

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO

VPLIV PREHRANSKIH DODATKOV NA
ŠTEVILČNOST SPOR MIKROSPORIDIJA *NOSEMA* SP.
IN DOLGOŽIVOST KRANJSKE ČEBELE (*APIS*
MELLIFERA CARNICA)

NASTJA ROM

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

**Vpliv prehranskih dodatkov na številčnost spor mikrosporidija
Nosema sp. in dolgoživost kranjske čebele (*Apis mellifera
carnica*)**

(Effect of dietary supplements on spore abundance of microsporidia *Nosema*
sp. and longevity of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica*))

Ime in priimek: Nastja Rom

Študijski program: Varstvo narave, 2. stopnja

Mentor: doc. dr. Janez Prešern

Somentorica: asist. Felicita Urzi

Koper, junij 2020

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Nastja ROM

Naslov magistrskega dela: Vpliv prehranskih dodatkov na prisotnost mikrosporidija *Nosema* sp. in dolgoživost kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*)

Kraj: Koper

Leto: 2020

Število listov: 59

Število slik: 23

Število tabel: 7

Število referenc: 180

Mentor: doc. dr. Janez Prešern

Somentorica: asist. Felicita Urzi

UDK: 593.195:638.12(043.2)

Ključne besede: *Apis mellifera carnica*, *Nosema* spp., prehranski dodatki, življenjska doba čebel, hipofaringealne žleze

Izvleček:

Komercialni prehranski dodatki za čebele se oglašujejo kot koristni za zdravje čebel, saj naj bi zagotavljali uravnoteženo prehrano ter izboljšali delovanje imunskega sistema. V resnici je njihov učinek redko preučen in preverjen. Namen dela je bil oceniti učinke izbranih prehranskih dodatkov. Ugotavljali smo vpliv dveh prehranskih dodatkov in cvetnega prahu na razvoj spor mikrosporidija *Nosema* sp. in dolgoživost delavk medonosne čebele vrste *Apis mellifera carnica*. Izbrana dodatka naj bi preprečevala razvoj mikrosporidija *Nosema* sp. Namen naloge je bil verifikacija teh trditev v primerjavi s cvetnim prahom. Poskus smo izvedli s po 30 čebelami na kletko. Uporabili smo dva komercialna prehranska dodatka, in sicer pogačo s pelodom in kontrolno sladkorno pogačo. Kletke so bile razdeljene v 4 x 2 skupini (pet ponovitev): v prvi skupini so bile čebele inokulirane s sporami mikrosporidija, v drugi so v času inokulacije dobile le sladkorno raztopino. Inokulacijo smo izvedli tretji dan, ko smo z mikropipeto individualno okužili čebele s sporami. Dnevno smo spremljali količino zaužite hrane in na dneve vzorčenja odvzeli po 2 čebeli za analize. Ugotovili smo, da je bila največja stopnja okuženosti pri skupini, hranjeni s cvetnim prahom, te čebele so tudi najdlje živele. Prehranska dodatka ne preprečujeta razvoja mikrosporidija in ne pomagata v boju proti nose mavosti. Njihovo delovanje se je izkazalo kot negativno, saj so čebele hitreje odmirale. Na zdravje delavk in razvoj hipofaringealnih žlez najbolj vpliva cvetni prah, ki ga nabirajo v naravi, vendar pa pozitivno vpliva tudi na rast in razvoj mikrosporidija.

Key words documentation

Name and SURNAME: Nastja ROM

Title of the thesis: Effect of dietary supplements on spore abundance of microsporidia *Nosema* sp. and longevity of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica*)

Place: Koper

Year: 2020

Number of pages: 59

Number of figures: 23

Number of tables: 7

Number of references: 180

Mentor: Assist. Prof. Janez Prešern, PhD

Co-Mentor: Assist. Felicita Urzi

UDC: 593.195:638.12(043.2)

Keywords: *Apis mellifera carnica*, *Nosema* spp., dietary supplements, longevity of bees, hypopharyngeal glands

Abstract:

Commercial dietary supplements for honeybees are touted as beneficial for bee health, as they are intended to provide a balanced diet and improve the functioning of the immune system. In reality, their impact is rarely examined and verified. The purpose of the thesis was to evaluate the effects of selected dietary supplements. The aim of the investigation was to determine the influence of two dietary supplements and pollen on the development of spores of microsporidium *Nosema* sp. and longevity of the individuals of honeybee species *Apis mellifera carnica*. The selected supplements are expected to prevent the development of microsporidium *Nosema* sp. The aim of the thesis of the work was to verify these claims in comparison to pollen. The experiment was performed with 30 bees per cage. We used two commercial dietary supplements, pollen paste and control sugar paste. The cages were divided into 4 x 2 groups (five replicates): in the first group, the bees were inoculated with microsporidium spores and in the second group, they received only sugar solution at the time of inoculation. The inoculation was performed on the third day, when the bees were individually infected with spores using a micropipette. The amount of food consumed was monitored daily, and two bees were collected for sampling on sampling days. We discovered that the highest rate of infection was in the group fed with pollen; however, these bees also lived the longest. Dietary supplements do not prevent the development of microsporidia and do not help in the fight against nosemosis. Their activity proved to be negative as the worker bees died faster. The health of worker bees and the development of the hypopharyngeal glands are best influenced by pollen collected in nature, but however it also has a positive effect on the growth and development of microsporidium.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	PREGLED OBJAV	1
1.1.1	Prehrana in prehranske potrebe čebel.....	1
1.1.2	Prebavna pot in prebavila pri čebeli.....	3
1.1.3	Anatomija in fiziologija srednjega črevesa.....	5
1.1.4	Imunski sistem	5
1.1.5	Patologija srednjega črevesa.....	7
1.1.6	<i>Nosema</i> spp. in nose mavost	7
1.1.7	Hipofaringealne ali goltne žleze	13
1.2	NAMEN IN CILJI.....	13
1.3	DELOVNE HIPOTEZE	14
2	MATERIAL IN METODE	15
2.1	PREDHODNI PRESEJALNI PREGLED ČEBELJIH DRUŽIN NA PRISOTNOST SPOR MIKROSPORIDIJA <i>NOSEMA</i> SP.....	17
2.2	PRIPRAVA KONCENTRACIJE SPOR <i>NOSEMA</i> SP. ZA INOKULACIJO ČEBEL <i>PER OS</i>	17
2.3	POTEK POSKUSA.....	18
2.4	SEKCIJA HIPOFARINGEALNIH (GOLTNIH) ŽLEZ.....	19
2.5	PREHRANSKA ANALIZA	22
2.6	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV POSAMEZNIH PARAMETROV	22
3	REZULTATI.....	23
3.1	SMRTNOST ČEBEL PRI RAZLIČNIH SKUPINAH	23
3.2	PRISOTNOST SPOR <i>NOSEMA</i> SP. V ČREVESJU ČEBEL.....	24
3.3	MORFOLOŠKE MERITVE HIPOFARINGEALNIH ŽLEZ.....	27
3.4	PORABA HRANE.....	31
3.5	ANALIZA KRME.....	33
4	DISKUSIJA.....	35
4.1	SMRTNOST ČEBEL PRI RAZLIČNIH SKUPINAH	35
4.2	PRISOTNOST SPOR <i>NOSEMA</i> SP. V ČREVESJU ČEBEL.....	35

4.3	MORFOLOŠKE MERITVE HIPOFARINGEALNIH ŽLEZ	38
4.4	PREHRANA.....	39
5	SKLEPI.....	42
6	LITERATURA IN VIRI.....	44

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Shema protokola poskusa, junij – julij 2019.....	18
Preglednica 2: Prikaz starosti čebel (dni) na določeno vzorčenje.....	23
Preglednica 3: P-vrednost primerjave števila spor nosome neinokuliranih skupin za vsako testno skupino s kontrolo, za vsa vzorčenja.....	25
Preglednica 4: P-vrednost števila spor nosome med inokuliranimi in neinokuliranimi skupinami za vsako vzorčenje.....	26
Preglednica 5: P-vrednost primerjave premerov goltnih žlez med inokuliranimi in neinokuliranimi skupinami za vsako vzorčenje.	31
Preglednica 6: Weendska analiza z vrednostmi vsebovane vlage, surovih beljakovin, surovih vlaknin, surovega pepela in surovih maščob ter izračunani brezdušični izvleček.	33
Preglednica 7: Vsebnost aminokislin (AK) v posameznem dodatku in nujna minimalna vrednost esencialnih aminokislin (EAK - odebeljeno) od skupnih aminokislin (DeGroot 1953) v prehrani čebel (%).	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Čebelja glava z iztegnjenim sesalnim aparatom.....	4
Slika 2: Prebavila čebele delavke.	5
Slika 3: Vzorec srednjega črevesa s sporami <i>Nosema</i> sp. na hemocitometru pod 200x povečavo.....	9
Slika 4: Vzorec srednjega črevesa s sporami <i>Nosema</i> sp. pri starosti 27 dni (5. vzorčenje), skupina hranjena s cvetnim prahom in okužena s sporami pod 200x povečavo.	10
Slika 5: Življenjski krog <i>N. apis</i> , ki povzroča čebeljo grižo oz. nosemozo.	11
Slika 6: Čebele delavke v poskusni kletki.....	16
Slika 7: Individualno hranjenje čebele z mikropipeto.	19
Slika 8: Fiksacija glave s pomočjo entomoloških igel in odstranitev obraznega hitina, pod katerim so vidne goltne žleze. 40x povečava.	20
Slika 9: Goltne žleze čebele iz skupine, hranjene s cvetnim prahom pri starosti 17 dni.	21
Slika 10: Goltne žleze čebele iz kontrolne skupine pri starosti 17 dni.	21
Slika 11: Kaplan-Meierjeva krivulja ali krivulja preživetja v deležih.....	23
Slika 12: Razvoj spor <i>Nosema</i> sp. pri testnih čebelah.	24
Slika 13: Razvoj spor <i>Nosema</i> sp. pri mrtvicah testnih čebel.	26
Slika 14: Pregledni prikaz povprečja premerov acinusov goltnih žlez.....	27
Slika 15: Premeri acinusov goltnih žlez pri starosti 7 dni (1. vzorčenje), ko še ni bilo zaznanih spor <i>Nosema</i> sp. pri neokuženih čebelah.	28
Slika 16: Premeri acinusov goltnih žlez pri starosti 12 dni (2. vzorčenje).....	29
Slika 17: Premeri acinusov goltnih žlez pri starosti 17 dni (3. vzorčenje).....	29
Slika 18: Premeri acinusov goltnih žlez pri starosti 22 dni (4. vzorčenje).....	30
Slika 19: Premeri acinusov goltnih žlez pri starosti 27 dni (5. vzorčenje).....	30
Slika 20: Povprečna poraba hrane, preračunana na eno čebelo.....	32
Slika 21: Povprečna poraba hrane na čebelo normalizirana na porabo do 1. vzorčenja.....	32
Slika 22: Test izhlapevanja vode iz cvetnega prahu (CVP) in prehranskega dodatka Bees Vita plus® (BV) po dnevih.	33
Slika 23: Vsebnost esencialnih aminokislin v Bees Vita plus®, Bees Strong® in cvetnemu prahu v primerjavi s podatki iz literature (De Groot 1953).....	34

SEZNAM KRATIC

AK	Aminokislina
AMP	Antimikrobni peptidi
ATP	Adenozin trifosfat
BS	Bees-Stong [®]
BSN	Bees-Stong [®] + nosema
BV	Bees Vita plus [®]
BVN	Bees Vita plus [®] + nosema
CO₂	Ogljikov dioksid
CVP	Cvetni prah
CVPN	Cvetni prah + nosema
EAK	Esencialne aminokislina
HPG	Hipofaringealne (goltne) žleze
K	Kontrola
KN	Kontrola + nosema
LPS	Lipopolisaharidi
MW	Mann-Whitneyev U test
PCR	Polimerazna verižna reakcija
PO	Fenoloksidaza
ProPO	Profenoloksidaza
PVC	Polivinil klorid
P-vrednost	Statistična značilnost

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Janezu Prešernu, da me je sprejel pod svoje okrilje in mi pomagal pri izdelavi magistrskega dela. Hvala za vso pomoč, strokovne nasvete in vzpodbudne besede, ko ni šlo vse tako, kot bi moralo iti.

Hvala Jerneju Bubničju za vso pomoč pri terenskem in laboratorijskem delu, za vse ideje in komentarje, ki so izboljšali magistrsko delo.

Obema se zahvaljujem, da sta mi bila vedno na razpolago s predlogi in nasveti in sta me vodila skozi celoten proces nastajanja magistrskega dela.

Prav tako se zahvaljujem Davidu Kozamerniku in Špeli Zarnik za pomoč pri mukotrpnem individualnem okuževanju čebel z nosemo ter nenazadnje Maji Smodiš Škerl, s katero sva zasnovali poskus in hvala za dovoljenje za uporabo slike spor noseme pod mikroskopom.

Hvala celotni skupini čebelarjev na Kmetijskem inštitutu Slovenije, da ste me sprejeli medse in mi kakorkoli pomagali. Hvala za vse znanje, ki sem ga pridobila od vas, in za dobro družbo.

Zahvaljujem se svojim staršem in starim staršem, ki so mi omogočili študij ter me podpirali in vzpodbujali med študijem. Zahvala gre tudi sorodnici, pri kateri sem lahko stanovala v času izvedbe praktičnega dela magistrske naloge v Ljubljani.

Hvala vsem prijateljem, ki ste mi pri izdelavi magistrskega dela kakorkoli pomagali in hvala za vse vzpodbudne besede.

1 UVOD

1.1 PREGLED OBJAV

1.1.1 Prehrana in prehranske potrebe čebel

Čebelja družina pridobiva potrebne hranilne snovi za energijo, optimalen razvoj, razmnoževanje in produkcijo iz cvetnega prahu in nektarja, ki jih pašne čebele nabirajo na raznolikih medovitih rastlinah (Decourtye in sod. 2010).

Nektar je primarni vir ogljikovih hidratov, kjer pridobivajo večino energije, lahko pa vsebuje tudi nekatere lipide in aminokislino (Nicolson 2011). Encimi hipofaringealnih žlez se primešajo nektarju v satju, predvsem diastaza, invertaza in glukoza oksidaza. Ti encimi katalizirajo razgradnjo sladkorjev v enostavne oblike, ki so čebelam lahko prebavljive in varujejo shranjen med pred bakterijami (Winston 1987).

Cvetni prah je edini vir proteinov. Vsebuje jih od 6 do 28%, odvisno od rastlinske vrste (Winston 1987). Je tudi vir lipidov, sterolov, vitaminov, mineralov in nekaterih ogljikovih hidratov (Nicolson 2011), potrebnih za fiziološke procese, kot so vzreja zalege, rast, opravljanje nalog v čebelji družini in vzpostavitev ter delovanje imunskega sistema posameznih osebkov (Alaux in sod. 2010). Beljakovine so v presnovi vir aminokislin, nujno potrebnih za sintezo organizmu lastnih beljakovin, ki opravljajo najrazličnejše funkcije, med drugim tudi tvorijo beljakovine (protitelesa), ki kot del imunskega odgovora prepoznajo antigene (Wu 2010). Za čebelji razvoj je esencialnih naslednjih deset aminokislin: arginin, histidin, lizin, triptofan, fenilalanin, metionin, treonin, leucin, izoleucin in valin, največje potrebe so po izoleucinu, leucinu in valinu, najmanjše po triptofanu, metioninu in histidinu in srednje po treoninu, fenilalaninu, argininu in lizinu. Medtem ko so tirozin, cistein, serin, hidroksiprolin, alanin, glicin in prolin neesencialne aminokislino (De Groot 1953).

Čebele so socialne žuželke, ki živijo v združbah, imenovanih tudi super-organizem (Seeley 1989). Prehrana je specifična za vsak posamezen nivo njihove združbe: prehrana v družini, prehrana odraslih čebel in prehrana ličink, prav tako imajo specifične potrebe po hranilih matica, troti in čebele delavke tudi glede na njihovo starost (Hrassnigg in Crailsheim 2005). Nekvalitetne zaloge cvetnega prahu lahko čebele krmilke ovirajo pri pravilnem hranjenju ličink. Posledično se to pozna na zdravju in številu čebel v naslednji generaciji, kar pa vpliva na manj intenzivno vzrejo zalege in posledično nižjo številčnost zalege (Crailsheim 1991). Zdrava družina zajema veliko zdravih in dobro prehranih osebkov, ki so sposobni vzrejeti zalego in se braniti pred stresnimi dejavniki, kot so zajedavci, okužbe, insekticidi in brezpašna obdobja (Brodtschneider in Crailsheim 2010). Za ličinke in odrasle osebe predstavljata nektar in cvetni prah osnovno prehrano, oboje pa nabirajo pašne čebele na raznolikih medovitih rastlinah (Decourtye in sod. 2010). Pašne čebele so delavke, stare vsaj 21 dni, ki začno opravljati naloge izven panja, kot so nabiranje cvetnega prahu, nektarja,

vode in smol (Huang in Robinson 1996). Poleg teh nalog so tudi izredno pomembne oprashaške kulturnih in avtohtonih rastlin (Goblirsch in sod. 2013). Za naloge izven panja imajo bolj razvito krilno mišičje od mlajših čebel, ki delajo v panju, kar je potrebno za dolge polete z dodatnim tovorom (Correa-Fernandez in Cruz-Landim 2010).

Pri ličinkah ženskega spola so pomembni količina in kakovost hrane ter tip satne celice, v kateri je jajčece, saj to odloča o tem, ali se bo razvila v delavko ali matico. Hrano ličinke delavke v prvih dveh dneh razvoja sestavljata bistri del (60 - 80%), ki vsebuje izloček hipofaringealnih žlez čebel krmilk, pomešan z medom, prebavnimi encimi in vodo, ter mlečni del (20 - 40%), ki vsebuje izloček mandibularne žleze z dodatkom izločka hipofaringealne žleze. Tretji dan prevladuje izloček hipofaringealne žleze, zmanjša se količina izločka mandibularne žleze, poveča pa se delež cvetnega prahu in medu, ki predstavljata rumeni del. Peti dan prevladuje cvetni prah. Če v naravi ni zadosti kakovostnih virov hrane, se pojavljajo razvojne motnje pri zalegi (Gregorc 2008). Za vzrejo ene ličinke je potrebno 25 – 37,5 mg proteinov oz. 125 – 187,5 mg cvetnega prahu (Hrassnigg in Crailsheim 2005).

Ličinka trota dobi podobno sestavljeno hrano kot ličinka delavke, le količina hrane je večja zaradi njihove končne velikosti (Haydak 1970).

