

BIOKEMIJSKI I HISTOKEMIJSKI PROFIL LIČINAKA IZ PČELINJIH ZAJEDNICA INVADIRANIH MIKROPORIDIJOM *Nosema ceranae* I PRIHRANJIVANIH DODATCIMA HRANI NOZEVITPLUS I BEEWELL AMINOPLUS

Ivana TLAK GAJGER¹, Josipa VLAINIĆ², AnaMarija KOVAČ¹, Jasna RIBARIĆ³, Krunoslav PUŽAR⁵,
Srebrenka NEJEDLI¹, Ivana TARTARO BUJAK, Maja SMODIŠ ŠKERL⁴

SAŽETAK

Nametnička bolest nozemoza tipa C uzrokovana mikrosporidijom *Nosema ceranae* jedna je od najraširenijih bolesti medonosnih pčela u svijetu. Bolest uzrokuje naglu depopulaciju odraslih pčela i moguće propadanje invadiranih pčelinjih zajednica čime značajno narušava održivost i biološku ravnotežu prirodnih ekosustava, te profitabilnost pčelarstva kao poljoprivredne grane. S obzirom na moguće gospodarske štete, brzo umnažanje spora uzročnika *N. ceranae* te zabranu uporabe antibiotika u pčelarstvu Europske unije, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj višekratne primjene dodataka hrani za pčele biljnog sastava NozevitPlus i bjelančevinasto-vitaminskog sastava BEEWELL AminoPlus na biokemijske (ukupne bjelančevine, glukozu i masti) i histokemijske (prisutnost i distribuciju više vrsta mukopolisaharida i aktivnost enzima leucin aminopeptidaze) pokazatelje u ličinaka podrijetlom iz prihranjivanih pčelinjih zajednica. Utvrđene su srednje vrijednosti u rasponima: za ukupne bjelančevine NozevitPlus 0,094 - 0,137 i BEEWELL AminoPlus 0,087-0,114 (mg/mg tkiva ličinke); za koncentracije glukoze NozevitPlus 9,25 – 10,58 i BEEWELL AminoPlus 9,12 – 10,13 (mg/mg tkiva ličinke) te masti NozevitPlus 0,031 – 0,034 i BEEWELL AminoPlus 0,023 – 0,028 (mg/mg tkiva ličinke). Između navedenih rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika, kao ni između utvrđenih vrijednosti za kontrolne i pokusne pčelinje zajednice.

Ključne riječi: *Apis mellifera*, nozemoza tipa C, NozevitPlus, BEEWELL AminoPlus

BIOCHEMICAL AND HISTOCHEMICAL PROFILE OF LARVAE ORIGINATED FROM HONEYBEE COLONIES INVADED WITH MICROSPORIDIUM *Nosema ceranae* AND FED WITH FOOD ADDITIVES NOZEVITPLUS AND BEEWELL AMINOPLUS

Abstract

Nosemosis type C, caused by *Nosema ceranae*, is now considered as major health problem affecting beekeeping worldwide. The endoparasitic fungal invasions of *N. ceranae* adversely affect honey bee colony health and can result in complete colony collapse. The only widely used treatment for nosemosis type C, fumagillin, as well as other antibio-

¹ Sveučilište u Zagrebu Veterinarski fakultet, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Hrvatska

² Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Hrvatska

³ Ministarstvo poljoprivrede, Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, Planinska 2a, 10 000 Zagreb, Hrvatska

⁴ Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁵ Zen-Vet d.o.o., Crnojezerska 18, Zagreb, Hrvatska

tics are banned in the EU. Moreover, prolonged treatment with antibiotics may contribute to drug resistance and may exacerbate *N. ceranae* infection rather than suppress it. In the present study the effect of repeated applications of two food supplements NozevitPlus and BEEWELL AminoPlus (including herbs and protein ingredients) have been tested to biochemical (total proteins, glucose and lipids) and histopathological (content and distribution of mucosubstances and histochemical activity of aminopeptidase) profile in larvae originated from fed honey bee colonies. Mean of total protein concentration observed in this study ranged: for NozevitPlus 0.094-0.137 and for BEEWELL AminoPlus 0.087-0.114 (mg/mg larvae tissue). The glucose mean values concentrations ranges were as follows: NozevitPlus 9.25 – 10.58 and BEEWELL AminoPlus 9.12 – 10.13 (mg/mg larvae tissue); and the lipids mean values concentrations ranges were as follows: NozevitPlus 0.031-0.034 and BEEWELL AminoPlus 0.023-0.028 (mg/mg larvae tissue). Among these results isn't found statistically significant difference, as well as between experimental and control group of honeybee colonies.

