIĆ (2017): Efficacy of plant-derived formulation “Argus Ras” in *Varroa destructor* control. *Acta Vet. Beograd* 67, 191-200.
- STEINER, J., F. DITTMANN, P. ROSENKRANZ, W. ENGELS (1994): The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *Invertebr. Rep. Develop.* 25, 175–183.
- SULIMANOVIĆ, Đ. (1978): Akaroza i varooza u SR Hrvatskoj. *Pčela* 97, 10, 262.
- TLAK GAJGER I., P. SUŠEC (2019): Efficacy of varroacidal food additive appliance during summer treatment of honeybee colonies (*Apis mellifera*) *Vet. arhiv* 89, 1, 87-96.
- VAN DER GEEST, L.P.S., S. L. ELLIOT, J. A. J. BREEUWER, E. A. M. BEERLING (2000): Diseases of mites. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 497–560.

WAHIS (2018): World Animal Health Information System. Pristupljeno 12. travnja 2019.
[http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?
disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_ty
pe=0&disease_id_terrestrial=125&species_t=0&disease_id_aquatic=-
999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2018&selected_report_p
eriod=1&selected_start_month=1&date_submit=OK](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=125&species_t=0&disease_id_aquatic=-999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2018&selected_report_period=1&selected_start_month=1&date_submit=OK)).

8. SAŽETAK

Varooza je nametnička bolest medonosnih pčela uzrokovana hemofagnom grinjom *V. destructor*. Obzirom na velike gubitke u pčelarstvu koje uzrokuje varooza kao i proširenost ove bolesti po svijetu nužna je primjena brzih i točnih kvantitativnih dijagnostičkih metoda radi utvrđivanja brojnosti prisutnih grinja, a samim time i njihovog uspješnog kontroliranja. Najboljim i najčešće korištenim dijagnostičkim metodama pokazale su se primjena šećera u prahu u terenskim uvjetima i ispiranje uzorka odraslih pčela u vodenoj otopini detergenta u laboratoriju. Cilj ovoga istraživanja bio utvrditi njihovu učinkovitost i međusobnu povezanost.

Ključne riječi: varooza, medonosna pčela, dijagnostičke metode

9. SUMMARY

DETERMINING THE EFFECTIVENESS OF USING ICING SUGAR METHOD AND SOAPY SOLUTION METHOD ON SAMPLES OF ADULT BEES AS A DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR QUANTIFICATION A MITE *VARROA DESTRUCTOR*

Varroosis is a worldwide parasitic disease of honey bees caused by hematophagous mite *V. destructor*. Since varroosis causes great losses in beekeeping and considering of disease widespread, there is a necessity of using diagnostic methods for quantification Varroa mites and moreover for disease control. The best and most used methods for diagnostic purposes are icing sugar field method and soapy solution laboratory method. So the aim of this research was to determine the effectiveness and correlation between this two methods.

Keywords: Varroosis, honey bees, diagnostic methods

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 11. kolovoza 1991. u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu „Marije Jurić Zagorke“ i Osnovnu glazbenu školu „Zlatka Balokovića“ u Zagrebu. Srednju školu sam započela u zagrebačkoj Sedmoj gimnaziji, a glazbenu srednju nastavila u školi Zlatka Balokovića. Obje škole sam završila 2010. godine kad sam i upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Praksu sam odradila u sklopu Erasmus programa u Sloveniji te sam prisustvovala na ekskurziji u Beču u sklopu CEEPUS-a. Tijekom studiranja bila sam članica orkestra veterinarskog fakulteta.