Hrana matičnim ličinkam je matični mleček. V prvih treh dneh razvoja ta ličinka dobiva beli del, zadnja dva dni razvoja pa beli in bistri del. Matična ličinka dobiva tudi večjo količino hrane od ličink delavk. Matični mleček vsebuje 34% sladkorjev, hrana ličink delavk pa v prvih dneh vsebuje 12%, v zadnjih dneh pa 47% sladkorja. Pomembna je tudi vrsta sladkorjev, saj matična ličinka vse skozi dobiva glukozo, ličinka delavke pa dobi glukozo na začetku, potem pa dobiva fruktozo in saharozo (Gregorc 2008). Vsebnost sladkorja (fruktoze in saharoze) v prehrani zalege je 18% v prvih treh dneh razvoja ličink, nato 45% v zadnjih dveh dneh (Brodschneider in Crailsheim 2010). Rortais in sod. (2005) so izračunali, da ličinka čebele delavke porabi 59,4 mg ogljikovih hidratov za svoj razvoj v petih dneh.

Ko se ličinke delavk izležejo, jih čebele krmilke hranijo preko trofalakse (Crailsheim 1991, 1998) z matičnim mlečkom do starosti treh dni (Šimúth 2001). Zatem se izležene delavke hranijo same z medom in fermentiranim cvetnim prahom v satju (Haydak 1970). V tem času potrebujejo beljakovine, da se njihove telesne strukture v celoti razvijejo, zato proizvedejo več proteolitičnih encimov v srednjem črevesu, da katalizirajo razgradnjo zaužitega cvetnega prahu (Crailsheim in sod. 1992). Cvetnemu prahu v satju so primešani izločki žlez delavk in različni mikroorganizmi (Gilliam in sod. 1989). Delavka porabi povprečno 3,4 – 4,3 mg cvetnega prahu na dan in največ dokler je krmilka (Crailsheim in sod. 1992). Ko postane pašna čebela, se poraba cvetnega prahu zmanjšuje (Paoli in sod. 2014).

Ko so delavke starejše, se poveča poraba medu, zato proizvajajo veliko manj proteolitičnih encimov ter več encimov za prebavo ogljikovih hidratov v njihovih hipofaringealnih žlezah, kot so α -glukozidaza, ki jo imenujemo tudi saharaza ali invertaza (Kubo in sod. 1996),

glukoza oksidaza in amilaza (Ohashi in sod. 1999). Med pobirajo iz zalog v panju, lahko pa si ga tudi izmenjujejo med seboj (Brodschneider in Crailsheim 2010). Čebela delavka potrebuje 11 mg sladkorja dnevno oz. 22 μ l 50% sladkorne raztopine (Huang in sod. 1998).

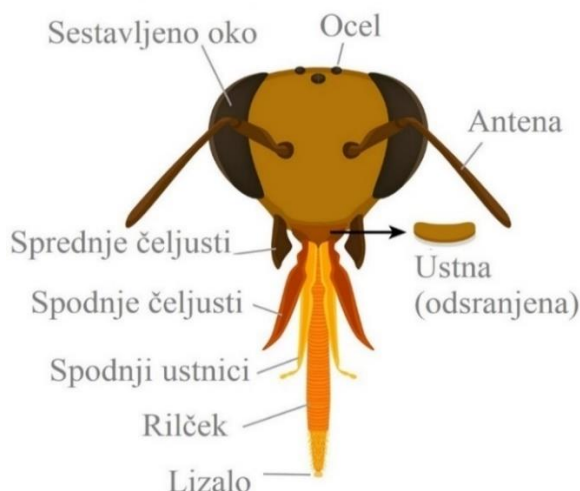
Poležene trote sprva hranijo delavke, kasneje pa se hranijo sami z medom iz satnih celic (Brodschneider in Crailsheim 2010). Po poleganju dobivajo mešanico hrane, namenjene ličinkam, cvetni prah in med. Odrasli troti potrebujejo med tako kot delavke, vendar v večjih količinah (Gregorc 2008).

Matico hranijo krmilke z matičnim mlečkom, poleg je lahko primešan tudi med. Kvaliteta in količina te hrane pa vplivata na intenziteto zaleganja matice (Fine in sod. 2018).

1.1.2 Prebavna pot in prebavila pri čebeli

Telo čebele pokriva eksoskelet in je segmentirano na tri dele: glavo (*caput*), oprsje (*thorax*) in zadek (*abdomen*). Prebavno cev čebele sestavljajo žrelo (*pharynx*), požiralnik (*oesophagus*), medna golša (*ingluvies*) z zaklopko (*proventrikulus*), srednje črevo (*ventriculus*) s peritrofično membrano, tanko črevo (*ileum*) in blatnik (*rectum*) (Snodgrass 1956).

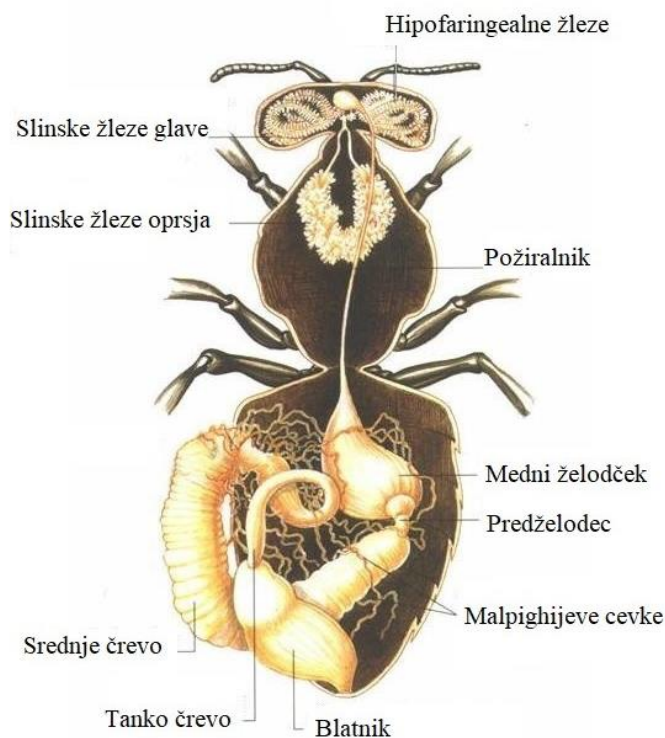
Prebavna pot se začne z ustnim aparatom na glavi, ki ga delimo na grizalo in rilček z lizalom. Grizalo sestavljata ustna (*labrum*) in sprednje čeljusti (*mandibulae*), ki imajo pomembno vlogo pri zauživanju cvetnega prahu, pri različnih opravilih v panju in gradnji satja. Služijo tudi za oporo začetnega dela sproženega rilčka (*proboscis*). Rilček sestavljajo deli spodnje čeljusti (*maxilla*) in spodnji ustnici (*labium*) ter tako tvorijo cev za sesanje tekočine. V sredini cevi je jeziček, ki črpa s kontrakcijo. Vzdlž jezička je na zadnji strani globok žleb in na koncu lizalo (*labellum*) v obliki žličke. Hrana prihaja skozi predustno (preoralno) votlino, ki jo spredaj zapirata oglavni ščit (*clypeus*) in ustna (*labrum*), v ustno votlino (*cavum oris* ali *cibarium*). V predustni votlini so tudi izvodila žlez v glavi. Rilček je v času hranjenja sprožen, tako da rilčkov kanal prehaja v ustno odprtino. Ko je rilček sprožen, je vzpostavljen celotni sesalni kanal, ki služi sprejemanju tekoče hrane, ki potuje v žrelo skozi usta. Sesalni aparat je v področju glave od ustne do zatilne odprtine, kjer prehaja v požiralnik v oprsju. Jeziček služi tako za sesanje kot tudi za izbljuvanje (regurgitacija) vsebine mednega želodčka (Snodgrass 1956).



Slika 1: Čebelja glava z iztegnjenim sesalnim aparatom (Vir: <https://askabiologist.asu.edu/honey-bee-anatomy>).

Prednje črevo (*stomodeum*) sestavljata žrelo in požiralnik, ki v začetnem delu zadka prehaja v medni želodček (*ingluvies*) s predželodcem (*proventriculus*). V njem se shranjuje medicína, in se nadalje meša z izločki krmilnih žlez. Med golšo in srednjim črevesom je zaklopka, ki omogoča medicíni, da vstopa naprej v srednje črevo, obenem pa preprečuje prehod vsebine nazaj v medno golšo. Iz srednjega črevesa se nadaljuje tanko črevo, to pa v blatnik, kar je del zadnjega črevesa (Snodgrass 1956).

Prebava se začne že v medni golši, kjer se medicíni primeša encim invertaza, izloček slinske žleze. Ta razgrajuje polisaharide v monosaharide. V srednjem črevesu se izločajo proteolitični encimi, ki razgrajujejo beljakovine v cvetnem prahu (Snodgrass 1956). Tu poteka tudi resorpcija hranilnih snovi, ki skozi epitelij prehajajo v hemolimfo. Epitelij prekriva peritrofična membrana in formira endo- in ektoperitrofični prostor. Sestavljena je iz več slojev, ki jih ločuje flokulentna masa, ki se predvidoma sestoji iz tekoče frakcije prebavljene hrane ali encimov. Prekriva celotno srednje črevo in zadržuje tekočo hrano nad epitelijem. Najpomembnejša naloga membrane je varovanje epitelija pred abrazijo in infekcijami, sodeluje tudi pri selektivni absorpciji hrane in vode. Med srednjim in zadnjim črevesom so malphigijeve cevke, ki so ekskretorni organ in odstranjujejo odpadne produkte prebave iz hemolimfe. V zadnjem črevesu se resorbirajo anorganske soli in voda. Feces se izloča skozi anus (Snodgrass 1956).



Slika 2: Prebavila čebele delavke (Vir: <https://abejas.org/en/bees-internal-anatomy/>).

1.1.3 Anatomija in fiziologija srednjega črevesa

Srednje črevo je dolga široka cev, ki je v obliki pentlje. Je nadaljevanje medne golše, od katere je ločeno z zaklopkami. Tukaj potekata prebava in absorpcija hranil (Snodgrass 1956; Chapman 1978; Snodgrass in Erickson 2003). Z izločanjem specifičnih encimov sodeluje tudi pri razstrupljanju naravnih in sintetičnih toksinov (Li in sod. 2006) in imunskemu odzivu (Vannette in sod. 2015). Notranjo steno črevesa obdajajo večinoma visoko prizmatične epitelne celice, ki izločajo encime, le-ti pa sodelujejo pri prebavi beljakovin v cvetnem prahu (Snodgrass 1956). Delovanje mikrosporidija *Nosema* spp. lahko prizadene epitelij srednjega črevesa (Fries in sod. 1996; Higes in sod. 2007; Chen in sod. 2009).

1.1.4 Imunski sistem

Imunski oz. obrambni sistem čebele in drugih socialnih žuželk deluje na nivoju družine kot tudi na individualnem nivoju (Evans in Spivak 2009).

Obramba na nivoju družine, imenovana tudi socialna obramba (angl. social immunity) (Cremer in Sixt 2009), vključuje čistilno vedenje čebel, kadar se čistijo med seboj in odstranjujejo delce cvetnega prahu in parazite (Boecking in Spivak 1999), higiensko vedenje, ko vzdržujejo čistočo v gnezdu in ko delavke zaznavajo in odstranjujejo iz panja okuženo zalego s patogeni (Rothenbuhler in Thompson 1956; Wilson-Rich in sod. 2009). Delavke odstranjujejo tudi čebele, ki so v panju umrle in tako zmanjšujejo kontakt s potencialnimi patogeni (Rothenbuhler 1964; Spivak in Gilliam 1998). Zanimiv način

socialne obrambe je regulacija temperature v panju. Delavke segrevajo prostor v panju (angl. social fever), kar vpliva na toplotno občutljive patogene kot npr. *Ascospheara apis* (Simone-Finstrom in sod. 2014). Poleg tega nabirajo rastlinske smole (propolis) za preplastitev notranjosti panja, kar ustvarja vodoodbojno antimikrobno in protivirusno bariero (Simone in sod. 2009).

Na individualnem nivoju imajo čebele več linij obrambe pred patogeni (Evans in sod. 2006; Schmid in sod. 2008; Wilson-Rich in sod. 2008). Fizična bariera vključuje eksoskelet in peritrofično membrano z epitelijem v srednjem črevesu, ki prepreči vstop patogenov v telo. K fiziološkim zaviralcem razširjanja mikrobov štejemo spremembo pH in kemijskih pogojev v črevesju (Crailsheim in Riessberger-Galle 2001). Če patogen preide skozi fizično in fiziološko bariero, se čebele lahko zaščitijo še s celičnim in humoralnim imunskim odzivom, ki tvorita sekundarno linijo obrambe (Wilson-Rich in sod. 2008; Laughton in sod. 2011). Elementi sekundarne linije obrambe so protimikrobni peptidi in hemociti, ki nastajajo v t. i. imunskih organih, to sta maščobno telo ter limfna žleza (Malovrh 2016).

Humoralni odziv vključuje aktivacijo profenoloksidaze (proPO) s kaskado serinske proteaze, kar ima za posledico prehodno sintezo kinonov in melanina (Lemaitre in Hofmann 2007; Cerenius in sod. 2008), antimikrobnih peptidov (AMP), ki prepoznajo signale parazitov, beljakovin, ki prilagajajo in razširjajo te prepoznane signale ter efektorskih proteinov, ki neposredno zavirajo parazite (Lemaitre in Hoffmann 2007). AMP nastajajo v maščobnem tkivu, aktivni so predvsem apidaecin (Casteels in sod. 1989), abaecin (Casteels in sod. 1990), himenoptaecin (Casteels in sod. 1993) in defenzin (Casteels-Josson in sod. 1994). Ključno vlogo pri regulaciji transkripcije genov AMP imata signalni poti, imenovani Toll in Imd. Ti dve poti se navadno aktivirata s sestavnimi elementi celične stene mikrobov, npr. lipopolisaharidi (LPS) ali peptidoglikani (Lemaitre in Hoffmann 2007).

Na celičnem nivoju potekajo: celjenje ran, fagocitoza, nastajanje nodulov, v katere se lovijo mikrobi in enkapsulacija patogenov. Pri vseh teh reakcijah sodelujejo različne »krvne« celice, hemociti (Strand in Pech 1995; Schmidt in sod. 2001). Le-te najprej prepoznajo patogen kot tujek, nato pa sledi aktivacija številnih signalnih poti, ki uravnavajo različne funkcije hemocitov (Strand 2008).

Humoralna in celična obramba se medsebojno dopolnjujeta pri nevtralizaciji tujkov. Hemociti prepoznajo tujke bodisi z neposredno interakcijo površinskih receptorjev z molekulami na tujku bodisi posredno s prepoznavanjem humoralnih receptorjev, ki se na površino tujka vežejo in opsonizirajo. Efektorske odzive, kot sta fagocitoza in enkapsulacija, koordinirajo inter- in intracelularni signali (Lavine in Strand 2002). Tako nodulacijo kot enkapsulacijo pogosto spremlja melanizacija, katero katalizira encim (profenol-) fenoloksidaza (PO) (Ashida in Brey 1998, cit. po Antúnez in sod. 2009) in ta PO-posredovana sinteza melanina igra glavno vlogo pri imunski obrambi žuželk (Antúnez in sod. 2009).

1.1.5 Patologija srednjega črevesa

Epitelij srednjega črevesa ličinke prizadene delovanje patogene bakterije *Paenibacillus larvae*, bakterije *Melissococcus pluton* in plesni *Ascosphaera apis*.

Bakterija *Paenibacillus larvae* je povzročitelj hude gnilobe čebelje zalege (znana tudi kot ameriška gniloba), ki je običajno opazna na pokriti zalegi. Je zelo nalezljiva in pogosto povzroča odmiranje posameznih ličink, kar ob hudih okužbah privede do slabitve celotne čebelje družine (Genersch in sod. 2006). Spore v panju prenašajo čebele s hranjenjem ličink, pri čiščenju celic, odkrivanju in odstranjevanju odmrlih ličink in bub. Prav tako pa se spore raznašajo z vsemi predmeti, ljudmi in živalmi, ki pridejo v stik s kužnim materialom. Za bolezen so dovzetne ličinke, ki so v fazi prejetanja hrane. Okužijo se skozi usta, v črevesju pa se spora preoblikuje v vegetativno obliko (Bailey in Ball 1991).

Bakterija *Melissococcus pluton* je povzročitelj pohlevne gnilobe čebelje zalege (znana tudi kot evropska gniloba), ki se običajno klinično manifestira na nepokriti zalegi in povzroči propad le-te (Bailey 1983). Eden od kliničnih znakov bolezni je spreminjanje položaja ličinke. Zdrava ličinka zvita leži na dnu celice, bolna ličinka pa spremeni položaj v celici, tako da se iztegne po dolžini in odmre. Okužba se začne, ko manj kot 48 ur stara ličinka zaužije okuženo hrano. Bakterije se v srednjem črevesu razmnožujejo in ga pri pet dni stari ličinki napolnijo. Po razkroju peritrofične membrane prodirajo skozi črevesni epitelij (Bailey in Ball 1991).

Plesen *Ascosphaera apis* povzroča poapnelo zalego. Ličinke so najbolj dovzetne v starosti treh do štirih dni in se okužijo s hrano. Spore plesni v srednjem črevesu ličinke vzbrstijo, nato hife plesni preidejo skozi peritrofično membrano in epitelij ter prodirajo proti površini ličinke. Okužene ličinke se ob propadu posušijo, iz njih nastanejo belo ali sivo-črno obarvane mumificirane ličinke - mumije. Ličinke odmrejo v stadiju izprožene ličinke v že pokriti celici (Bailey in Ball 1991).

Glivični povzročitelj okamnele zalege je *Aspergillus flavus*. Okužba poteka prek ustne odprtine ali skozi kutikulo. Okuži lahko čebele v različnih razvojnih stadijih, večkrat napade zalego, vendar se pojavlja tudi pri odraslih čebelah. Trosi lahko dozori in se razrastejo v telesu ličinke in v prebavilih čebele. Ko micelij preraste telo ličinke, postaja le-ta vedno bolj trda, dokler ne otrdi kot kamen (Bailey in Ball 1991).

Pri odrasli čebeli epitelij srednjega črevesa napade mikrosporidij *Nosema* spp., ki povzroča nose mavost čebel (Fries 2010). Več o nose mi sledi v naslednjem podpoglavju.