Key words: *Apis mellifera*, nosemosis type C, NozevitPlus, BEEWELL AminoPlus

UVOD

Posljednjih godina broj pčelinjih zajednica u svijetu znatno se smanjio. Nestajanje pčela predstavlja ozbiljnu prijetnju ne samo suvremenom pčelarstvu već i svjetskoj poljoprivredi i ekonomiji u cjelini (POTTS i sur., 2010.). Usprkos brojnim istraživanjima konkretan uzrok masovnog ugibanja pčela nije utvrđen. Sve se više nagađa da je riječ o utjecaju čitavog niza štetnih čimbenika koji pojedinačno ili u različitim međusobnim kombinacijama negativno utječu na pčelinje zajednice. Invazija mikrosporidijom *N. ceranae* smatra se jednim od glavnih čimbenika propadanja pčelinjih zajednica i smanjenja proizvodnje meda, naročito u mediteranskim zemljama Europe (HIGES i sur., 2010.b). Nozemoza tipa C je bolest kroničnog tijeka s dugim inkubacijskim razdobljem, a najčešće prolazi asimptomatski ili je praćena nespecifičnim simptomima poput postepenog slabljenja pčelinjih zajednica, povećanih jesenskih i zimskih gubitaka pčela i smanjene proizvodnje meda (HIGES i sur., 2010.a). Umnažajući se primarno u epitelnim stanicama srednjeg crijeva pčele, *N. ceranae* uzrokuje ireverzibilne degenerativne promjene s posljedičnim poremećajima u procesima probave. Propale stanice srednjeg crijeva gube probavnu funkciju, odnosno smanjuje se lučenje probavnih enzima i apsorpcija hranjivih tvari što dovodi do neishranjenosti i uginuća pčela (HIGES i sur., 2007.). Invadirane pčele skupljačice žive kraće i ugibaju u prirodi, a kako upravo one donose pelud i nektar u košnicu, smanjenjem njihovog broja u zajednici, smanjuje se i prinos meda. Kako bi nadomjestile gubitak odraslih pčela, mlade pčele preuranjeno postaju skupljačice, čime se poremeti cjelokupni raspored i redosljed obavljanja zadataka članova pčelinje zajednice. Zbog smanjenja broja pčela hraniteljica skraćuje se vrijeme tijekom kojeg se iste posvećuju razvoju legla i higijeni unutar košnice, istodobno se povećava rizik od pojave drugih bolesti legla, te je otežano održavanje temperature potrebne za razvoj legla (HIGES i sur., 2013.). Kao posljedica poremećene probave bjelančevina i niske razine aminokiselina u hemolimfi, kod mladih pčela, ne dolazi u potpunosti do razvoja mliječne žlijezde neophodne za proizvodnju matične mliječi kojom hrane leglo i maticu, pa je daljnji razvoj pčelinje zajednice, naročito u proljeće, usporen i otežan. U trenutku kad matica ne može više polaganjem jaja nadoknaditi gubitak odraslih pčela, dolazi do postepenog slabljenja i propadanja pčelinjih zajednica. Budući simptomi ove bolesti nisu vidljivi pčelari ju često pravodobno ne uočavaju i ne pridaju joj veliki značaj. Rezultati provedenih istraživanja pokazuju da je *N. ceranae* u odnosu na mikrosporidiju *N. apis* patogenija (HIGES i sur., 2007.), nema sezonski karakter, uzrokuje teže patološke promjene (MARTÍN-HERNÁNDEZ i sur., 2007.) i viši mortalitet kod invadiranih pčela

(WILLIAMS i sur., 2014.). Za razliku od mikrosporidije *N. apis*, koja je desetljećima prirodni nametnik europske medonosne pčele, čini se da *N. ceranae* u ovako kratkom razdoblju nije uspjela koevoluirati s nosiocem uzrokujući tako teži oblik bolesti (MARTÍN-HERNÁNDEZ i sur., 2011.). Njezina veća patogenost povezuje se s energetskim stresom (MAYACK i NAUG, 2010.), imunosupresijom (ANTÚNEZ i sur., 2009.) te dobrom prilagodbom na visoke temperature zraka (MARTÍN-HERNÁNDEZ i sur., 2009.). Propisi Europske unije strogo zabranjuju primjenu antibiotika u suzbijanju i liječenju nozemoze i drugih bolesti pčela. U Sjedinjenim Američkim Državama, Kanadi i Argentini dozvoljeno je nakon zadnjeg vrcanja meda koristiti fumagilin za kontroliranje invazije *N. apis* (HUANG i sur., 2013.). Međutim, dokazano je da fumagilin ne ubija spore, već djeluje samo na vegetativne oblike mikrosporidija, na način da dovodi do grešaka u replikaciji njezine deoksiribonukleinske kiseline (AKYOL i sur., 2006.). Za razliku od *N. apis*, propisani način primjene fumagilina u pčelinjim zajednicama invadiranim *N. ceranae* samo pridonosi povećanju stupnja invazije (HUANG i sur., 2013.), učinak mu je kratkotrajan te se već četiri mjeseca nakon završetka tretiranja njime pojavljuju reinvazije. Male koncentracije fumagilina nakon završetka tretiranja, sinergistički djeluju s mikrosporidijom *N. ceranae* na način da dovode do promjena u ključnim strukturnim i metaboličkim bjelančevinama srednjeg crijeva pčela čime remete prirodne obrambene procese i stvaraju preduvjet za reinvaziju ovim nametnikom (HUANG i sur., 2013.). Obzirom da se iscrpine biljaka tradicionalno koriste u liječenju brojnih zaraznih bolesti u humanoj i veterinarskoj medicini, istraživanja su danas usmjerena na pronalaženje i ispitivanje prirodnih tvari koje bi bile učinkovite u suzbijanju nozemoze tipa C bez toksičnog učinka na pčele, bez zaostajanja opasnih rezidua i/ili mijenjanja organoleptičkih svojstava meda te koje bi nakon konzumacije mogle ugroziti zdravlje ljudi. S obzirom na razvijenu svijest, zahtjeve i potražnju potrošača za ekološkim proizvodima, primijenjeni pripravci bi trebali povoljno utjecati na zdravlje pčelinjih zajednica i njihovu proizvodnost i biti ekonomski prihvatljivi. NozevitPlus je dodatak hrani za pčele koji sadrži biljne polifenole tanine, obogaćene vitaminima, esencijalnim uljima i limunskom kiselinom. Zbog svog protuupalnog i antimikrobnog djelovanja tanini iz biljaka se već desetljećima koriste u liječenju gastrointestinalnih poremećaja, gdje vežući se na bjelančevine i druge makromolekule stvaraju zaštitni sloj nad oštećenim tkivom (ASHOK i UPADHYAYA, 2012.). BEEWELL AminoPlus je dodatak hrani za pčele bogat aminokiselinama i vitaminima. Njegova primjena se preporuča pri liječenju nozemoze te u cilju jačanja imuniteta pčela tijekom i na-

kon izloženosti stresu. Nadalje, koristi se za povećanje plodnosti matice i jačanje pčelinjih zajednica. Obzirom da na tržištu ne postoje odgovarajući registrirani veterinarsko medicinski proizvodi koji bi se mogli koristiti u prevenciji i liječenju nozemoze tipa C te se borba protiv ove bolesti temelji prvenstveno na profilaksi i primjeni dobre pčelar-ske prakse cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj primje-ne dataka hrani za pčele na biokemijske i histokemijske pokazatelje, te aktivnost enzima leucin aminopeptidaze u ličinaka podrijetlim iz prihranjivanih pčelinjih zajednica.