1.1.6 *Nosema* spp. in nose mavost

Nosema je enocelični organizem, uvrščen med plesni, razred mikrosporidij in rod *Nosema*. Pri medonosni čebeli sta v rodu *Nosema* ugotovljena dve vrsti mikrosporidija, in sicer

Nosema apis (Zander 1909) in *Nosema ceranae* (Fries in sod. 1996). *Nosema* je obligatorni intracelularni parazit (Keeling 2009), ki povzroča bolezen nose mavost.

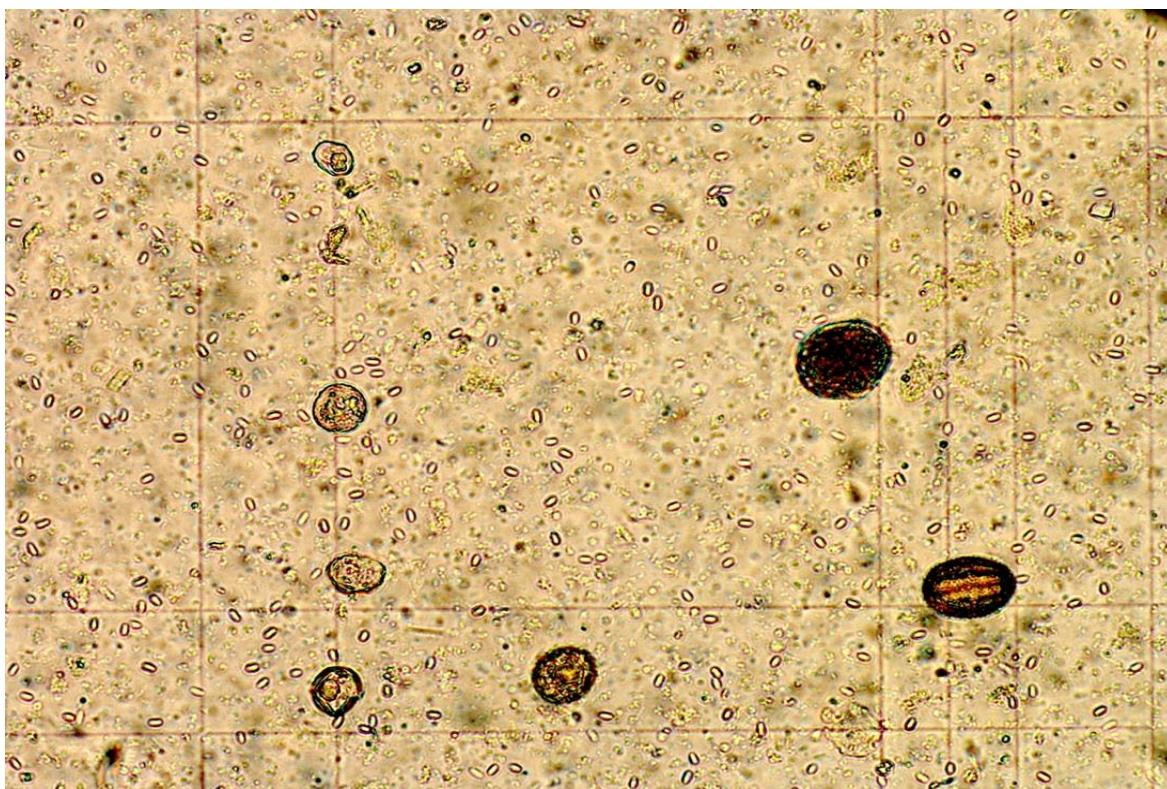
Nose mavost je kronična bolezen čebelje družine, saj se razvija počasi, bolezenske znake pa je težko odkriti. Bolezen postane intenzivnejša, kadar se pridružijo še drugi neugodni oz. stresni dejavniki, kot so intenzivno monokulturno kmetijstvo, izpostavljenost pesticidom, prisotnost drugih patogenov, širjenje urbanih površin in klimatske spremembe (Bromenshenk in sod. 2010).

Prvi je spore v čebeljem črevesju odkril Donhoff leta 1857 v Nemčiji. Leta 1909 je Zander spore poimenoval in klasificiral kot *Nosema apis*. *Nosema ceranae* je bila prvič opisana leta 1996 pri vzhodni čebeli (*Apis ceranae*) (Fries in sod. 1996); leta 2006 pa pri medonosni čebeli (*Apis mellifera*) (Higes in sod. 2006; Huang in sod. 2007). Vrsta mikrosporidija *N. ceranae* je trenutno globalno prevladujoča vrsta (Chen in sod. 2012; Martín-Hernández in sod. 2012). Možne so tudi mešane okužbe v čebelji družini ali celo v posamezni čebeli (Paxton in sod. 2007; Gisder in sod. 2010). Forsgren in Fries (2010) sta v poskusu uporabila enakomerno mešanico spor *N. apis* in *N. ceranae* za čebele delavke, pri čemer nista opazila konkurenčne prednosti pri nobeni vrsti. V študiji Milbrath in sod. (2015) so opazili rahlo višjo količino spor pri *N. ceranae* v primerjavi z *N. apis* pri posameznih okužbah. Pri mešanih okužbah so opazili, da je bilo število spor višje v primerjavi s posameznimi okužbami, niso pa videli konkurenčne prednosti za *N. ceranae*. V Sloveniji je danes okužba z *N. ceranae* pogostejša kot okužba s sorodno *N. apis* (Gregorc 2013).

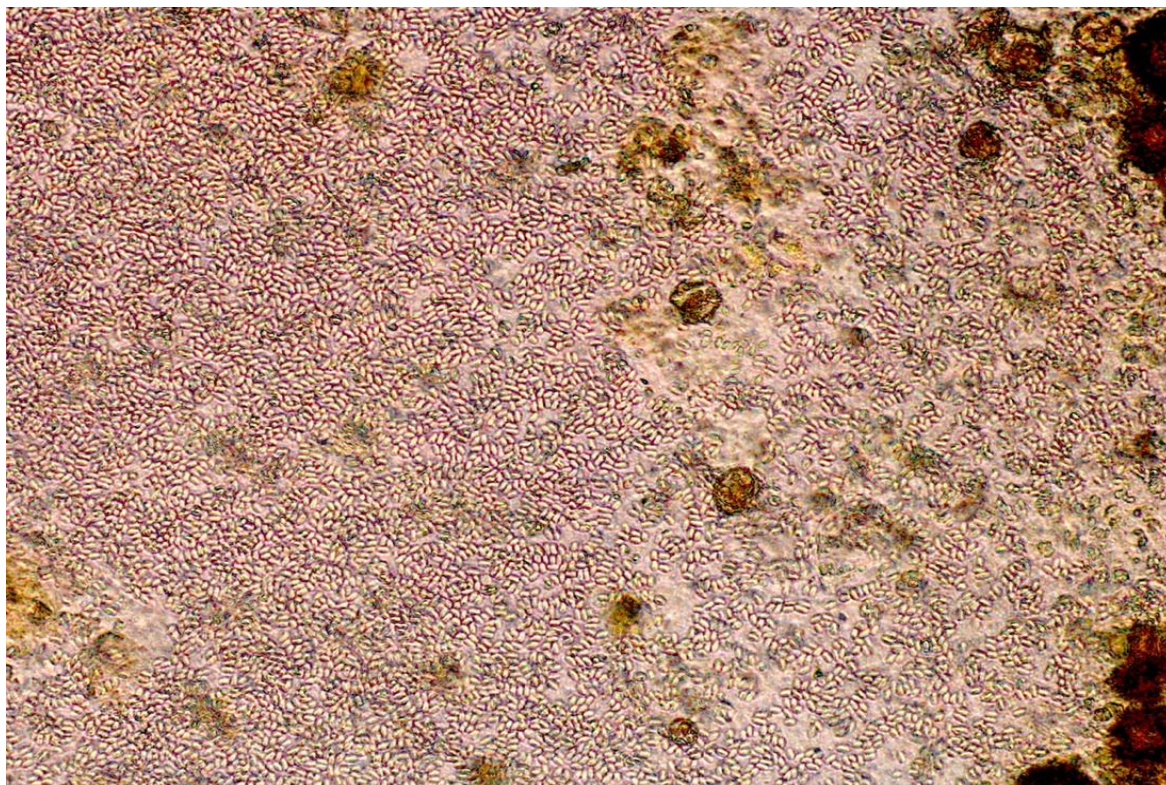
Čebele se okužijo s sporami *Nosema* sp., ko jih zaužijejo skozi usta (*per os*). Večje število spor najdemo pri starejših pašnih čebelah kot pri mlajših čebelah krmilkah (Meana in sod. 2010; Smart in Sheppard 2012; Fries in sod. 2013). Vir okužbe so iztrebki okuženih čebel. Glavni poti okužbe sta oralno-oralno (trofalaksa) in fekalno-oralno (Smith 2012). Prenos spor je možen s kontaminiranim satjem (Bailey in Ball 1991) in z vodnimi viri, napajalniki (L'Arrivee 1965), prav tako pa tudi s cvetnim prahom, ki ga delavke kontaminirajo ob nabiranju in skladiščenju ter s čebelarškim orodjem in medom (Higes in sod. 2010). Ugotovili so, da je za okužbo delavk potrebnih le nekaj spor (Bailey 1972). Okužba z *N. ceranae* je možna skozi celo leto (Higes in sod. 2010), *N. apis* pa se bolj pojavlja spomladi ali jeseni (Gisder in sod. 2010). Poleti je stopnja okuženosti komaj zaznavna in z rahlim povišanjem jeseni. Pozimi se razširjenost rahlo poveča, vrh pa doseže spomladi, preden zimske čebele nadomestijo mlade čebele (Gisder in sod. 2010). Pozno jeseni in pozimi je iztrebljanje okuženih čebel zunaj oteženo, tako se z iztrebljanjem znotraj panja kontaminira satje (Bailey 1953). Ko pozno pozimi in spomladi delavke začnejo čistiti in pripravljati satje za zalego, se okužijo s sporami v iztrebkih (Bailey in Ball 1991).

Pod svetlobnim mikroskopom lahko vidimo spore *Nosema* sp., ne moremo pa razlikovati med vrstama (Fries in sod. 2006). Spor pri mlajših čebelah ne moremo zaznati z mikroskopom, saj po zaužitju potrebujejo vsaj 3 dni, da se sprostijo iz okuženih celic (Higes

in sod. 2007). Spore *N. ceranae* merijo 4,7 μm v dolžino in 2,7 μm v širino in so krajše od spor *N. apis* za povprečno 1 μm (Ptaszynska in sod. 2014). Pri obeh vrstah sta spori dvojedni in nimata mitohondrija (Fries in sod. 2006), obdani sta z notranjim hitinom in zunanjo beljakovinsko steno, endosporo in eksosporo (Vavra in Larsson 1999, cit. po Soklič in Gregorc 2016). Zajedavec se zaradi zmanjšanih presnovnih zmogljivosti močno zanaša na gostitelja, da zagotovi energijo za svojo rast in razmnoževanje (Martín-Hernández in sod. 2011). Število polarnih filamentov je vrstno specifično, *N. ceranae* jih ima 20 – 23 (Fries in sod. 1996; Huang in sod. 2007), *N. apis* pa vsaj 26 - 32 (Fries 1989). Kljub nekaterim morfološkim razlikam je razvojni krog kompleksen in podoben za obe vrsti *Nosema* sp. (Chen in Huang 2010).

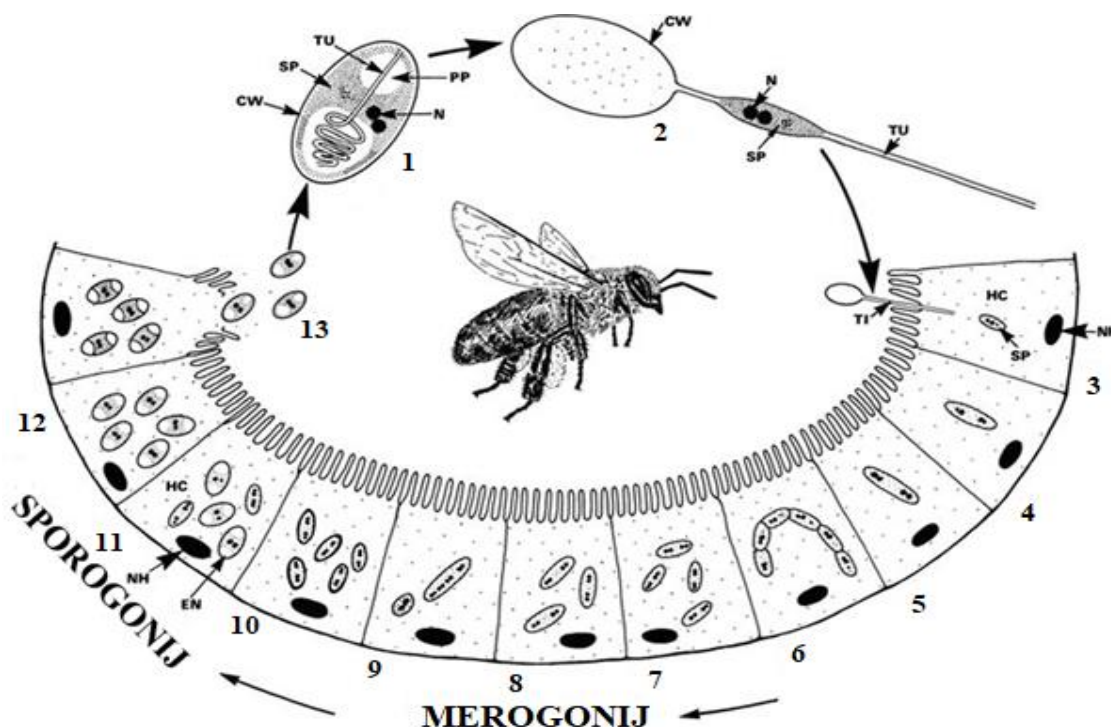


Slika 3: Vzorec srednjega črevesa s sporami *Nosema* sp. na hemocitometru pod 200x povečavo (Vir: M. Smodiš Škerl).



Slika 4: Vzorec srednjega črevesa s sporami *Nosema* sp. pri starosti 27 dni (5. vzorčenje), skupina hranjena s cvetnim prahom in okužena s sporami pod 200x povečavo (Vir: N. Rom).

Zaužite infektivne spore potujejo skozi prebavni trakt, dokler ne pridejo v srednje črevo, kjer jih prebavni sokovi aktivirajo za avtoinfekcijo. Na svojem sprednjem delu tvorijo polarne filamente (Slika 5, faza 2), ki se izprožijo in mehansko prodrejo skozi peritrofično membrano v epitelne celice srednjega črevesa delavk, trotov in matice (Fries 2010; Higes in sod. 2010). Okužena sporoplazma vstopi preko filamenta v gostiteljeve celice citoplazme, kjer se začne replikacija in kasneje produkcija spor (Slika 5, faza 4 – 12; Higes in sod. 2010). Ko so celice citoplazme popolnoma napolnjene s sporami, se celice lizirajo (Maiolino in sod. 2014) in spore se sprostijo v lumen črevesja (Slika 5, faza 13). V 10 - 12 dneh po zaužitju spor se okužba popolnoma razvije (Forsgren in Fries 2010). Te sekundarne spore se izločijo s fecesom in okužijo druge osebkke (Fries in sod. 1992). Temperatura, ki je najugodnejša za razmnoževanje *N. apis*, je 30 - 34°C. Če je temperatura višja ali nižja se razvoj upočasni. Čas med zaužitjem spor in nastankom novih spor se spreminja glede na temperaturo (Lotmar 1943).



Slika 5: Življenjski krog *N. apis*, ki povzroča čebeljo grižo oz. nosemozo. CW = stena spore; EN = sporulacija (tvorba spor); HC = gostiteljska celica; N = jedro; NH = jedro gostiteljske celice; PP = polaroplast; SP = sporoplazma; TI = injiciran filament; TU = polarni filament. 1 - infektivne spore (6 – 9 x 4 µm) vsebujejo dvojedno sporoplazmo; čebele se okužijo z zaužitjem spor. 2, 3 - znotraj črevesja se cevasti polarni filament izproži, prodre skozi peritrofično membrano in vstopi v celico črevesja. Sporoplazma (SP) je vbrizgana v epitelno celico skozi cevasti lumen polarne nitke. 4 – 12 - sporoplazma (9) raste in se nespolno deli v štirih stopnjah v svoji gostiteljski celici (merogonija). Končno se tvorba spore začne z diplokarionsko fazo (10). Skozi končno delitev (sporogonija). 13 - ko so spore zrele, gostiteljske celice lizirajo in sprostijo infektivne spore v lumen, spore se izločijo z blatom ali okužijo sosednje celice (Vir: <http://scientificbeekeeping.com/the-nosema-twins-part-1/> in Mehlhorn 2015).

Ob okužbi z *N. apis* imunski sistem čebele aktivira obrambne mehanizme, to vključuje tudi povečano izražanje genov, ki kodirajo antimikrobne peptide in druge encime, povezane z obrambo. Po drugi strani pa je mogoče, da okužba z *N. ceranae* zatira imunski odziv z zmanjšanjem prepisovanja nekateri od teh genov, kar povzroča imunosupresijo (Antúnez in sod. 2009).

Epitelne celice okuženih čebel kažejo več znakov degeneracije, ki so povezane z upadanjem bioloških procesov, kot so deregulacija fosforilacije proteinskih aminokislin, pozitivna regulacija celične komunikacije in homeostaza in morfogeneza tkiv. Degeneracija tkiv in okvara obnavljanja celic, ki ju povzroča okužba, sta glavna dejavnika za smrtnost med nenehno okužbo črevesja z *Nosema* sp. (Dussaubat in sod. 2012).

Štiri dni po okužbi z *N. apis* se poveča izražanje antimikrobnih peptidov (abaecin, defenzin in himenoptaecin) (Antúnez in sod. 2009). Ti peptidi so povezani s humoralnim imunskim

sistemom čebel in predstavljajo antibakterijsko delovanje proti gram-pozitivnim in gram-negativnim bakterijam (Chaimanee in sod. 2012). Izražanje (profenol-) fenoloksidaze (PO) se poveča 7 dni po okužbi (Antúnez in sod. 2009). Visoke ravni PO ustvarjajo opsoninske vmesne snovi in dajejo prednost nodulaciji, enkapsulaciji in fagocitozi (Glinski in Jarosz 2001). Nasprotno pa se pri *N. ceranae* v sedmih dneh po okužbi izražanje abaecina, himenoptaecina in glukoza dehidrogenaze znatno zmanjša, kar kaže na to, da *N. ceranae* delno zavira humoralne in celične obrambne mehanizme (Antúnez in sod. 2009).

Nosemavost negativno vpliva na produktivnost in preživetje čebelje družine, dolgoživost odraslih čebel, trotov in matice in na vedenje (Botias in sod. 2013). Znana je slabša orientacija pašnih čebel (Kralj in Fuchs 2010) in hitrejše staranje (Goblirsch in sod. 2013). Potrdili so, da okužba povzroča ultrastrukturne spremembe hipofaringealnih žlez (Wang in Moeller 1971). Pri okuženih delavkah se pojavi atrofija hipofaringealnih žlez (Wang 1969). Pojavi se zmanjšano izločanje prebavnih encimov (Malone in Gatehouse 1998) in absorpcija hranilnih snovi, kar povzroča motnje v presnovi čebel (Paris in sod. 2018).

S povečevanjem števila okuženih čebel se pojavijo klinični znaki okuženosti z zajedavskim mikrosporidijem (Barron 2015). Pri okužbi z *N. apis* (nosemoza tipa A) opazimo veliko število odmrlih čebel (Bourgeois in sod. 2010) in rumeno do zelene iztrebke na vhodih panjev, kar kaže na prebavne motnje odraslih čebel (Smith 2012). Pri okužbi z *N. ceranae* (nosemoza tipa C) ni vidnih jasnih kliničnih znakov kot pri *N. apis*, kar pomeni, da je bolezen težje odkriti (Martín-Hernández in sod. 2018). Okužene pašne čebele se običajno ne vrnejo v panj (Higes in sod. 2009). Mlade čebele hitreje postanejo pašne čebele, da bi nadomestile izgubo le-teh (Huang in Robinson 1996). S tem se skrajšuje življenjska doba čebel (Higes in sod. 2008). Ko družina ne more več vzdržati proizvodnje zalege dovolj hitro, začne upadati številčnost čebel v družini (Khoury in sod. 2011).

Dalj časa so za zdravljenje nosestavosti uporabljali antibiotik fumagilin (Furgala 1962; Williams in sod. 2008). Kasnejše raziskave so dokazale, da je fumagilin strupen in povzroča kromosomske spremembe (van den Heever 2014) in rakotvornost pri ljudeh (Stanimirović in sod. 2007) ter spremembe ultrastrukture hipofaringealnih žlez pri čebelah (Liu 1990). Kasnejše študije učinkovitosti fumagilina pri zatiranju *N. ceranae* so pokazale, da se stopnja razmnoževanja zajedavcev zelo povečuje pri koncentracijah, nižjih od predpisanih (Huang in sod. 2013). Posledično so fumagilin prepovedali v Evropski Uniji za uporabo pri rejnih živalih (MRL; Commission Regulation, EU, 2010, no. 37/2010).

Zato obstaja veliko povpraševanje po novih učinkovinah, ki varno in učinkovito zdravijo čebele, okužene z *N. ceranae* (Burnham 2019). Nekatere snovi, ki so zmanjšale število spor *N. ceranae* v preliminarnih testih, so surfaktin S2 (Porrini in sod. 2010), timol (Maistrello in sod. 2008; Costa in sod. 2010) in komercialno dostopni Nozevit (Tlak Gajger in sod. 2009).

K preprečevanju pojavljanja klinično zaznavne oblike bolezni pripomorejo apitehnični ukrepi. Potrebno je čiščenje in razkuževanje čebelarkega materiala in pribora, redna

menjava starega satja in matic, reden pregled družin, primerna kvaliteta zalog hrane, mirno zimovanje družine in higienski napajalnik (Loskotova in sod. 1980).

1.1.7 Hipofaringealne ali goltne žleze

Čebele krmilke imajo močno razvite hipofaringealne ali goltne žleze (*glandulae hypopharyngealis*, HPG) (Hrassnigg in Crailsheim 1998). Žleze so nameščene v sprednjem delu čebelje glave, so grozdaste oblike in v dveh simetričnih aksilnih vodih, na katere se pripenjajo žlezni acinusi. Acinuse oblikujejo sekretorne celice, ki so oblikovane v skupke. Sekretorne celice so povezane z glavnima aksialnima vodoma preko manjših zbirnih cevk (Snodgrass 1984). Oba glavna voda se odpreta v suboralni plošči hipofarinksa (predustna votlina), tako da se izločki na koncu sprostijo skozi usta (Deseyn in Billen 2005).

Naloga hipofaringealnih žlez je produkcija in izločanje sestavin matičnega mlečka, s katerim čebele krmilke hranijo matico in zalego (Wang in Moeller 1971). Mleček je sestavljen iz vode, sladkorjev, proteinov, holesterola, amino kislin in vitaminov (Rembold 1964).

Žleze se začno razvijati ob prisotnosti feromona zalege in dobri prehranjenosti s cvetnim prahom, ki je vir proteinov (Hrassnigg in Crailsheim 1998). Najbolj so razvite pri delavkah med 6. in 12. dnevom starosti. Po treh tednih krmilke zaključijo obdobje hranjenja zalege in žleze se postopoma začno krčiti, dokler ne zakrniijo (Deseyn in Billen 2005).

Na velikost in delovanje žlez vpliva tudi okužba *N. apis*. V primerjavi z zdravimi delavkami imajo okužene delavke slabše razvite žleze (Wang in Moeller 1971; Liu 1990). Posredni učinki okužbe z *N. apis* in *N. ceranae* na hipofaringealne žleze sta sprememba izločanja žlez in sprememba vedenja obolelih čebel delavk (Hassanein 1953; Vidau in sod. 2014).

1.2 NAMEN IN CILJI

Namen dela je oceniti učinke dveh prehranskih dodatkov. Prehranski dodatki na tržišču se pogosto oglašujejo kot koristni za zdravje čebel, saj naj bi zagotavljali uravnoteženo prehrano, s tem pa izboljšali delovanje imunskega sistema. V resnici je njihov učinek redko preučen in preverjen.

Cilj našega dela je ugotoviti, ali prehranska dodatka preprečujeta razvoj spor *Nosema* sp. pri medonosni čebeli in v kakšni meri se njuno delovanje kaže. Prehranska dodatka, ki smo ju preučevali, naj bi vplivala na razvoj spor mikrosporidija *Nosema* sp. pri čebelah. Mikrosporidij *Nosema* sp. je eden glavnih patogenov pri medonosni čebeli in povzroča nose mavost. Raziskava bo v pomoč čebelarjem pri odločanju za način preprečevanja razvoja nose mavosti ali zmanjšanju okužbe, kar bo pozitivno vplivalo na zdravje in produkcijo čebelje družine.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

1. Prehranska dodatka in cvetni prah bodo vplivali na število spor mikrosporidija *Nosema* sp.
2. Prehranska dodatka in cvetni prah bodo vplivali na dolgoživost delavk medonosne čebele (*Apis mellifera carnica*).
3. Stopnja okuženosti skupine, hranjene s sladkorno pogačo in inokulirane s spori *Nosema* sp., bo večja.

2 MATERIAL IN METODE

Poskus je potekal od sredine junija do konca julija 2019 na Kmetijskem inštitutu Slovenije v Ljubljani, na oddelku za živinorejo. Za pripravo vzorcev spor *Nosema* sp. smo uporabili metodo, opisano v Coloss Beebook Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research (Fries in sod. 2013). V izvedbi poskusa smo sledili metodi, navedeni v Coloss Beebook Volume I: Standard methods for *Apis mellifera* research (Human in sod. 2013). Pomagali smo si tudi z metodami dela, ki so jih uporabili drugi raziskovalci pri podobnih raziskavah (Cantwell 1970; Malone in sod. 1999; Higes 2008; Evans in sod. 2009; Williams in sod. 2012; Soklič 2016).

Za potrebe poskusa smo uporabili delavke medonosne čebele *Apis mellifera carnica*. Opravili smo predhodni presejalni pregled vzorcev čebel na prisotnost spor *Nosema* sp. iz več družin in se odločili za dve družini, nameščeni na lokaciji Kmetijskega inštituta Slovenije v Ljubljani. Izbrani družini ravno tako nista kazali kliničnih znakov drugih bolezni. Iz vsake družine smo vzeli sat pokrite zalege in ju prenesli v inkubator (I-260, Kambič, Slovenija) na 34°C z relativno vlažnostjo zraka med 50 in 70%, kjer so se v 24 urah izlegle mlade delavke. Delavke smo po skupinah vstavili v več kletk in jih hranili s sladkorno pogačo, pogačo s cvetnim prahom in prehranskima dodatkoma.

Kletke so bile prirejene po Evansu in sod. (2009), iz plastičnih kozarčkov (višine 11,5 cm in premera 8,5 cm; Slika 6) in petrijevk ter PVC škatel za zgoščenke (višine 9,5 cm in premera 12,5 cm). Plastične kozarčke in petrijevke smo uporabili pri skupinah, kjer smo čebele hranili s pogačami, škatle zgoščenk pa pri skupini, ki je bila hranjena s sladkorno raztopino. Obe vrsti kletk sta imeli več manjših odprtih, ki so omogočale dotok zraka. Kozarčki so imeli na vrhu še po eno večjo odprtino, kamor smo namestili 12 ml brizgo z vodo, škatle zgoščenk pa po 2 odprtini, ena za 12 ml brizgo z vodo in druga za 12 ml brizgo s sladkorno raztopino. Pogače pri skupinah v kozarčkih smo zapakirali v majhne vrečice, ki smo jih prerezali, da so imele čebele dostop do hrane. Dno kletke smo prekrili s kosom plenice za enkratno uporabo, narezanim na primerno dimenzijo, da je absorbirala vodo in sladkorno raztopino, ki bi morebiti kapljala iz brizge.



Slika 6: Čebele delavke v poskusni kletki (Vir: N. Rom).

Za potrebe raziskave smo si izbrali dva komercialna prehranska dodatka. Bees Vita plus[®] proizvajalca HealthyBees, LLC[™], ki po podatkih, pridobljenih z njihove uradne spletne strani, vsebuje več kot 18 aminokislin, spirulino, geraniol, timijanovo olje, kokosovo olje, dekstroza, pivski kvas, origanovo olje, majaronovo olje, olje muškarnega oreščka, izvleček žafrana, limonino olje, izvleček aloe vere, prah rdeče pese, vitamine B1, B2, B3, B5, B6, B9, C, E, K in minerale kalcij, železo, mangan, fosfor, kalij in cink. Drugi dodatek je Bees-Strong[®] proizvajalca BeeVital GmbH Austria, ki vsebuje vseh 10 esencialnih aminokislin. Tretji dodatek je bila pogača s cvetnim prahom, narejena po lastnem receptu. 100 g suhega cvetnega prahu smo čez noč namočili v nekaj vode, da se zrna raztopijo. Naslednji dan smo raztopljen cvetni prah zlili v 2 kg sladkorja v prahu in ob mešanju dodali do skupno 80 ml vode, da je nastala gosta pogača. Za kontrolo smo uporabili sladkor v prahu in ga zmešali z vodo, da je nastala gosta pogača. V prehranskih dodatkih smo določili aminokislinsko sestavo (Preglednica 7) in z weendsko analizo določili vsebnost beljakovin (Preglednica 6).

2.1 PREDHODNI PRESEJALNI PREGLED ČEBELJIH DRUŽIN NA PRISOTNOST SPOR MIKROSPORIDIJA *NOSEMA* SP.

Za pregled družin na prisotnost spor noseme smo potrebovali starejše (pašne) čebele, ki so pogosteje okužene v primerjavi z mlajšimi čebelami (Meana in sod. 2010; Smart in Sheppard 2012). Zaprli smo vhod v panj za 30 minut (Higes 2008). Čebele, ki so se zaradi tega zbirale na bradi panja, smo ometli v vrečko, jo zavezali in primerno označili z datumom, zaporedno številko panja ter lokacijo čebelnjaka. Vzorčne čebele smo čez noč shranili v zamrzovalniku.

Stopnjo okuženosti smo določili iz združenih vzorcev po 20 čebel, ki smo jih pripravili naslednji dan. S pinceto smo oddelili zadek in oprsje posamezne čebele. 20 zadkov smo dali v sterilnico in dolili nekaj vode, skupno do 20 ml (1 ml/čebelo) ter zmečkali s pestilom. Dolili smo preostalo vodo in precedili skozi cedilo. Kapljico suspenzije smo kanili na Bürker-Türkov hemocitometer in s pomočjo svetlobnega mikroskopa (Jenaval, Zeiss, Nemčija) pri 400x povečavi prešteli spore po metodi Cantwella (1970). Prešteli smo spore v petih kvadratih mreže na hemocitometru, (v po enem kvadratu v vsakem kotu mreže in v sredinskem kvadratu; na sliki 3 prikazan en kvadrat) ter dobljeno število uporabili v formuli skupaj s površino prešteti kvadratov, faktorjem redčitve in globino jamice. Suspenzijo smo redčili v razmerju 1 : 9 (suspenzija : voda), če je bilo število spor v posameznem polju hemocitometra tako veliko, da nismo mogli več natančno šteti.

2.2 PRIPRAVA KONCENTRACIJE SPOR *NOSEMA* SP. ZA INOKULACIJO ČEBEL *PER OS*

Kot vir spor noseme smo uporabili čebele delavke iz panjev, kjer smo predhodno dokazali prisotnost spor. Lokacija okužene družine, iz katere smo odvzeli okužene čebele, je bila v Jabljah. Suspenzijo smo pripravili tik pred individualnim okuževanjem.

Čebele smo usmrtili s pomočjo CO₂ in jim izpreparirali prebavila. Pripravili smo 8 mikrocentrifugirk in v vsako dali po pet prebavil. Črevesa smo strli s sterilnim mikropestilom, dodali po 1 ml vode, zaprli mikrocentrifugirke ter premešali na stresalcu. Preverili smo količino spor v homogenatu po metodi Cantwella (1970). Homogenat smo centrifugirali šest minut pri 1.700 obratih na minuto in odpipetirali supernatant. Na dnu mikrocentrifugirke se je nabrala usedlina, ki smo ji dodali 50% sladkorno raztopino. Tako smo dobili želeno koncentracijo spor. Dobljeno suspenzijo smo ponovno premešali na stresalcu in ponovno preverili koncentracijo spor. Uporabili smo koncentracijo 10.000 spor na µl (Soklič 2016).

2.3 POTEK POSKUSA

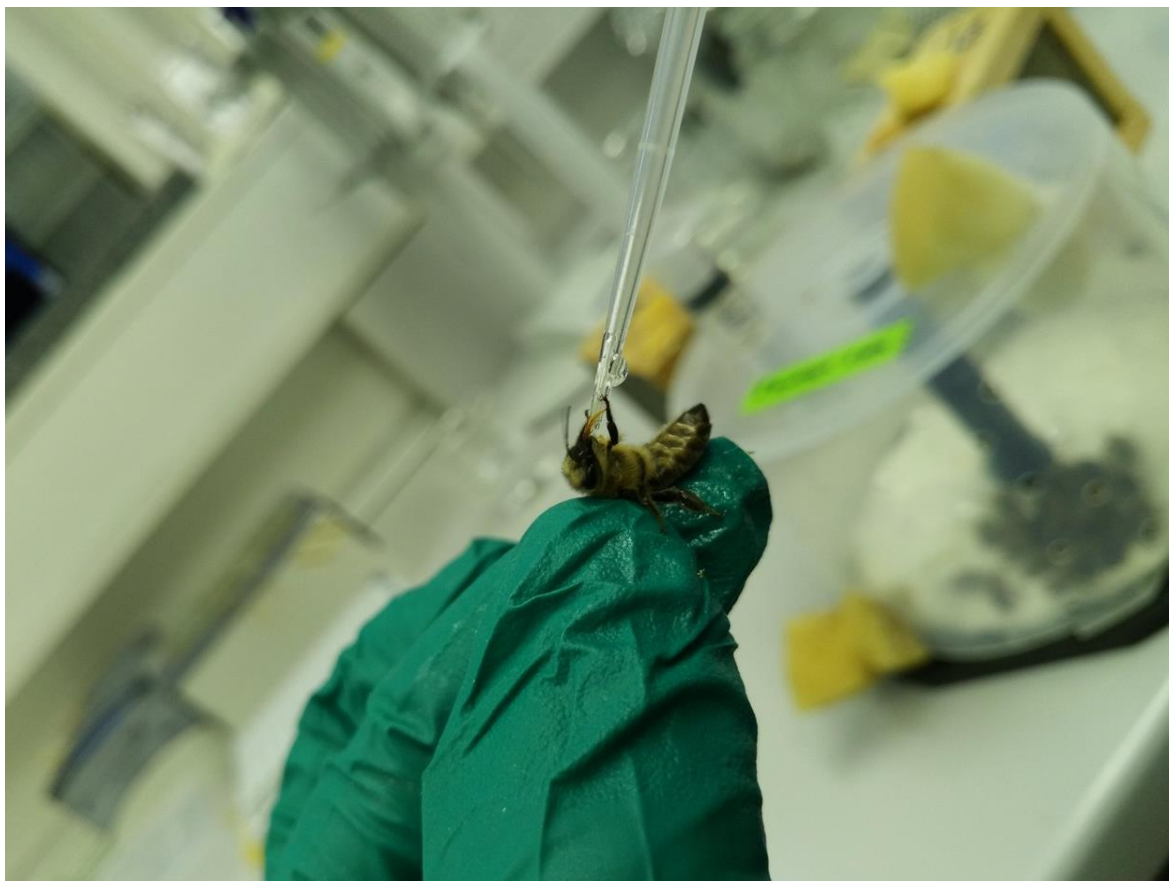
V posamezno kletko smo dali po 30 čebel. Glede na izbrane prehranske dodatke smo pripravili 4 skupine za inokulacijo z mikrosporidijem in 4 skupine brez inokulacije z mikrosporidijem ter 5 ponovitev v vsaki skupini, to je cca. 1200 čebel. Kletke smo postavili v inkubator, kjer smo vzdrževali temperaturo na 30°C in vlago med 50 in 70%, kot je v panju (Williams in sod. 2012).

Preglednica 1: Shema protokola poskusa, junij – julij 2019. A – Bees-Strong[®], A+N – Bees-Strong[®] + nosema, B – Bees Vita plus[®], B+N – Bees Vita plus[®] + nosema, C – cvetni prah, C+N – cvetni prah + nosema, K – kontrola, K+N – kontrola + nosema).