MATERIJAL I METODE

Prihranjivanje pčelinjih zajednica dodatcima hrani

Istraživanje je provedeno na pčelinjaku smještenom u kontinentalnom dijelu Hrvatske tijekom srpnja i kolovoza 2014. godine. Pokus je postavljen na odabranim pčelinjim zajednicama prirodno invadiranim *N. ceranae* (potvrđeno primjenom višestrukog PCRa), a koje su podijeljene su na dvije pokusne skupine prihranjivane dodatcima hrani NozevitPlus (5) i BEEWELL AminoPlus (5) i kontrolnu skupinu (10). Sve pčelinje zajednice prihranjivane su navečer, tijekom onoliko dana i dozama kako su propisali proizvođači navedenih dataka hrani. Kontrolne pčelinje zajednice dobivale su isključivo otopinu šećernog sirupa, bez dataka, pripremljenu i primijenjenu u isto vrijeme i istim količinama kao i pokusne skupine (Tablica 1). Na početku istraživanja pčelinje zajednice bile su klinički pregledane te nisu pokazivale znakove bolesti karakteristične za bolesti pčelinjeg legla. Pčelinje zajednice bile su

smještene na području u čijoj blizini poljoprivredni usjevi nisu bili tretirani neonikotinoidnim insekticidima, te tijekom pokusa nisu bile tretirane drugim veterinarsko-medicinskim pripravcima.

Uzorkovanje pčelinjih ličinki

Uzorkovanje pčelinjih ličinki radi određivanja biokemijskih i histokemijskih pokazatelja (ukupnih bjelančevina, glukoze i masti) i izrade histoloških preparata s ciljem utvrđivanja prisutnosti mukopolisaharida i aktivnosti enzima leucin aminopeptidaze obavljeno je 1., 10., 20. i 30. dana od početka pokusa. Iz svake pčelinje zajednice uzorkovano je tridesetak pčelinjih ličinki u dobi otprilike šest do deset dana, koje su izravno vađene pincetom iz stanica saća. Jedan dio uzorkovanih ličinki (tri ličinke) pojedinačno su umatane u aluminijsku foliju, a drugi dio ličinki (dvadesetak ličinki) uzorkovano je u jednokratne Eppendorf epruvete. Uzeti uzorci dostavljeni su u laboratorij u prijenosnom spremniku s tekućim dušikom, a do obavljanja biokemijskih analiza bili su pohranjeni u zamrzivaču, na temperaturi od -80°C . Treći dio uzorkovanih ličinki (šest do deset ličinki) bila je fiksirana u epruvetama s prethodno dodanim 10 %-tnim formalinom te su tako pripremljeni uzorci čuvani do izrade histoloških preparata radi određivanja prisutnosti i distribucije mukopolisaharida i proteolitičkih enzima u hladnjaku na temperaturi od $+4^{\circ}\text{C}$.

Određivanje biokemijskog sastava pčelinjih ličinki

Za određivanje koncentracije ukupnih bjelančevina, glukoze i masti u tkivu, ličinke su pojedinačno vagnute i ho-

Tablica 1. Prikaz načina prihranjivanja pčelinjih zajednica i primijenjenih dataka hrani.

Skupine		Broj zajednica po skupini	Način prihrane	Doza	Vrijeme prihrane
Kontrolna	1. Kontrolna	10	samo šećernim sirupom (1 : 1) u hranilici	iste količine šećernog sirupa (1 : 1) kao i za pokusne skupine	isti dan kao i pokusne skupine
Pokusne	2. Nozevit Plus	5	5 zajednica šećernim sirupom (1 : 1) + Nozevit-Plus u hranilici	500 ml šećernog sirupa (1 : 1) + 1 ml NozevitPlus	1., 10., 20. i 30. dana od početka pokusa
	4. BEEWELL AminoPlus	5	5 zajednica šećernim sirupom u hranilici (1 : 1) + BEEWELL AminoPlus	300 ml šećernog sirupa (1 : 1) + 0,35 ml BEEWELL AminoPlus (1 l šećernog sirupa (1 : 1) + 1ml BEEWELL AminoPlus podijeljeno na tri puta)	tijekom 3 uzastopna dana (1., 2., 3. dan) od početka pokusa, te ponovno nakon 10 dana (11., 12. 13. dan) od početka pokusa

mogenizirane ručnim homogenizatorom i sonikatorom (OmniSonicRuptor 400, Njemačka) u jednom ml sterilne vode u cilju dezintegracije njihove stanične građe. Koncentracija glukoze u uzorcima ličinki određivana je kolorimetrijski komercijalno dostupnim kompletom Glucose (HK) Assay Kit (Sigma, SAD) prilagođenom radu na mikrotitarskoj pločici, sukladno uputama proizvođača. U jažice je dodano 20 µl uzorka odnosno odgovarajuće otopine standarda (D-glukoza otopljena u 0,1 % benzoične kiseline) čemu je dodano 200 µl reagensa. Rezultati su očitani na spektrofotometru (Tecan Infinite, Njemačka) pri valnoj duljini od 340 nm.