Skupine	Ponovitve					Prehranski dodatek
	1	2	3	4	5	
A	A1	A2	A3	A4	A5	Bees-Strong [®]
A+N	A1+N	A2+N	A3+N	A4+N	A5+N	Bees-Strong [®] + Nosema
B	B1	B2	B3	B4	B5	Bees Vita plus [®]
B+N	B1+N	B2+N	B3+N	B4+N	B5+N	Bees Vita plus [®] + Nosema
C	C1	C2	C3	C4	C5	Cvetni prah
C+N	C1+N	C2+N	C3+N	C4+N	C5+N	Cvetni prah + Nosema
K	K1	K2	K3	K4	K5	Kontrola-sladkorna pogača
K+N	K1+N	K2+N	K3+N	K4+N	K5+N	Kontrola-sladkorna pogača + Nosema

Mlade čebele v kletkah smo od prvega dne in do konca poskusa hranili s predvidenimi dodatki. Sladkorno pogačo smo pripravili iz sladkorja v prahu in malo vode, toliko da smo dobili gosto zmes. Sladkorno raztopino smo pripravili v razmerju 1 : 1. Uporabili smo 100 g sladkorja, ga prelili s 100 ml vode in ga raztopili s pomočjo magnetnega mešala, raztopini smo dodali 25 ml prehranskega dodatka Bees-Strong[®]. Pogača Bees Vita plus[®] in pogača s cvetnim prahom sta bili pripravljena predhodno. Cvetni prah, uporabljen v pogači, smo pred samim poskusom mikroskopsko pregledali na nosemo. Pripravili smo suspenzijo, kjer smo v 10 ml vode dobro raztopili 1 g cvetnega prahu. Naredili smo tudi test izhlapevanja vode iz prehranskih pripravkov. V naluknjane vrečke smo zapakirali nekaj pogače s cvetnim prahom in Bees Vita plus[®], tako kot smo jih pripravili za čebele, in jih dali v inkubator poleg kletk.

Tretji dan smo polovico čebel s pomočjo mikropipete individualno okužili s spori *Nosema* sp. v sladkorni raztopini 2 µl. Pred tem so bile čebele nekaj ur brez hrane. Čebelo smo prijeli za krila in ji k ustnemu aparatu približali mikropipeto s kapljico raztopine na koncu, počakali smo, da je kapljico posrkala (Malone in sod. 1999). Čebele, ki niso posrkale celotne kapljice, smo odstranili iz poskusa (Higes in sod. 2007).



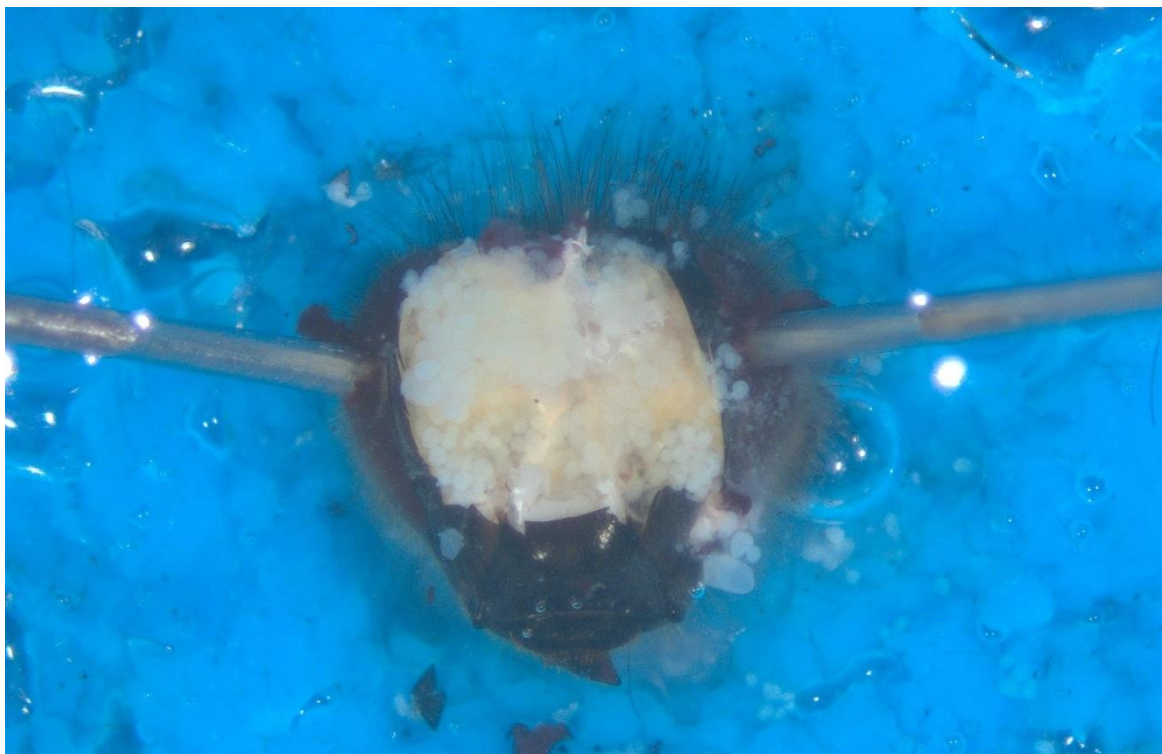
Slika 7: Individualno hranjenje čebele z mikropipeto (Vir: N. Rom).

Dnevno smo spremljali količino hrane (v g in ml), ki so jo čebele zaužile. Na 3. (pred okužbo s sporami), 7., 12., 17., 22., 27., 33. in 38. dan od začetka poskusa (starost čebele) smo odvzeli iz vsake kletke po 2 čebeli za sekcijo hipofaringealnih (goltnih) žlez in za pregled čebel na število spor. Obenem smo na dneve vzorčenja zbrali vse mrtvice iz iste skupine in jih shranili v zamrzovalnik za nadaljnje preiskave na število spor. Na podlagi števila spor smo ugotovili, kako prehranski dodatek vpliva na okužbo čebel s sporami *Nosema* sp. in velikost HPG.

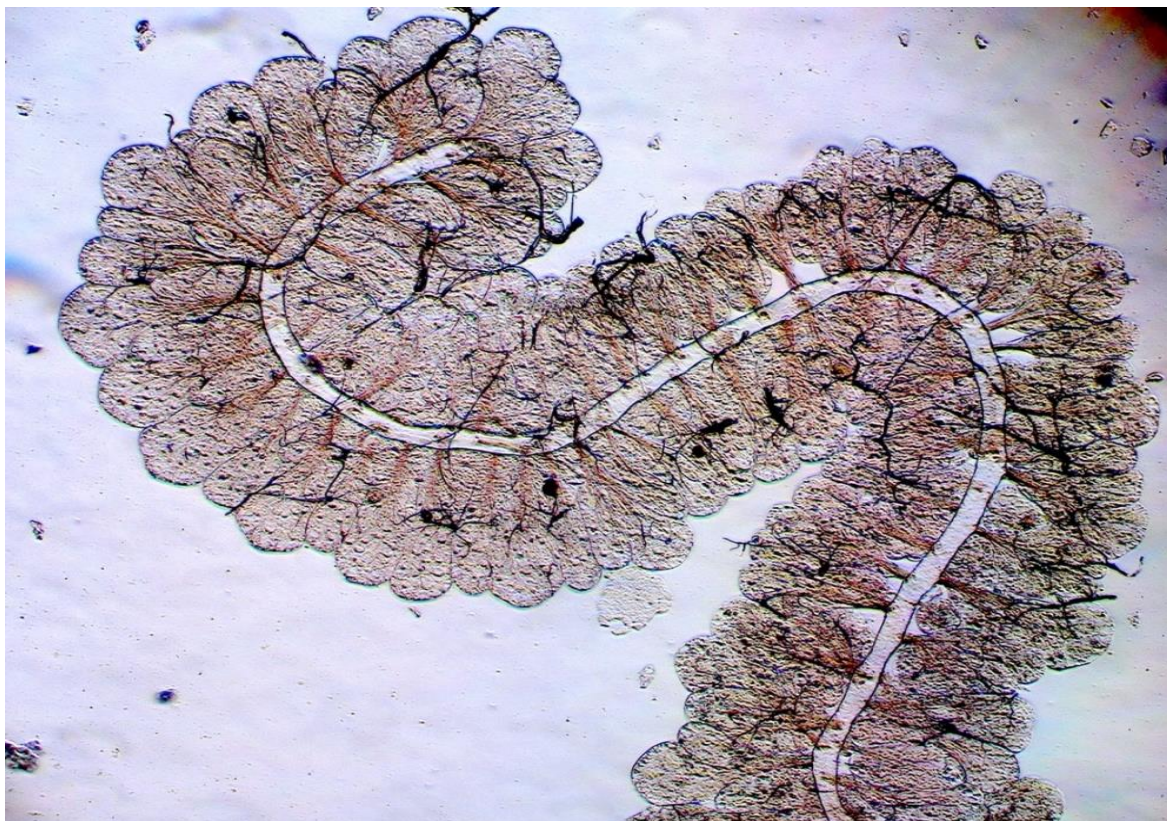
2.4 SEKCIJA HIPOFARINGEALNIH (GOLTNIH) ŽLEZ

Na 3. (pred okužbo s sporami), 7., 12., 17., 22., 27., 33. in 38. dan od začetka poskusa (starost čebele) smo odvzeli iz vsake kletke po 2 čebeli za analize: eno čebelo smo shranili v zamrzovalniku za kasnejši pregled na število spor, drugo pa smo uporabili takoj za izvedbo sekcije hipofaringealnih (goltnih) žlez. Pri tem smo delavko za nekaj minut dali v zamrzovalnik, da je otrpnila in ji odstranili glavo. Glavo smo z dvema entomološkima iglama pritrdili na gumijasto maso (Xantopren® L moder in Aktivator univerzal, Heraeus Kulzer, Nemčija) v manjši stekleni petrijevki in jo prelili z destilirano vodo. Stekleno petrijevko smo postavili pod stereolupo (StereoDiscovery.V12, Zeiss, Nemčija). Odstranili smo hitinski pokrov med sestavljenimi očmi, odstranili žleze skupaj z izvodilom in jih predstavili na

objektno stekelce ter pokrili s krovnim stekelcem. Nativen preparat smo takoj pogledali pod mikroskopom (Axioskop 2 plus, Zeiss, Nemčija) na 100x povečavi, fotografirali z digitalno kamero (AxioCam MRc 5, Zeiss, Nemčija) in shranili slike za nadaljnje meritve premerov mešičkov (acinusov) žlez s programom AxioVs40 V 4.8.2.0, Zeiss, Nemčija. Izmerili smo po 30 premerov pri vsaki od treh čebel iz posamezne skupine in izračunali povprečne premerov acinusov žlez pri posamezni skupini.



Slika 8: Fiksacija glave s pomočjo entomoloških igel in odstranitev obraznega hitina, pod katerim so vidne goltne žleze. 40x povečava (Vir: N. Rom).



Slika 9: Goltne žleze čebele iz skupine, hranjene s cvetnim prahom pri starosti 17 dni (Vir: N. Rom).



Slika 10: Goltne žleze čebele iz kontrolne skupine pri starosti 17 dni (Vir: N. Rom).

2.5 PREHRANSKA ANALIZA

Analiza aminokislinske sestave prehranskih dodatkov in weendska analiza oz. kemična analiza krme sta bili opravljene v Centralnem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije. Analiza se uporablja za proste in celotne aminokisliline v krmi z uporabo analizatorja aminokislilin. Analizirane aminokisliline se ločijo z ionsko izmenjevalno kromatografijo in določijo z reakcijo z ninhidrinom s fotometrično detekcijo pri 570 nm (Uredba komisije ES, EC Priloga III F MOD, 2009, 152/2009). Naredili smo primerjavo vrednosti desetih esencialnih aminokislilin, povzetih po raziskavi DeGroot (1953), in vrednosti, ki smo jih dobili pri analizi uporabljenih prehranskih dodatkov. Weendska analiza je pokazala vsebnosti različnih kemijskih skupin hranilnih snovi. Določeni so bili: vsebnost vode in suhe snovi, surove beljakovine (vsota pravih beljakovin, prostih aminokislilin, amidov, kislih amidov, enostavnih peptidov in dušik vsebujoče glikozide), surove maščobe (vsota trigliceridov, sterinov, fosfatidov, klorofilov, voskov, eteričnih olj, organskih kislin), surove vlaknine (vsota celuloze, lignina, kutina, pentozanov), surovi pepel (vsota glin, peska in čistega pepela – makro in mikrorudnine) ter brezdušični izvleček (vsota škroba, glikogena, vseh vrst sladkorjev, pektinov, inulina, hemiceluloz, topnega dela celuloze, lignina in pentozanov), ki opisuje vsebnost topnih ogljikovih hidratov v vzorcu in ga izračunamo tako, da od mase sveže snovi vzorca krme odštejemo mase vseh skupin hranilnih snovi (Orešnik in Kermauner 2009).

2.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV POSAMEZNIH PARAMETROV

Podatke smo vnesli v preglednice programa Microsoft Office Excel. Statistično analizo smo naredili s statističnim paketom R 3.6.0, z orodjem Rstudio 1.2.1335. Za prikaz preživetja čebel pri različnih dodatkih smo uporabili Kaplan-Meierjevo krivuljo. Ker spremenljivke niso bile normalno razporejene smo uporabili Mann-Whitneyev U test. Preverili smo, ali obstajajo statistično značilne razlike med premeri hipofaringealnih žlez in prehranskimi dodatki ter med prehranskimi dodatki in številom spor. Računali smo povprečno količino hrane, ki so jo čebele porabile pri različnih dodatkih in standardni odklon.

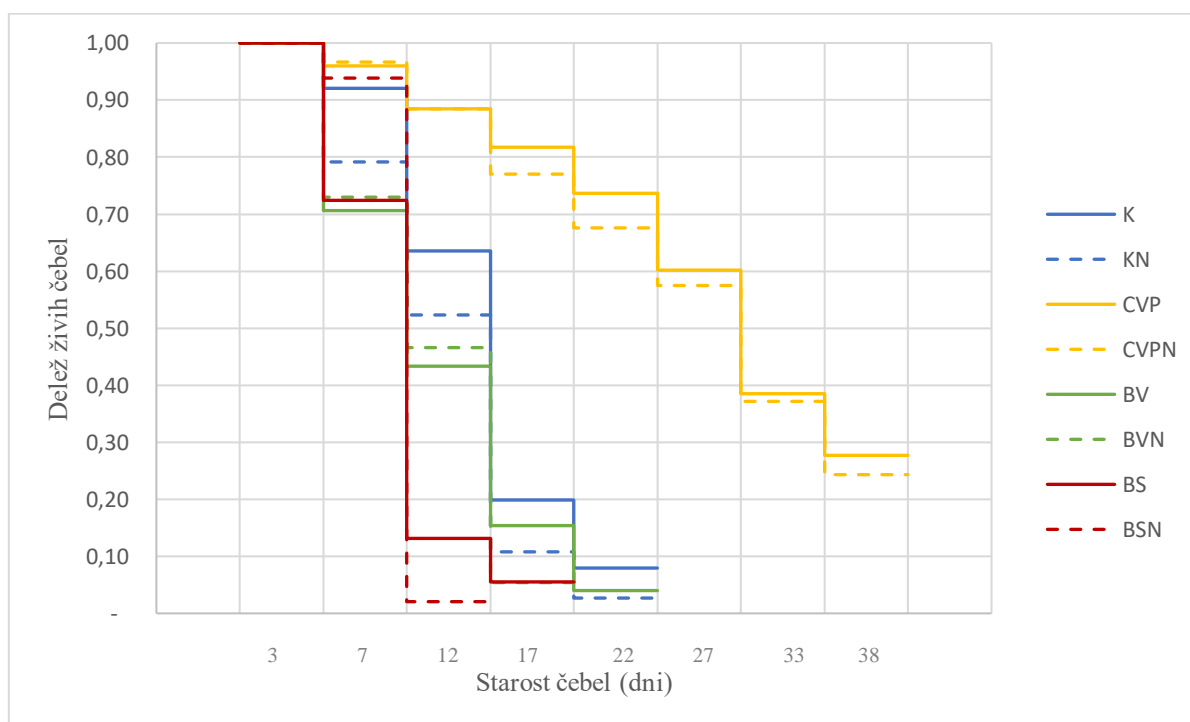
3 REZULTATI

Preglednica 2: Prikaz starosti čebel (dni) na določeno vzorčenje.

	1. vzorčenje	2. vzorčenje	3. vzorčenje	4. vzorčenje	5. vzorčenje
Starost čebel (dni)	7	12	17	22	27

3.1 SMRTNOST ČEBEL PRI RAZLIČNIH SKUPINAH

Smrtnost čebel smo spremljali v intervalu petih dni. Mrtvice (mrtve čebele) smo pobrali in shranili za kasnejši pregled na številčnost spor *Nosema* sp. Takoj, na prvi dan poskusa, je bilo največ odmiranja pri Bees vita plus[®]. Do 1. vzorčenja (7 dni) je bil manjši upad še pri kontrolni skupini, ki je bila inokulirana. Čebele so najhitreje odmirale pri Bees-Strong[®], tako inokulirane kot neinokulirane. Samo 8 čebel je preživel do 3. vzorčenja (17 dni). Bees Vita plus[®] inokulirana skupina je preživela do 3. vzorčenja (17 dni), neinokulirana skupina pa do 4. vzorčenja (22 dni). Kontrola je pri obeh skupinah preživela do 4. vzorčenja (22 dni). Najpočasnejše se je zmanjševalo število preživelih čebel, hranjenih s cvetnim prahom. Ko smo zaključili s poskusom na 42. dan, je pri neinokuliranih čebelah ostalo 23 živih čebel, pri inokuliranih pa 19.