Metoda po Lowryju za određivanje ukupnih bjelančevina se temelji na njihovoj reakciji s alkalnom otopinom bakar tartarata i Folinovim reagensom pri čemu nastaje kompleks plavog do ljubičastog obojenja. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je koncentraciji bjelančevina u otopini. Za određivanje koncentracije bjelančevina korišten je Protein Assay Kit (Bio-Rad, SAD) prilagođen radu na mikrotitarskoj pločici, sukladno uputama proizvođača. U jažice je dodano 5 µl uzorka odnosno odgovarajuće otopine standarda (otopine goveđeg serumskog albumina poznatih koncentracija) čemu je dodano 250 µl reagensa (25 µl alkalne otopine bakar tartarata i 200 µl Folinovog reagensa). Nakon 15 minuta rezultati su očitani na spektrofotometru (Tecan Infinite, Njemačka) pri valnoj duljini od 750 nm.

Određivanje ukupnog sadržaja masti u ličinkama obavljeno je plinskom kromatografijom. Ekstrakcija masti iz prethodno homogeniziranih ličinki (100 mg/ml fosfatnog pufera) izvedena je metodom po BLIGH i DYERU (1959.). Analiza ukupnih masnih kiselina izvršena je plinskim kromatografom Varian 450-GC opremljenim plamenim ionizacijskim detektorom. Stabilwax kolona (crossbond carbowax polietilen glikol, 60 m × 0,25 mm) je korištena kao stacionarna faza na podešenoj temperaturi s helijem kao nosećim plinom. Zagrijavanje je provedeno na temperaturi od 150 °C tijekom jedne minute, nakon čega je slijedilo povećanje od 5 °C/min do 250 °C. Metil esteri su identificirani u usporedbi s vremenima retencije izvornih uzoraka.

Izrada histoloških preparata za određivanje ukupnih masti u pčelinjim ličinkama

Za određivanje masti u pčelinjim ličinkama izrađeni su histološki preparati koji su obojeni Sudan Black B bojom, postupkom po Lisonu (ROMEIS, 1968.). Zamrznuti rezovi ličinki fiksirani su 15 minuta u 10 %-tnom formalinu, a potom držani sat vremena u 0,1 %-tnoj otopini Sudan Black B boje na sobnoj temperaturi. Tako fiksirani rezovi isprani

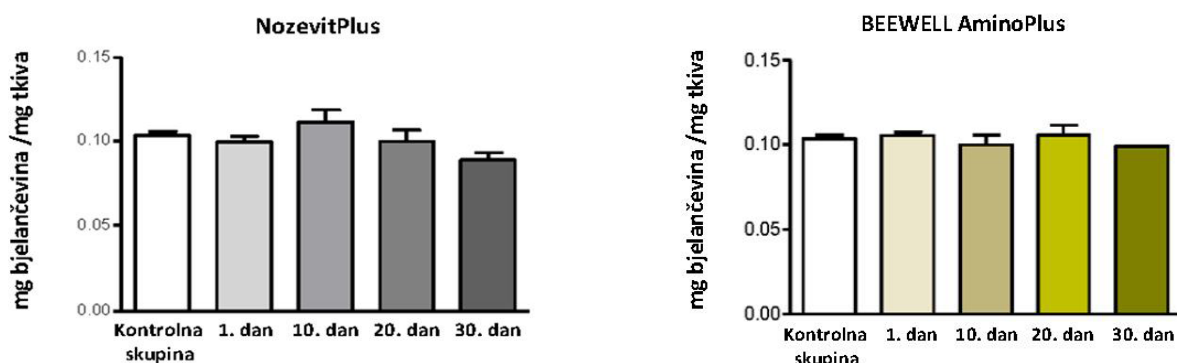
su u destiliranoj vodi i uklopljeni u glicerini želatinu. Nakon tretiranja rezova s otopinom Sudan Black B boje masti se oboje crno ili smeđe-crno. Uzorci ličinki fiksirani su u 10 %-tnom formalinu, uklopljeni u parafinske blokove te izrezani na 10 µm tanke rezove. Nakon deparafiniranja u ksilolu i padajućim koncentracijama etanola, odmašćeni rezovi bojeni su: hematoksilinom i eozinom, alcianskim modrilom (AB, pH = 1,0), alcianskim modrilom (AB, pH = 2,5), toluidinskim modrilom (TB) i Periodic acid-Schiff (PAS) metodom u cilju utvrđivanja prisutnosti i distribucije mukopolisaharida te aktivnosti proteolitičkog enzima LAP prema metodi HRAPCHAK i SHEEHAN (1980.). Uzorci su na kraju isprani destiliranom vodom, dehidrirani, te uklopljeni u kanadski balzam. PAS metoda koristi se za određivanje prisutnosti i lokalizaciju neutralnih mukopolisaharida, mukoproteina, glukoproteina i sl. Odmašćeni rezovi ličinki držani su pet minuta u 0,5 %-tnoj perjodnoj kiselini, isprani i bojeni 15 – 20 minuta Schiff-ovim reagensom na sobnoj temperaturi. Bazični fuksin koji se veže na polisaharide i mukopolisaharide daje tamno plavo do purpurno obojenje, dok se jezgre boje plavo. Mjesta aktivnosti enzima LAP na preparatima boje se crveno. Mjesta jače aktivnosti enzima LAP boje se tamnije, dok se mjesta slabije aktivnosti boje svjetlijom nijansom crvene boje. Jačina enzimatske reakcije opisivana je stupnjevima: nema enzimatske reakcije, slaba reakcija, umjerena reakcija i jaka enzimatska reakcija. Mikroskopski pregled histoloških preparata obavljan je pomoću svjetlosnog mikroskopa Olympus BX41 pod povećanjem 10 do 40 puta, a histološki preparati fotografirani su pomoću kamere OLYMPUS DP12 U-TVO.