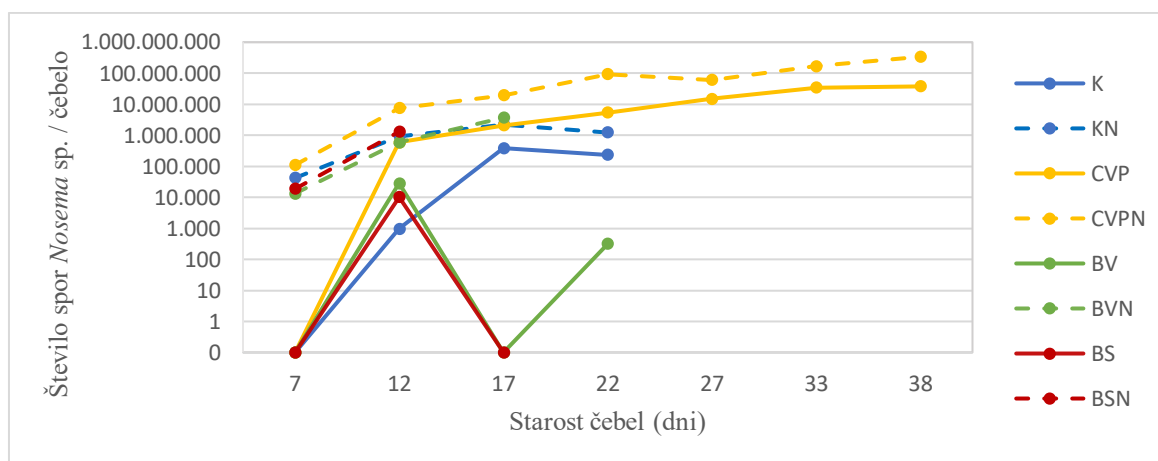


Slika 11: Kaplan-Meierjeva krivulja ali krivulja preživetja v deležih. V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (K – kontrola, KN – kontrola + nosema, CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + nosema, BV – Bees Vita plus[®], BVN – Bees Vita plus[®] + nosema, BS – Bees-Strong[®], BSN – Bees-Strong[®] + nosema).

3.2 PRISOTNOST SPOR *NOSEMA* SP. V ČREVESJU ČEBEL

Prvi dan po izleganju mladih delavk smo na prisotnost spor *Nosema* sp. individualno pregledali 50 čebel. Pri nobeni nismo opazili spor *Nosema* sp.

Prisotnost spor smo pri inokuliranih čebelah opazili že pri 1. vzorčenju, 4. dan po inokulaciji (starost čebel 7 dni). Pri neinokuliranih skupinah smo nepričakovano opazili spore pri drugem vzorčenju, 9. dan po začetku poskusa (starost čebel 12 dni) in vse do konca. Število spor pri vseh skupinah je s starostjo čebel naraščalo, razen pri neinokulirani skupini Bees Vita plus[®] in Bees-Strong[®], kjer je količina nihala med vzorčenji (Slika 12).



Slika 12: Razvoj spor *Nosema* sp. pri testnih čebelah. Slika predstavlja logaritmirano povprečje spor individualno pregledanih vzorcev čebel. V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (K – kontrola, KN – kontrola + nosema, CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + nosema, BV – Bees Vita plus[®], BVN – Bees Vita plus[®] + nosema, BS – Bees-Strong[®], BSN – Bees-Strong[®] + nosema).

Največ spor smo pri vsakem vzorčenju našli pri čebelah skupine, hranjene s cvetnim prahom. Število spor inokulirane skupine je bilo ob 1. vzorčenju povprečno 110.880 ± 108.456 , 2. vzorčenju $7.600.000 \pm 4.820.025$, 3. vzorčenju $19.400.000 \pm 3.456.796$, 4. vzorčenju $93.840.000 \pm 111.292.221$, 5. vzorčenju $60.720.000 \pm 29.941.169$, 6. vzorčenju $171.200.000 \pm 103.919.969$ in ob zadnjem, 7. vzorčenju na 38. dan $338.400.000 \pm 287.294.692$. Pri neinokulirani skupini pri 1. vzorčenju ni bilo prisotnih spor, pri 2. vzorčenju je bilo povprečno 599.680 ± 756.722 spor, 3. vzorčenju $2.100.000 \pm 2.920.368$, 4. vzorčenju $5.388.000 \pm 10.546.213$, 5. vzorčenju $14.835.200 \pm 10.298.755$, 6. vzorčenju $34.160.000 \pm 6.638.554$ in ob zadnjem, 7. vzorčenju na 38. dan $37.680.000 \pm 19.801.252$ spor. Med inokulirano in neinokulirano skupino čebel, hranjenih s cvetnim prahom (Preglednica 4) smo ugotovili statistično značilne razlike pri 1. (**, MW=0, P=0,007), 2. (*, MW=1, P=0,021), 3. (**, MW=0, P=0,008) in 4. vzorčenju (*, MW=1, P=0,016), razen pri 5. vzorčenju (NS, MW=3, P=0,056). Med primerjavo kontrole in cvetnega prahu (inokulirani skupini; Preglednica 3) so bile statistično značilne razlike pri 2. (*, MW=1, P=0,016), 3. (**, MW=0, P=0,008) in 4. vzorčenju (*, MW=0, P=0,016).

Pri 1. in 2. vzorčenju je bilo najmanj spor pri inokulirani skupini, hranjeni z Bees Vita plus[®], pri 3. vzorčenju je bilo število spor v tej skupini že približno šestkrat večje. Spor je bilo tudi več kot pri kontrolni skupini. Ob 1. vzorčenju je bilo povprečno 13.360 ± 5.237 spor, 2. vzorčenju 588.800 ± 616.505 in 3. vzorčenju $3.688.000 \pm 3.107.194$ spor. Pri neinokulirani skupini ob 1. in 3. vzorčenju ni bilo prisotnih spor, 2. vzorčenju je bilo povprečno 28.400 ± 50.643 spor in 4. vzorčenju 320 ± 640 spor. Med inokulirano in neinokulirano skupino Bees Vita plus[®] (Preglednica 4) so bile statistično značilne razlike pri 1. (**, MW=0, P=0,007), 2. (*, MW=2, P=0,034) in 3. vzorčenju (**, MW=0, P=0,007). V primerjavi skupine Bees Vita plus[®] s kontrolo nismo ugotovili statistično značilnih razlik (Preglednica 3).

Pri skupini Bees-Strong[®] je bilo ob 1. vzorčenju povprečno število spor 18.800 ± 19.896 , pri 2. vzorčenju, ki je bilo tudi zadnje, pa $1.312.000 \pm 922.992$ spor. Pri neinokulirani skupini ni bilo prisotnih spor pri 1. in 3. vzorčenju, medtem ko je bilo pri 2. vzorčenju povprečno 10.240 ± 19.302 spor. Med inokulirano in neinokulirano skupino Bees-Strong[®] smo pri 1. (*, MW=2,5, P=0,025) in 2. vzorčenju (*, MW=0, P=0,032) ugotovili statistično značilne razlike. V primerjavi skupine Bees-Strong[®] s kontrolo nismo ugotovili statistično značilnih razlik (Preglednica 3).

Kontrolna skupina je imela ob 1. vzorčenju povprečno 42.080 ± 29.116 spor, 2. vzorčenju 932.800 ± 740.868 , 3. vzorčenju $2.197.600 \pm 549.103$ in 4. vzorčenju $1.251.000 \pm 302.501$. Neinokulirana skupina pri 1. vzorčenju ni imela prisotnih spor, pri 2. vzorčenju je bilo povprečno 960 ± 1920 spor, 3. vzorčenju 385.600 ± 149.122 in 4. vzorčenju 233.760 ± 294.014 . Med inokulirano in neinokulirano kontrolno skupino smo ugotovili statistično značilne razlike na vse dneve vzorčenja (Preglednica 4). Kljub pojavu spor pri vseh skupinah je bilo več spor zaznani pri inokuliranih skupinah.

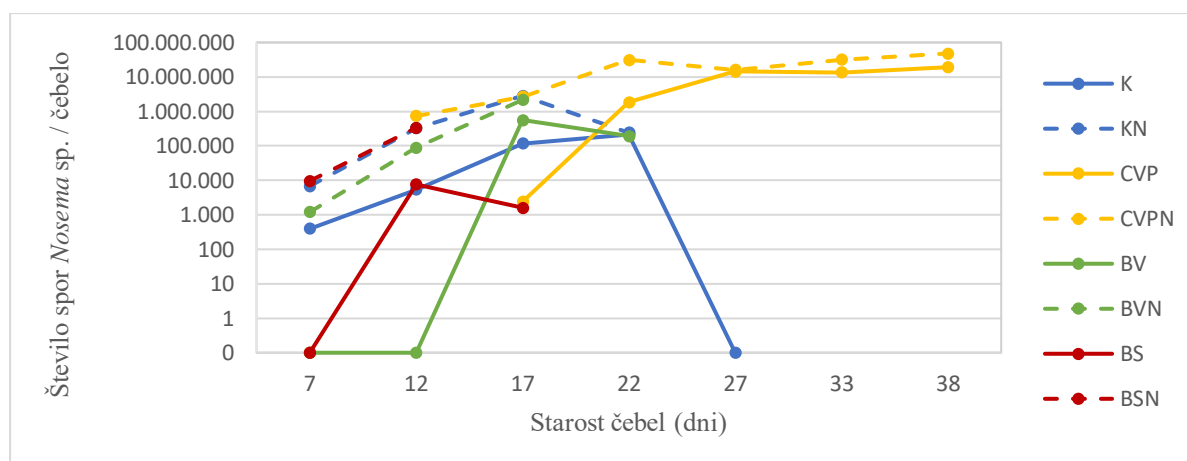
Preglednica 3: P-vrednost primerjave števila spor noseme neinokuliranih skupin za vsako testno skupino s kontrolo, za vsa vzorčenja. Vrednosti P so prikazane z barvami: modre celice prikazujejo vrednosti $P \leq 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,005$ (*, **, ***) in zelene celice $P > 0,05$ (NS). KN – kontrola + nosema, CVPN – cvetni prah + nosema, BVN - Bees Vita plus[®] + nosema in BSN - Bees-Strong[®] + nosema, 1 - prvo vzorčenje, 2 - drugo vzorčenje, 3 – tretje vzorčenje in 4 – četrto vzorčenje. Uporabljen je bil Mann-Whitneyev U test.

	KN1	KN2	KN3	KN4
CVPN1	0,310			
CVPN2		0,016		
CVPN3			0,008	
CVPN4				0,016
BVN1	0,151			
BVN2		0,691		
BVN3			1,000	
BSN1	0,222			
BSN2		0,571		

Preglednica 4: P-vrednost števila spor noseme med inokuliranimi in neinokuliranimi skupinami za vsako vzorčenje. Vrednosti P so prikazane z barvi: modre celice prikazujejo vrednosti $P \leq 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,005$ (*, **, ***) in zelene celice $P > 0,05$ (NS). K – kontrola, CVP – cvetni prah, BV - Bees Vita plus[®], BS - Bees-Strong[®], KN – kontrola + nosema, CVPN – cvetni prah + nosema, BVN - Bees Vita plus[®] + nosema in BSN - Bees-Strong[®] + nosema, 1 - prvo vzorčenje, 2 - drugo vzorčenje, 3 – tretje vzorčenje, 4 – četrto vzorčenje in 5 - peto vzorčenje. Uporabljen je bil Mann-Whitneyev U test.

	K1	K2	K3	K4	CVP1	CVP2	CVP3	CVP4	CVP5	BV1	BV2	BV3	BS1	BS2
KN1	0,007													
KN2		0,010												
KN3			0,008											
KN4				0,019										
CVPN1					0,007									
CVPN2						0,021								
CVPN3							0,008							
CVPN4								0,016						
CVPN5									0,056					
BVN1										0,007				
BVN2											0,034			
BVN3												0,007		
BSN1													0,025	
BSN2														0,032

Na prisotnost spor *Nosema sp.* smo pregledali tudi mrtvice, ki smo jih pobirali na dneve vzorčenja. Prav tako smo ugotovili, da je največ spor prisotnih pri čebelah skupine, hranjene s cvetnim prahom, več spor je bilo pri inokulirani skupini. Od inokuliranih skupin je bilo najmanj spor pri skupini, hranjeni z Bees Vita plus[®] (Slika 13).



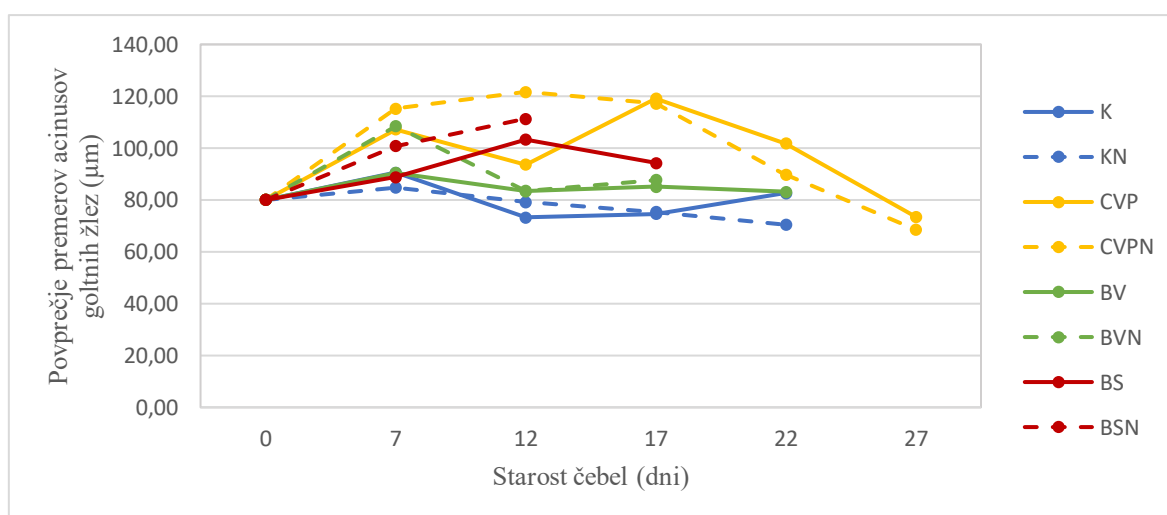
Slika 13: Razvoj spor *Nosema sp.* pri mrtvicah testnih čebel. Slika predstavlja logaritmirano povprečje spor skupnega vzorca mrtvic posameznih skupin. V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (K – kontrola, KN – kontrola + nosema, CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + nosema, BV – Bees Vita plus[®], BVN – Bees Vita plus[®] + nosema, BS – Bees-Strong[®], BSN – Bees-Strong[®] + nosema).

3.3 MORFOLOŠKE MERITVE HIPOFARINGEALNIH ŽLEZ

Neinokulirane delavke so imele v povprečju med 7. in 27. dnevom pri hranjenju s cvetnim prahom premer acinusov $99,04 \mu\text{m} \pm 15,23 \mu\text{m}$, z Bees-Strong® $95,44 \mu\text{m} \pm 5,97 \mu\text{m}$, z Bees Vita plus® $85,50 \mu\text{m} \pm 2,93 \mu\text{m}$ in s sladkorno pogačo (kontrola) $80,30 \mu\text{m} \pm 6,94 \mu\text{m}$. Inokulirane delavke so imele v povprečju med 7. in 27. dnevom premer acinusov pri hranjenju z Bees-Strong® $106,07 \mu\text{m} \pm 5,29 \mu\text{m}$, s cvetnim prahom $102,50 \mu\text{m} \pm 20,32 \mu\text{m}$, z Bees Vita plus® $93,19 \mu\text{m} \pm 10,91 \mu\text{m}$ in s sladkorno pogačo (kontrola) $77,45 \mu\text{m} \pm 5,23 \mu\text{m}$.

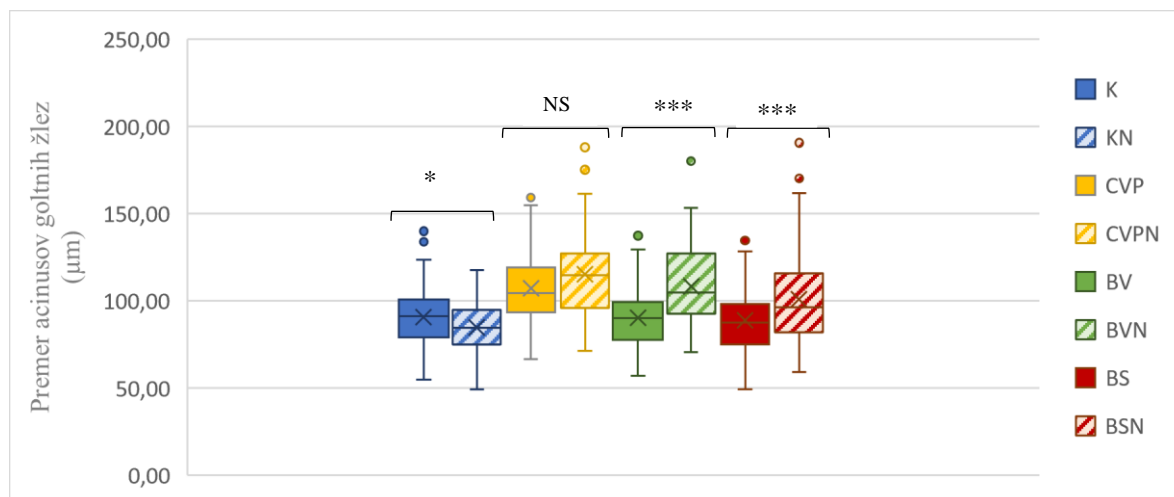
Iz slike 14 je razvidno, da se je povprečna vrednost premerov acinusov od dneva 0 do dneva 7 (1. vzorčenje) pri vseh skupinah povečala. Pri čebelah neinokulirane kontrolne skupine se je povprečje premerov acinusov zmanjševalo od 1. vzorčenja naprej, pri 3. in 4. vzorčenju pa nekoliko povečalo. Pri neinokuliranih čebelah iz skupine »cvetni prah« je povprečje premerov pri 2. vzorčenju nepričakovano upadlo, se pri 3. vzorčenju povečalo in potem spet upadlo. Upad pri 2. vzorčenju pripisujemo napaki pri pripravi preparata, saj je bilo premalo vode na preparatu in so se žleze morda nepovratno skrčile. Pri neinokuliranih čebelah, hranjenih z Bees Vita plus® je povprečje premerov večje pri 1. in 3. vzorčenju, pri neinokuliranih čebelah, hranjenih z Bees-Strong® pa je naraščalo do 2. vzorčenja in potem padalo.

Pri inokuliranih čebelah kontrolne skupine je povprečje premerov acinusov od 1. vzorčenja naprej padalo, pri skupini »cvetni prah« je naraščalo do 2. vzorčenja in potem padalo, medtem ko je pri skupini »Bees Vita plus®« upadalo med 1. in 2. vzorčenjem, pri 3. pa spet nekoliko narastlo. Pri skupini »Bees-Strong®« je povprečje premerov naraščalo do 2. vzorčenja, ki je bilo tudi zadnje.