REZULTATI I RASPRAVA

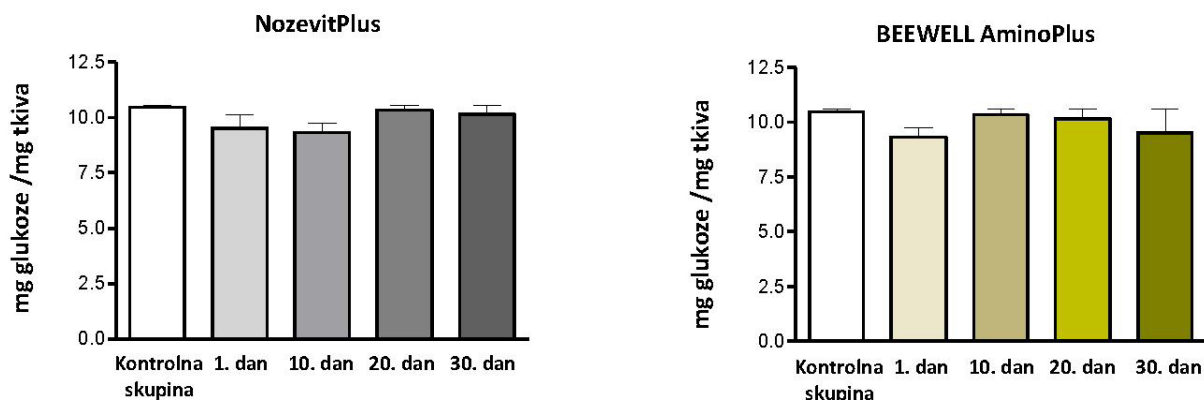
Grafikonom 1. prikazan je utjecaj prihranjivanja zajednica različitim dodatcima hrani za pčele na koncentraciju ukupnih bjelančevina u tkivu pčelinjih ličinki. Srednje vrijednosti koncentracija ukupnih bjelančevina u pčelinjim ličinkama podrijetlom iz zajednica prihranjivanih šećernim sirupom s različitim dodatcima hrani iznosili su (mg/mg tkiva pčelinje ličinke): NozevitPlus 0,094 – 0,137 i BEEWELL AminoPlus 0,087 – 0,114. Između pokusnih i kontrolnih skupina nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p > 0.05$). Međutim, kod ličinki pčelinjih zajednica prihranjivanih dodatkom hrani NozevitPlus je 30. dana od početka prihranjivanja uočen pad koncentracije ukupnih bjelančevina u odnosu na 10. i 20. dan. U tkivu pčelinjih ličinki iz zajednica prihranjivanih s dodatkom hrani BEEWELL AminoPlus nisu utvrđene značajne promjene u koncentraciji ukupnih bjelančevina. Grafikon 2. prikazuje utjecaj prihranjivanja zajednica istraživanim dodatcima

hrani za pčele na koncentraciju glukoze u tkivu pčelinjih ličinki u dobi šest do deset dana. Srednje vrijednosti koncentracija glukoze u pčelinjim ličinkama podrijetlom iz zajednica prihranjivanih šećernim sirupom s različitim dodatcima hrani iznosili su (mg/mg tkiva ličinke): NozevitPlus 9,25 – 10,58 i BEEWELL AminoPlus 9,12 – 10,13. Između pokusnih i kontrolnih skupina nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p > 0.05$) u koncentraciji glukoze, iako je kod ličinki pčelinjih zajednica prihranjivanih šećernim sirupom s dodatkom hrani NozevitPlus 30. dana od početka prihranjivanja utvrđen blagi porast koncentracije

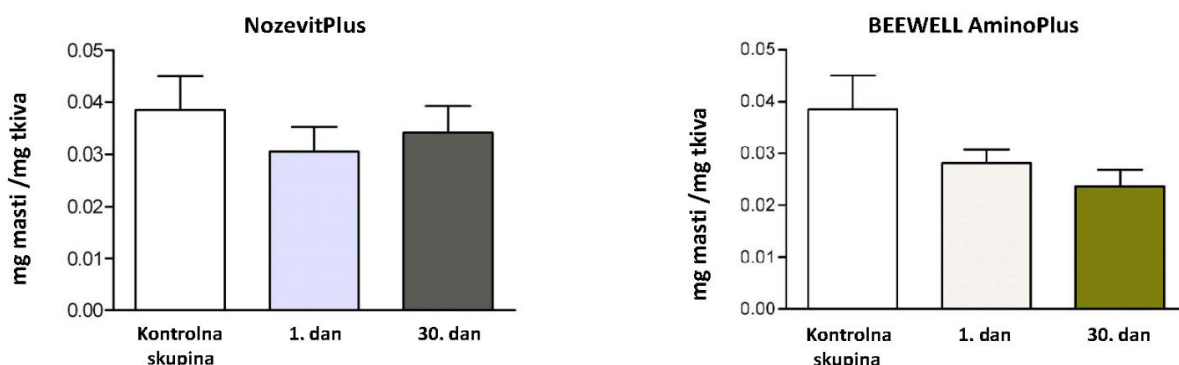
u odnosu na 1., 10. i 20. dan. U tkivu pčelinjih ličinki iz zajednica prihranjivanih s dodatkom hrani BEEWELL AminoPlus nisu utvrđene značajne varijacije u koncentraciji glukoze. Na Grafikonu 3. prikazan je utjecaj prihranjivanja zajednica različitim dodatcima hrani za pčele na koncentraciju masti. Srednje vrijednosti koncentracija masti u pčelinjim ličinkama podrijetlom iz prihranjivanih zajednica iznosili su (mg/mg tkiva ličinke): NozevitPlus 0,031 – 0,034; BEEWELL AminoPlus 0,023 – 0,028. Između pokusnih i kontrolnih skupina nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p > 0.05$) u koncentraciji masti.



Grafikon 1. Koncentracije ukupnih bjelančevina u tkivu pčelinjih ličinki podrijetlom iz zajednica prihranjivanih šećernim sirupom s i bez dodataka hrani NozevitPlus i BEEWELL AminoPlus.

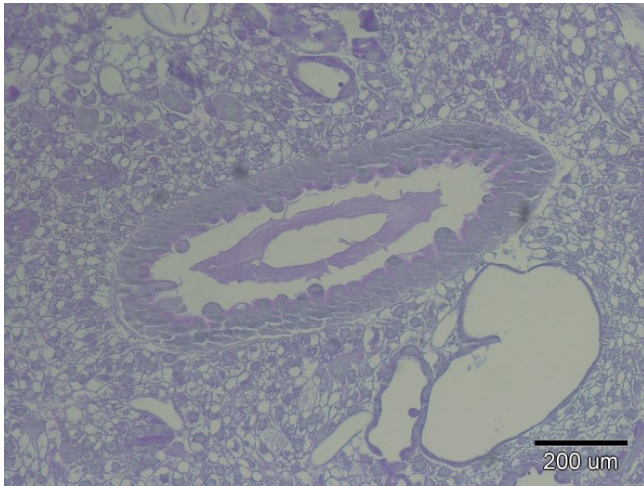


Grafikon 2. Koncentracije glukoze u tkivu pčelinjih ličinki podrijetlom iz zajednica prihranjivanih šećernim sirupom s i bez dodataka hrani NozevitPlus i BEEWELL AminoPlus.

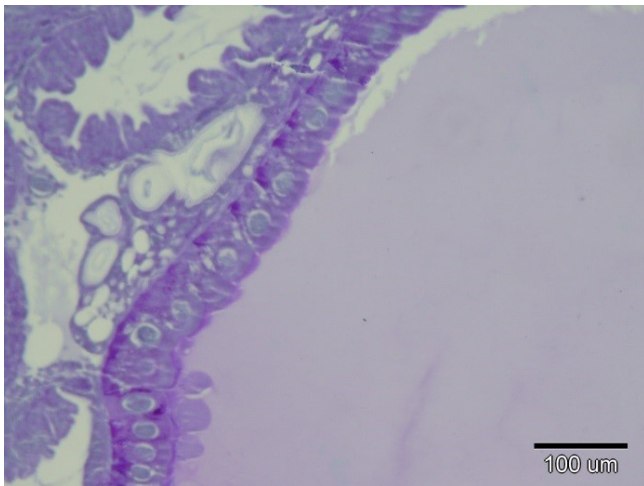


Grafikon 3. Koncentracije masti u tkivu pčelinjih ličinki podrijetlom iz zajednica prihranjivanih šećernim sirupom s i bez dodataka hrani NozevitPlus i BEEWELL AminoPlus.

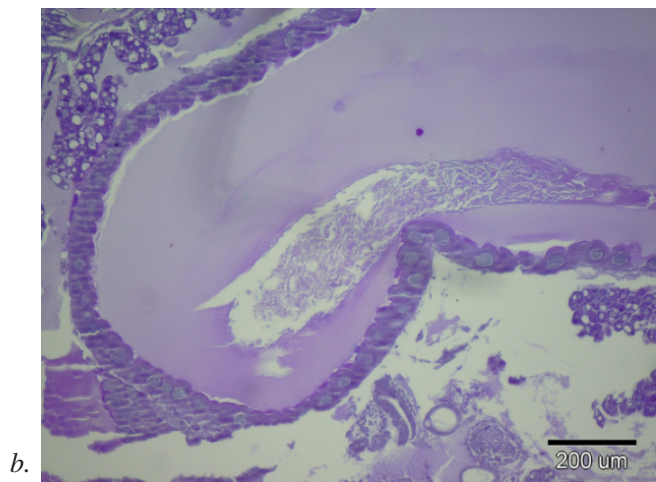
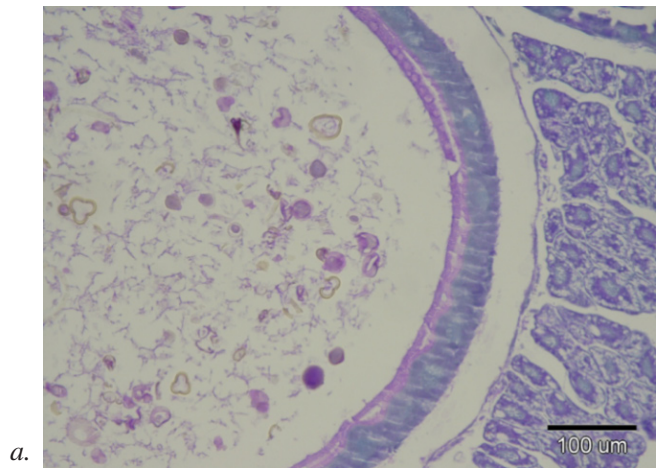
U usporedbi s presjekom pčelinjih ličinki iz netretiranih zajednica (Slika 1.), histokemijskom analizom preparata presjeka ličinki podrijetlom iz zajednica prihranjivanih šećernim sirupom s dodatcima hrani utvrđena je pojačana pozitivna PAS reakcija (Slika 2. – 3.). Pri tome je kod pčelinjih ličinki podrijetlom iz svih pokusnih skupina reakcija izražena u cjelokupnom presjeku epitelnog sloja crijeva, a reakcija se primjenom različitih dodataka hrani pojačava sljedećim redoslijedom: NozevitPlus < BEEWELL AminoPlus.