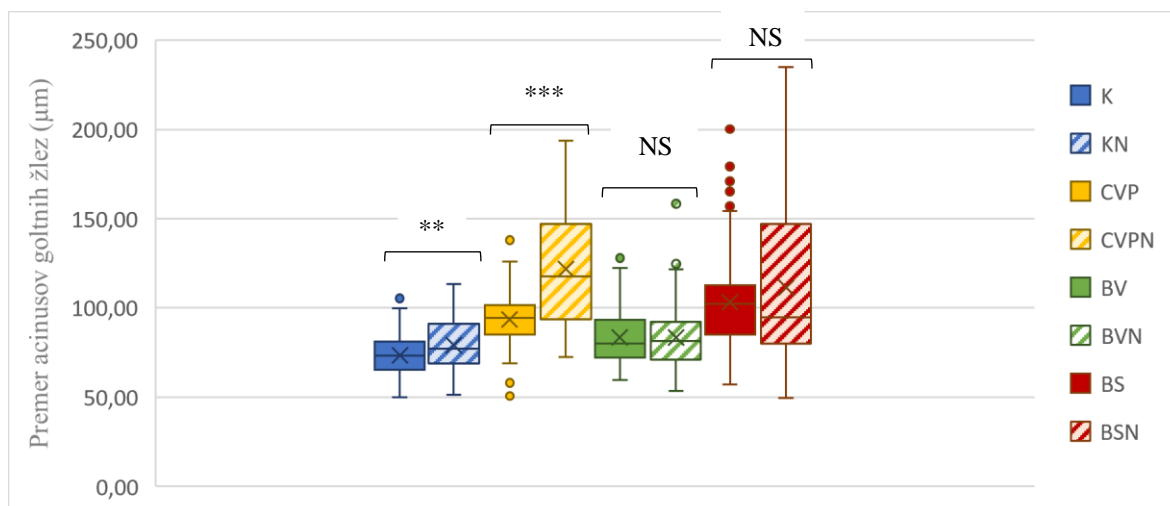
Slika 14: Pregledni prikaz povprečja premerov acinusov goitnih žlez. Začetna vrednost $80 \mu\text{m}$ je povzeta po literaturi (Crailsheim in Stolberg 1989; Deseyn in Billen 2005). V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (K – kontrola, KN – kontrola + noseema, CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + noseema, BV – Bees Vita plus®, BVN – Bees Vita plus® + noseema, BS – Bees-Strong®, BSN – Bees-Strong® + noseema).

Pri starosti 7 dni (1. vzorčenje), ko še ni bilo zaznanih spor, lahko razberemo, da je premer acinusov večji pri inokuliranih čebelah kot pri neinokuliranih z izjemo pri kontrolni skupini (Slika 15). Na 7. dan smo med inokuliranimi in neinokuliranimi čebelami ugotovili statistično značilne razlike pri kontrolni skupini (*, $MW=4820,5$, $P=0,028$), pri »Bees Vita plus[®]« (***, $MW=2083$, $P=0,000$) in pri »Bees-Strong[®]« (***, $MW=2961,5$, $P=0,002$), medtem ko pri »cvetnem prahu« ni bilo statistično značilnih razlik (NS, $MW=2471,5$, $P=0,054$) (Preglednica 5).



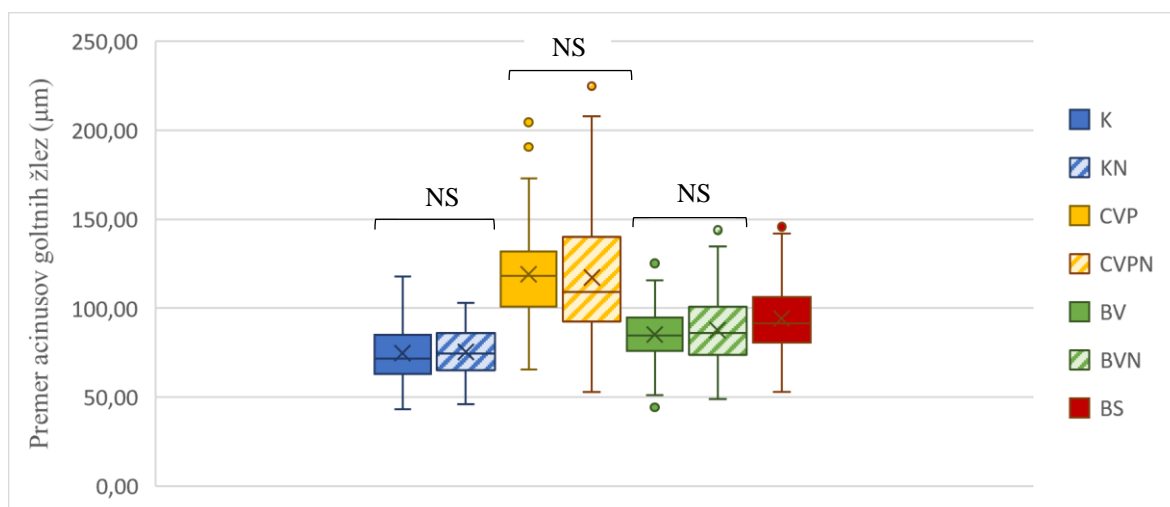
Slika 15: Premeri acinusov goltnih žlez pri starosti 7 dni (1. vzorčenje), ko še ni bilo zaznanih spor *Nosema* sp. pri neokuženih čebelah. V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (K – kontrola, KN – kontrola + nosema, CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + nosema, BV – Bees Vita plus[®], BVN – Bees Vita plus[®]+ nosema, BS – Bees-Strong[®], BSN – Bees-Strong[®] + nosema). Uporabljen je bil Mann Whitney U test.

Pri 2. vzorčenju so bile spore prisotne pri vseh skupinah. Premeri acinusov so bili večji pri inokuliranih skupinah »kontrola«, »cvetnega prahu« in »Bees-Strong[®]«. Pri »Bees Vita plus[®]« so bili premeri približno enaki (Slika 16). Statistično značilne razlike med inokuliranimi in neinokuliranimi skupinami so bile pri kontroli (**, $MW=3190,5$, $P=0,014$) ter cvetnem prahu (***, $MW=1952,5$, $P=0,000$).



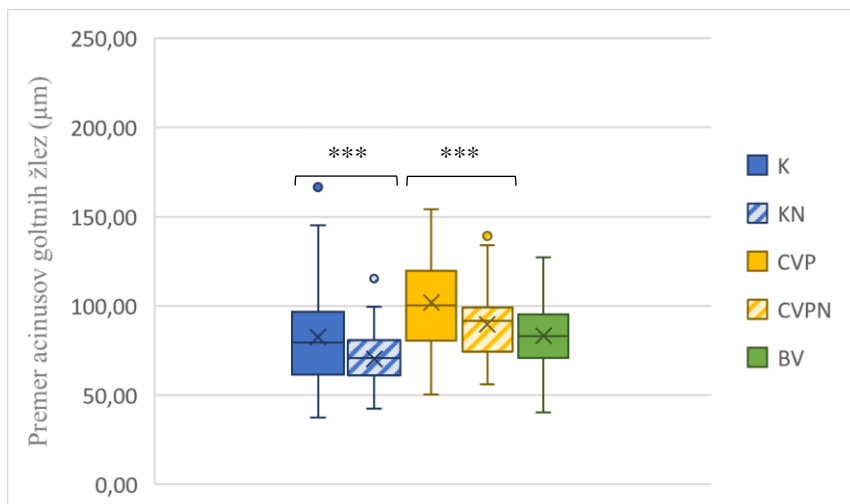
Slika 16: Premeri acinusov goltnih žlez pri starosti 12 dni (2. vzorčenje). V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (K – kontrola, KN – kontrola + nosema, CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + nosema, BV – Bees Vita plus®, BVN – Bees Vita plus®+ nosema, BS – Bees-Strong®, BSN – Bees-Strong® + nosema). Uporabljen je bil Mann Whitney U test.

Pri 3. vzorčenju so bile vrednosti premerov acinusov med inokuliranimi in neinokuliranimi skupinami približno enake (Slika 17). Pri nobeni skupini ni bilo statistično značilnih razlik med inokulirano in neinokulirano skupino (Preglednica 5).



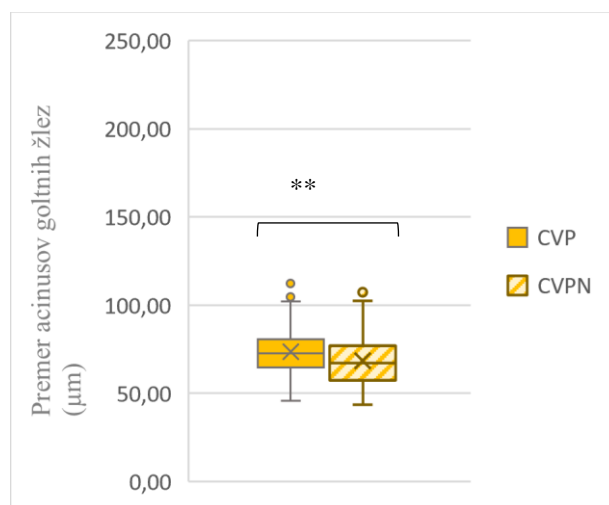
Slika 17: Premeri acinusov goltnih žlez pri starosti 17 dni (3. vzorčenje). V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (K – kontrola, KN – kontrola + nosema, CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + nosema, BV – Bees Vita plus®, BVN – Bees Vita plus®+ nosema, BS – Bees-Strong®).

Pri 4. vzorčenju so bili premeri acinusov manjši pri inokuliranih skupinah (Slika 18). Statistično značilne razlike med inokuliranimi in neinokuliranimi skupinami so bile pri »kontrolni« (***, MW=5144, P=0,002) ter »cvetnem prahu« (***, MW=5264, P=0,001).



Slika 18: Premeri acinusov goltnih žlez pri starosti 22 dni (4. vzorčenje). V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (K – kontrola, KN – kontrola + nosema, CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + nosema, BV – Bees Vita plus®).

Pri 5. vzorčenju sta ostali samo še skupini, hranjeni s cvetnim prahom. Premeri acinusov so bili nekoliko manjši pri inokulirani skupini (Slika 19). Med inokulirano in neinokulirano skupino je bila statistično značilna razlika (**, MW=4922, P=0,013).



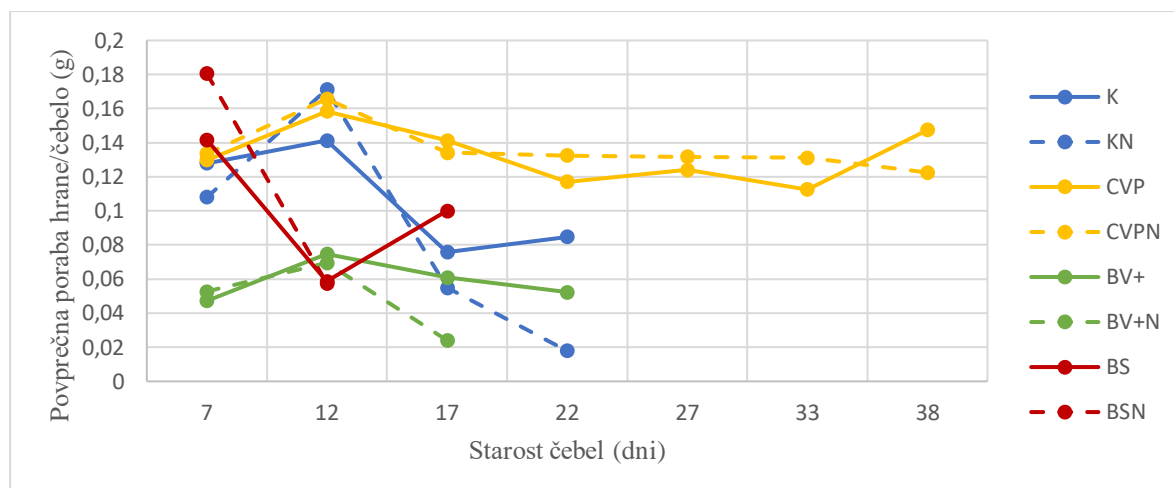
Slika 19: Premeri acinusov goltnih žlez pri starosti 27 dni (5. vzorčenje). V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + nosema).

Preglednica 5: P-vrednost primerjave premerov goltnih žlez med inokuliranimi in neinokuliranimi skupinami za vsako vzorčenje. Vrednosti P so prikazane z barvami: modre celice prikazujejo vrednosti $P \leq 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,005$ (*, **, ***) in zelene celice $P > 0,05$ (NS). K – kontrola, CVP – cvetni prah, BV - Bees Vita plus[®], BS - Bees-Strong[®], KN – kontrola + nosema, CVPN – cvetni prah + nosema, BVN - Bees Vita plus[®] + nosema in BSN - Bees-Strong[®] + nosema, 1 - prvo vzorčenje, 2 - drugo vzorčenje, 3 – tretje vzorčenje, 4 – četrto vzorčenje in 5 - peto vzorčenje. Uporabljen je bil Mann Whitney U test.

	K1	K2	K3	K4	CVP1	CVP2	CVP3	CVP4	CVP5	BV1	BV2	BV3	BS1	BS2
KN1	0,028													
KN2		0,014												
KN3			0,475											
KN4				0,002										
CVPN1				0,054										
CVPN2					0,000									
CVPN3						0,293								
CVPN4							0,001							
CVPN5								0,013						
BVN1									0,000					
BVN2										0,907				
BVN3											0,736			
BSN1													0,002	
BSN2														0,882

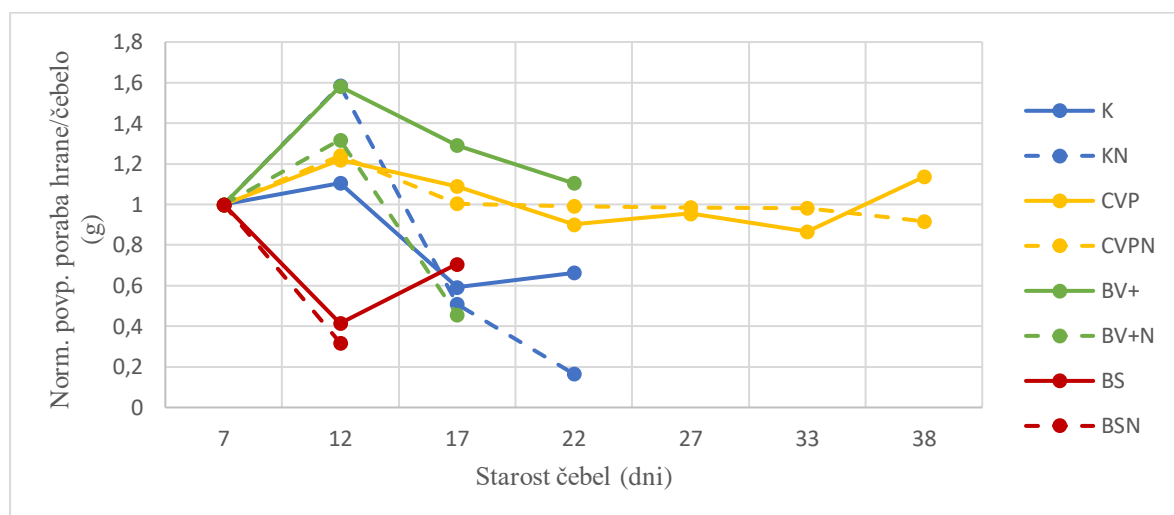
3.4 PORABA HRANE

Na začetku so največ hrane pojedle inokulirane in neinokulirane čebele, hranjene z Bees-Strong[®]. Ob 2. vzorčenju smo beležili največ porabljenih hrane pri inokulirani kontrolni skupini in pri obeh skupinah, hranjenih s cvetnim prahom. Kasneje so največ pojedle čebele, hranjene s cvetnim prahom, kot tudi sicer v trajanju celotnega poskusa. Najmanj so pojedle čebele, hranjene z Bees Vita plus[®] (Slika 20). Povprečna poraba hrane 1 delavke v 1 dnevu pri »kontrolni« je bila 0,24 g, pri »cvetnem prahu« je bila 0,16 g, pri »Bees Vita plus[®]« 0,11 g in pri »Bees-Strong[®]« 0,49 g.



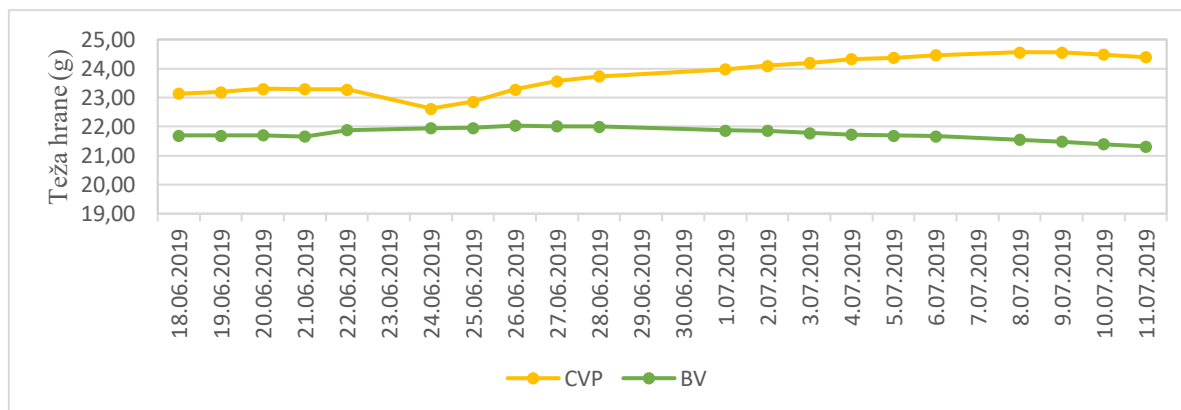
Slika 20: Povprečna poraba hrane, preračunana na eno čebelo. V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (K – kontrola, KN – kontrola + nosema, CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + nosema, BV – Bees Vita plus[®], BVN – Bees Vita plus[®] + nosema, BS – Bees-Strong[®], BSN – Bees-Strong[®] + nosema).

Porabo hrane smo normalizirali glede na porabo do 1. vzorčenja, tako smo videli dinamiko prehranjevanja. Iz slike 21 je razvidno, da je do 2. vzorčenja tek upadel čebelam, hranjenim z Bees-Strong[®], neinokulirani skupini pa se je do 3. vzorčenja zopet povečal. Ostalim skupinam se je tek do 2. vzorčenja povečal, predvsem pri inokulirani kontrolni skupini in neinokulirani skupini, hranjeni z Bees Vita plus[®]. Do 3. vzorčenja se je tek pri vseh skupinah zmanjšal, predvsem pri obeh – inokulirana in neinokulirana – kontrolnih skupinah in inokulirani skupini, hranjeni z Bees Vita plus[®]. Do 4. vzorčenja se je tek nekoliko povečal pri kontrolni neinokulirani skupini. Pri dveh skupinah čebel, hranjenih s cvetnim prahom, opazimo nihanje porabe hrane med vzorčenji.