Slika 1. Presjek pčelinje ličinke podrijetlom iz zajednice prihranjivane šećernim sirupom bez dodatka hrani; PAS.



Slika 2. Presjek pčelinje ličinke podrijetlom iz zajednice prihranjivane šećernim sirupom s dodatkom hrani NozevitPlus; PAS.



Slika 3. a, b. Presjek pčelinje ličinke podrijetlom iz zajednice prihranjivane šećernim sirupom s dodatkom hrani BEEWELL AminoPlus; PAS.

Prisutnost i distribucija masnih kapljica na presjeku pčelinjih ličinki podrijetlom iz kontrolnih i pokusnih skupina je pozitivna i jednakomjerno raspoređena bez značajnije razlike između pojedinih skupina. Međutim, kod pčelinjih ličinki iz zajednica pokusnih skupina masne kapljice su međusobno neznatno razmaknute u odnosu na ličinke iz zajednica prihranjivanih šećernim sirupom bez dodatka hrani na presjeku kojih su masti kompaktnije raspoređene.

Tijekom istraživanja između pokusnih i kontrolnih skupina pčelinjih zajednica nisu utvrđene statistički značajne razlike ($p > 0.05$) u koncentracijama ukupnih bjelančevina, glukoze i masti. Koncentracija ukupnih bjelančevina se značajno povećava i izravno je povezana s razvojem kukuljice u stadiju kukuljice (MOGHADAM i sur., 2011.), pa dobiveni rezultati za mlađe pčelinje leglo u dobi šest do deset dana tijekom prihranjivanja šećernim sirupom s i bez dodatka hrani nisu iznenađujući. Koncentracija glukoze, trehaloze i fruktoze u organizmu medonosne pčele mogu značajno varirati (LETA i sur., 1996.), a što uglavnom ovisi o istodobnom utjecaju više čimbenika poput razlike

u prehrani tijekom aktivne pčelarske sezone, brzini metabolizma, određenim fiziološkim promjenama i klimatsko-okolišnim uvjetima (BLATT i ROCES, 2001.). Za odrasle pčele je poznato da im se prelaskom s kućnih zadataka na poslove skupljačica smanjuju koncentracije ukupnih masti u organizmu (TOTH i ROBINSON, 2005.), a povećava se količina uskladištenog glikogena u prsištu. Tome idu u prilog i rezultati istraživanja kojima je utvrđeno da skupljačice sadrže značajno manje masti od kućnih pčela, te je zato nemoguć povratak skupljačica na učinkovito obavljanje kućnog zadatka njege pčelinjeg legla, odnosno razlike u količini ukupnih masti u organizmu medonosne pčele usko su povezani s redosljedom obavljanja pojedinih zadataka pčela (TOTH i ROBINSON, 2005.). Na srednjem crijevu presjeka pčelinjih ličinki nakon uklapanja u histološke preparate vidljiv je jednostanični sloj epitelnih stanica smješten uzduž bazalne membrane. S vanjske strane bazalna membrana okružena je unutarnjim cirkularnim i vanjskim longitudinalnim mišićnim slojem. Epitel se sastoji od cilindričnih stanica od kojih svaka stanica sadrži relativno veliku jezgru i citoplazmu koja se boji jako bazofilno. Između epitelnih stanica smještene su nakupine malih regenerativnih stanica. Površina epitela prema lumenu prekrivena poprečnoprugastim raboriumom i mikrovilima. Ti mikrovili odnosno resice imaju zaštitnu

ulogu s unutarnje strane crijeva te povećavaju apsorpcijsku površinu stanica, a prostori između mikrovila djeluju poput sita. Dodatnu zaštitu od grubih čestica hrane čine peritrofna membrana koja okružuje sadržaj u lumenu crijeva (CHAPMAN, 2013.).

U srednjem crijevu ličinki pčela prihranjivanih šećernim sirupom bez dodataka hrani, ali i šećernim sirupom s dodatcima hrani nisu uočene histopatološke promjene poput izduživanja, vakuolizacije ili nekroze epitelnih stanica, pucanja njihovih stijenki, propadanja mišićnog sloja ili regenerativnih stanica te odvajanje bazalne membrane od epitelnog sloja što bi moglo ukazivati na toksičan učinak primjene navedenih dodataka hrani. Pojava pojedinačnih vakuola na histološkim preparatima moguća su posljedica izduljivanja stanica ili viška nakupljenih masnih kapljica otopljenih tijekom fiksacije i dehidracije preparata. Izostanak degenerativnih promjena i litičkih procesa unutar epitelnih stanica na histološkim preparatima crijeva ličinki u skladu su s dosadašnjim spoznajama da je nozemoza tipa C bolest odraslih pčela. Usprkos činjenici da su EIRI i suradnici (2015.) uspješno invadirali trodnevne in vitro uzgojene ličinke europske medonosne pčele sporama *N. ceranae* za sada nema uvjerljivog dokaza o pojavnosti ove bolesti kod pčelinjeg legla.

ZAKLJUČCI

Između srednjih vrijednosti pojedinih pokazatelja utvrđenog biokemijskog profila pčelinjih ličinaka tijekom prihranjivanja dodatcima hrani za pčele NozevitPlus i BEEWELL AminoPlus pokusnih pčelinjih zajednica nije utvrđena statistički značajna razlika, kao ni između utvrđenih vrijednosti za kontrolne i pokusne pčelinje zajednice.

U crijevu pčelinjih ličinki podrijetlom iz prihranjivanih zajednica šećernim sirupom s dodatcima hrani nisu uočene nikakve histopatološke promjene koje bi mogle ukazivati na toksičnost primijenjenih dodataka hrani za pčele.

ZAHVALA

Istraživanje je sufinancirano od Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (VIP Projekt 2013-12-62), te Bilateralnog CRO-SLO znanstvenoistraživačkog projekta 2016-2017.

LITERATURA

- AKYOL, E., H. YENINAR, N. ŞAHINLER, A. GÜLER (2006): The effects of additive feeding and feed additives before wintering on honey bee colony performances, wintering abilities and survival rates at the East Mediterranean Region. *Pak. J. Biol. Sci.* 9, 589–592.
- ANTÚNEZ, K., R. MARTÍN-HERNÁNDEZ, L. PRIETO, A. MEANA, A. ZUNINO, M. HIGES (2009): Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ. Microbiol.* 11, 9, 2284–2290.
- ASHOK, P. K., K. UPADHYAYA (2012): Tannins are astringent. *J. Pharm. Phytochem.* 1, 45–50.
- BLATT, J., F. ROCES (2001): Haemolymph sugar levels in foraging honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on metabolic rate and in vivo measurement of maximal rates of trehalose synthesis. *J. Experiment. Biol.* 204, 2709–2716.
- BLYTH, E. G., W. J. DYER (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- CHAPMAN, R. F. (2013): The insects: structure and function. New York, Cambridge University Press.
- EIRI, D. M., G. SUWANNAPONG, M. ENDLER, J. C. NIEH (2015): *Nosema ceranae* Can Infect Honey Bee Larvae and Reduces Subsequent Adult Longevity. *PLoS ONE* 10, 5, e0126330. doi:10.1371/journal.pone.0126330.
- HIGES, M., A. MEANA, C. BARTOLOMÉ, C. BOTÍAS, R. MARTÍN-HERNÁNDEZ (2013): *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 1, 17–29.
- HIGES, M., MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., MARTÍNEZ-SALVADOR, A., GARRIDO-BAILÓN, E., GONZÁLEZ-PORTO, A. V., MEANA, A. (2010b): A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Env. Microbiol. Rep.* 2, 2, 243–250.
- HIGES, M., P. GARCÍA-PALENCIA, R. MARTÍN-HERNÁNDEZ, A. MEANA (2007): Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with the *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invertebr. Pathol.* 94, 3, 211–217.
- HIGES, M., R. MARTÍN-HERNÁNDEZ, A. MEANA (2010a): *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392.
- HRAPCHAK, B. B., D. C. SHEEHAN (1980): Enzyme Histochemistry. U: Theory and Practice of Histotechnology, Mosby, St. Louis, 304–305.
- HUANG, W. F., L. F. SOLTER, P. M. YAU, B. S. IMAI (2013): *Nosema ceranae* Escapes Fumagillin Control in Honey Bees. *PLoS Pathog.* 9, 3, e1003185. doi: 10.1371/journal.ppat.1003185.
- LETA, M. A., C. GILBERT, R. A. MORSE (1996): Levels of hemolymph sugars and body glycogen of honeybees (*Apis mellifera* L.) from colonies preparing to swarm. *J. Insect Physiol.* 42, 239–245.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., A. MEANA, L. PRIETO, A. MARTINEZ SALVADOR, E. GARRIDO-BAILÓN, M. HIGES (2007): Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microb.* 73, 20, 6331–6338.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., A. MEANA, P. GARCÍA-PALENCIA, P. MARIN, C. BOTÍAS, E. GARRIDO-BAILÓN, L. BARRIOS, M. HIGES (2009): Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Appl. Environ. Microb.* 75, 8, 2554–2557.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R., C. BOTÍAS, L. BARRIOS, A. MARTÍNEZ-SALVADOR, A. MEANA, C. MAYACK, M. HIGES (2011): Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitol. Res.* 109, 3, 605–612.
- MAYACK, C., D. NAUG (2010): Parasitic infection leads to decline in haemolymph sugar levels in honeybee foragers. *J. Insect Physiol.* 56, 11, 1572–1575.
- MOGHADAM, E. B., H. IZADI, M. A. SAMIH, S. MOHARRAMIPOUR, K. MAHDAIN (2011): Effect of insect growth regulators, temperature and overwintering on larvae of pistachio leaf white borer (*Ocneria terebinthina*). *Int. J. Agric. Biol.* 13, 375–380.
- POTTS, S. G., J. C. BIESMEIJER, C. KREMEN, P. NEUMANN, O. SCHWEIGER, W. E. KUNIN (2010): Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–53.
- ROMEIS, B. (1968): Mikroskopische technik. R. Oldenbourg Verlag. München, Wien.
- TOTH, A. L., G. E. ROBINSON (2005): Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Anim. Behaviour* 69, 427–435.
- WILLIAMS, G. R., D. SHUTLER, K. L. BURGER-MacLELLAN, R. E. L. ROGERS (2014): Intra-population and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. *PLoS ONE* 9, 7, e99465. doi:10.1371/journal.pone.0099465.

SPONZORJI



ČEBELARSTVO RIHAR - KOCJAN
Robert Kocjan s.p.
Gabrje 42, 1356 Dobrova
Tel.: 01 36 41 106, faks: 01 36 41 307
GSM: 031 351 964
robineli@siol.net
www.rihar-kocjan.si



BOŽNAR
HIŠA MEDU

Božnar d.o.o.
Polhov Gradec 72
1355 Polhov Gradec
Tel.: 01 364 00 20, faks: 01 364 00 25
info@boznar.si
www.boznar.si



VETCONSULT PHARMA d.o.o.

VETCONSULT PHARMA d.o.o.
Gerbičeva ulica 50
1000 Ljubljana
Tel.: 080 13 15, faks: 01 283 26 45
info@vet4you.com
www.vet4you.com



Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije

Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije
Gospodinjska ulica 6
1000 Ljubljana
kgzs@kgzs.si
www.kgzs.si