Slika 21: Povprečna poraba hrane na čebelo normalizirana na porabo do 1. vzorčenja. V desnem stolpcu so oznake posameznih skupin (K – kontrola, KN – kontrola + nosema, CVP – cvetni prah, CVPN – cvetni prah + nosema, BV – Bees Vita plus[®], BVN – Bees Vita plus[®] + nosema, BS – Bees-Strong[®], BSN – Bees-Strong[®] + nosema).

Test izhlapevanja vode iz prehranskih pripravkov nam je pokazal, da je imelo izhlapevanje minimalen vpliv na pogače, zato tega nismo upoštevali pri nobeni meritvi (Slika 22). Začetna vrednost cvetnega prahu je bila 23,13 g, povprečna vrednost tekom poskusa je bila 23,78 g \pm 0,61 g. Začetna vrednost Bees Vita plus[®] je bila 21,69 g, povprečna vrednost tekom poskusa pa 21,75 g \pm 0,20 g.



Slika 22: Test izhlapevanja vode iz cvetnega prahu (CVP) in prehranskega dodatka Bees Vita plus[®] (BV) po dnevih.

3.5 ANALIZA KRME

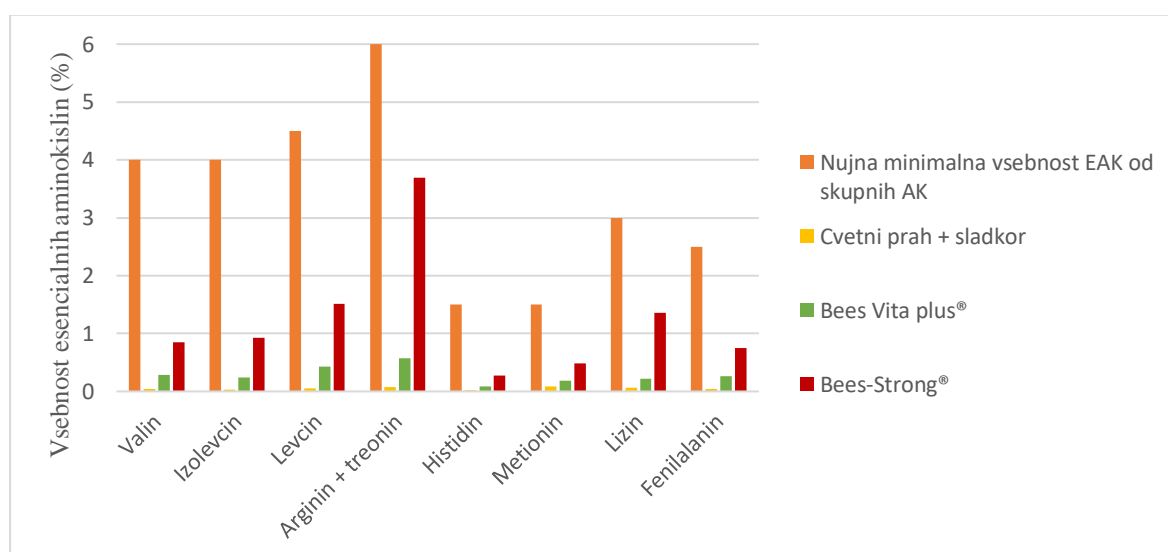
Po naši analizi je bilo surovih beljakovin v cvetnem prahu 9,6 g/kg (0,96%), v Bees Vita plus[®] 58,1 g/kg (5,81%) in v Bees-Strong[®] 255,3 g/kg (22,53%) (Preglednica 6). V cvetnem prahu je najvišjo količino dosegla aminobutanojska kislina (0,47%), Bees Vita plus[®] je imel najvišjo vsebnost glutaminske kisline (0,71%) in Bees-Strong[®] asparagina (4,21%) (Preglednica 7). Nobena od teh AK ni esencialna. Vsi prehranski dodatki so vsebovali po 9 esencialnih aminokislin (EAK), vsebnosti triptofana s to analizo ni bilo moč določiti. Zaradi slabe ločitve med argininom in treoninom, je vrednost podana kot vsota. Najvišjo vsebnost med esencialnimi aminokislinami je pri cvetnem prahu imel metionin (0,09%), pri Bees Vita plus[®] arginin + treonin (0,57%) in pri Bees-Strong[®] prav tako arginin + treonin (3,68). Iz slike 23 je razvidno, da je vsebnost EAK obeh dodatkov in cvetnega prahu manjša, kot je navedeno v literaturi.

Preglednica 6: Weendska analiza z vrednostmi vsebovane vlage, surovih beljakovin, surovih vlaknin, surovega pepela in surovih maščob ter izračunani brezdušični izvleček.

	Cvetni prah + sladkor	Bees Vita plus [®]	Bees-Strong [®]
Surove beljakovine (g/kg)	9,6	58,1	255,3
Surove vlaknine (g/kg)	<10	<10	NA
Surovi pepel (g/kg)	1	6	2
Surova olja in maščobe (g/kg)	<1	1	<1
Vlaga v krmi (g/kg)	73	152	NA
Brezdušični izvleček (g/kg)	905,4	772,9	NA

Preglednica 7: Vsebnost aminokislin (AK) v posameznem dodatku in nujna minimalna vrednost esencialnih aminokislin (EAK - odebeljeno) od skupnih aminokislin (DeGroot 1953) v prehrani čebel (%).

	Nujna minimalna vsebnost EAK od skupnih AK	Cvetni prah + sladkor	Bees Vita plus®	Bees-Strong®
Skupno aminokisliline		1,34	5,55	22,07
Seštevek EAK	27	0,41	2,29	9,85
Valin	4	0,04	0,29	0,85
Izolevcin	4	0,03	0,24	0,93
Leucin	4,5	0,05	0,43	1,51
Arginin+treonin	6	0,08	0,57	3,69
Histidin	1,5	0,02	0,09	0,27
Metionin	1,5	0,09	0,19	0,49
Lizin	3	0,06	0,22	1,36
Fenilalanin	2,5	0,04	0,26	0,75
Cistein		0,02	0,09	1,17
Asparagin		0,09	0,53	4,21
Serin		0,05	0,34	1,39
Glutaminska kislina		0,09	0,71	1,05
Glicin		0,04	0,26	1,34
Alanin		0,05	0,40	1,57
Aminobutanojska kislina		0,47	0,49	0,49
Prolin		0,09	0,23	0,38
Tirozin		0,03	0,21	0,62



Slika 23: Vsebnost esencialnih aminokislin v Bees Vita plus®, Bees Strong® in cvetnemu prahu v primerjavi s podatki iz literature (De Groot 1953).

4 DISKUSIJA

4.1 SMRTNOST ČEBEL PRI RAZLIČNIH SKUPINAH

Na podlagi dobljenih rezultatov smo sprejeli hipotezo, da prehranska dodatka in cvetni prah vplivajo na dolgoživost čebel. Cvetni prah je vplival pozitivno, saj so čebele teh skupin preživele najdlje kljub ogromnemu številu spor. Ko smo zaključili s poskusom na 42. dan, je pri neokuženih čebelah ostalo 23 živih čebel, pri okuženih pa 19. Negativni vpliv je imel dodatek Bees-Strong[®], saj nam je do 3. vzorčenja ostalo samo 8 čebel v eni kletki. Bees Vita plus[®] se je odrezal le malo bolje, kjer je neokužena skupina preživela do 4. vzorčenja (22 dni). Na prvi dan poskusa smo beležili več odmiranja pri tej skupini, kar pa ni bilo posledica prehrane. Pogača v pokrovčkih je bila zelo lepljiva in se je nekaj čebel prilepilo in utopilo v njej. Zato smo v nadaljevanju poskusa pakirali pogačo Bees Vita plus[®] in pogačo iz cvetnega prahu v manjše vrečke z luknjami, ki so omogočale dostop do hrane. Čebele kontrolne skupine, hranjene s sladkorno pogačo, so živele do 4. vzorčenja (22 dni) v našem poskusu. Pri teh čebelah smo pričakovali daljšo življenjsko dobo, saj sta Barker in Lehner (1978) dokazala, da lahko čebele v kletkah, ki jih hranimo izključno z ogljikovimi hidrati, preživijo več tednov. Najdlje preživijo na saharozi, kar smo tudi uporabili. Tudi Pirk in sod. (2010) so ugotovili, da so odrasle čebele dlje preživele na prehrani z nižjim razmerjem med beljakovinami in ogljikovimi hidrati, najdlje so preživele na samih ogljikovih hidratih. Hkrati se je pokazalo, da je visoko beljakovinska hrana povečala umrljivost čebel. Herbert in sod. (1977) so ugotovili, da so čebele v kletkah, hranjene s pripravki z višjo vsebnostjo beljakovin (50%), umirale hitreje kot čebele, ki so jih hranili z manj beljakovinami (5 in 10%). Podobno so ugotovili tudi Zheng in sod. (2014b), kjer so družine, ki so jih hranili s hrano z vsebnostjo 38,5% surovih beljakovin imele visoko stopnjo umrljivosti. Hkrati se je pri teh čebelah zmanjšala aktivnost proteolitičnih encimov. Pri čebelah, ki so jih hranili s hrano z vsebnostjo surovih beljakovin med 25 – 34%, so opazili povečano aktivnost proteolitičnih encimov. Sklepali so, da lahko višek beljakovin ovira absorpcijo drugih hranil in negativno vpliva na zdravje čebel. Prekomerno zaužitje beljakovin je odgovorno za kopičenje neprebavljenega materiala v črevesju (DeGroot 1953). Po nekaterih podatkih je večja umrljivost možna zaradi prekomerne vsebnosti beljakovin, ki čebelam preprečujejo iztrebljanje (Pirk in sod. 2010).

4.2 PRISOTNOST SPOR *NOSEMA* SP. V ČREVESJU ČEBEL

Glede na nepričakovano okuženost čebel iz neinokulirane skupine lahko sklepamo, da smo uporabili premalo občutljivo metodo za ugotavljanje prisotnosti spor *Nosema* sp. Vzorec testiranih čebel je bil premajhen in posledično smo dobili lažno negativen rezultat (odsotnost patogena, čeprav je ta dejansko prisoten v manjšem številu). Doull in Cellier (1961; cit. po Pirk in sod. 2013) sta predlagala, da je 20 – 30 čebel dovolj velik vzorec, toda na podlagi teorije binominalne verjetnosti takšen vzorec zazna 5-odstotno dejansko razširjenost

patogena v okuženi družini z verjetnostjo 65% (20 čebel) ali 78% (30 čebel) (Pirk in sod. 2013). Molekularne metode, kot je PCR analiza, so bolj občutljive in vrstno specifične (Klee in sod. 2007), tako je možna detekcija spor tudi, ko jih vizualno ne zaznamo pod mikroskopom. Prepoznamo lahko tudi vegetativno obliko spor, ki je ni mogoče videti z mikroskopom, in zaznamo tudi že le nekaj spor v čebeli, ko ima patogen malo ali celo nič vpliva na čebelo (Fries in sod. 2013).

Prenos spor je možen s kontaminiranim satjem (Bailey in Ball 1991) in tudi s kontaminirano hrano v satju (Higes in sod. 2010), tako so se testne čebele lahko okužile takoj po poleganju z zaužitjem hrane v satju, preden smo jih prenesli v kletke. Pri tem je skoraj nemogoče preprečiti horizontalni prenos patogenov na mlade čebele (Williams in sod. 2013). Tako sta tudi Malone in Gatehouse (1998) v svojem poskusu utemeljila pojav spor pri kontrolnih skupinah, ki jih niso inokulirali s sporami. Ker so se spore pojavile pri vseh skupinah ne glede na prehrano, tudi pri sladkorni pogači in komercialnih dodatkih, sklepamo na okužbo s satjem ali hrano v satju in ne s samimi prehranskimi viri, uporabljenimi v poskusu. Tudi cvetni prah je namreč lahko vir patogenov.

Zaradi neugodnih vremenskih razmer, nizkih temperatur in padavin spomladi 2019 je bilo v tem času težko najti močno in zdravo družino. Takšne razmere omejujejo izletavanja delavk, kar lahko povzroči stres v družini in prenos bolezni znotraj družine (Fries 1993). V času, ko bi se morale družine pospešeno razvijati in pripravljati na obilnejšo pašo, so jih čebelarji morali hraniti, saj v naravi ni bilo zadostne količine hrane.

Ob dnevu 0 so bile čebele pričakovano negativne na *Nosema* sp., saj spore potrebujejo vsaj 3 dni, da se sprostijo iz okuženih celic (Higes in sod. 2007). Zaradi nadaljnjega pojava spor pri vseh skupinah, ne moremo primerjati smrtnosti zaradi noseme med inokuliranimi in neinokuliranimi skupinami.

Pričakovali smo, da bo največ spor pri kontrolni skupini, hranjeni s sladkorno pogačo, ker vsebuje samo ogljikove hidrate in nič beljakovin, ki bi podpirale imunski sistem v boju s patogenom. Pomanjkanje beljakovin v prehrani lahko oslabi imunski sistem in poveča dovzetnost za bolezen (Alaux in sod. 2010). Študija Dolezal in Toth (2018) je pokazala, da lahko hrana z nizko vsebnostjo hranil vpliva na pojav okužb z virusi in glivami, bolezen pa negativno vplivajo na fiziologijo prehranjevanja čebel.

Največja količina spor je bila tako pri skupini, hranjeni s cvetnim prahom, in ne pri kontrolni skupini, kot smo postavili hipotezo. Na podlagi rezultatov zavračamo postavljeno hipotezo, da bo stopnja okuženosti večja pri kontrolni skupini. Največja okuženost je bila pri skupini, hranjeni s cvetnim prahom. Hkrati so imele te čebele tudi najdaljšo življenjsko dobo. Jack in sod. (2016) v svojem delu navajajo, da je bilo značilno več spor *N. ceranae* pri skupinah, ki so dobile večje količine cvetnega prahu v primerjavi s skupinami, ki so dobile manjše količine cvetnega prahu. Kljub veliki količini spor so imele čebele v tej skupini najdaljšo

življenjsko dobo. Enake rezultate so dobili v raziskavah z *N. apis* (Rinderer in Elliot 1977) in *N. ceranae* (Basualdo in sod. 2014; Zheng in sod. 2014a; Fleming in sod. 2015).

V članku Jack in sod. (2016) navajajo, da je uspešno razmnoževanje spor odvisno od kakovosti gostiteljeve prehrane. Zaznali so večjo prisotnost spor pri skupinah, ki so dobile hrano z višjo vsebnostjo cvetnega prahu kot pri skupinah z nižjo vsebnostjo cvetnega prahu. Zato je verjetno, da čebela, ki prejema hrano z veliko cvetnega prahu, postane idealen gostitelj za patogena in ker cvetni prah zagotavlja idealno prehransko okolje povzroči večje širjenje le-tega. Hkrati so čebele pri teh skupinah tudi dalj časa živele. Alaux in sod. (2010) navajajo, da se s cvetnim prahom poveča vsebnost maščob v telesu, kjer je tudi mesto sinteze imuno proteinov. Nadalje domnevajo, da večja razpoložljivost cvetnega prahu lahko nadomesti izgubljeno energijo in hranila pri čebelah z visoko številčnostjo spor, kar lahko vodi do boljšega preživetja (Eischen in Graham 2008, cit. po Jack in sod. 2016). Število spor pri skupini »Bees Vita plus®« in »Bees-Strong®« v primerjavi s kontrolo ni izstopalo v tolikšni meri kot pri skupini »cvetni prah«, zato sklepamo, da cvetni prah vzpodbuja razmnoževanje in rast spor s svojo hranilno sestavo, medtem ko ostali dodatki ne vplivajo vidno na število spor oziroma ne zavirajo razmnoževanja spor, kot bi pričakovali glede na njihovo namembnost, zato hipotezo, da bodo prehranska dodatka in cvetni prah vplivali na število spor *Nosema* sp. v primeru cvetnega prahu sprejmemo in v primeru dodatkov zavrnemo. V doslej narejenih raziskavah so zabeleženi zelo različni vplivi različnih prehranskih dodatkov na razvoj spor mikrosporidija in dolgoživost čebel.

Beljakovinski dodatki so dokazano imeli pozitiven vpliv na imunski sistem in zdravje čebel. Glavinic in sod. (2017) so ugotovili, da je v primerjavi s kontrolo število spor *Nosema* sp. bistveno manjše pri skupinah, ki so imele aminokislinsko prehrano. Poskus je trajal 15 dni in v tem času je bila umrljivost čebel zelo majhna, prav tako ni bilo razlik med testno in kontrolno skupino. S tem so potrdili, da beljakovinski dodatek nima negativnega učinka na čebele. Predvidevajo pa, da bi se umrljivost povečala, če bi poskus trajal dalj časa.

V raziskavi Basualda in sod. (2014) je bilo število spor *N. ceranea* višje pri čebelah, ki so jih hranili s fermentiranim cvetnim prahom (čebelji kruh, angl. beebread) v primerjavi s tistimi, ki so dobile prehranski dodatek (umetna beljakovinska prehrana Virgen®). Pri obeh vrstah hrane je bila vsebnost surovih beljakovin enaka. Koncentracija beljakovin v hemolimfi pa je bila višja pri čebelah, hranjenih s fermentiranim cvetnim prahom. Sklepajo, da koncentracija beljakovin v hemolimfi vpliva na toleranco do patogenov. Tako višja vsebnost surovih beljakovin ne pomeni tudi bolj kakovostne in hranljive hrane. Prav tako so imele čebele, hranjene s fermentiranim cvetnim prahom, daljšo življenjsko dobo.

V raziskavi DeGrandi-Hoffman in sod. (2015) so poročali, da je bila količina patogenov (*Nosema* sp. in virusi) višja pri skupinah, ki so jih hranili s prehranskim dodatkom, še posebej z BeePro®.

Raziskava je pokazala, da je število spor *Nosema* sp. višje pri čebelah, hranjenih s komercialnimi nadomestki cvetnega prahu (Ultra Bee, Bee-Pro[®], MegaBee Winter Patty[™] in MegaBee[™]) kot v skupini, ki so jih hranili s cvetnim prahom (Fleming in sod. 2015).

4.3 MORFOLOŠKE MERITVE HIPOFARINGEALNIH ŽLEZ

Ugotovili smo, da so imele čebele, hranjene s cvetnim prahom, večji premer acinusov kot čebele, hranjene z drugimi dodatki. Žleze pri kontroli, kjer so bile čebele hranjene samo s sladkorno pogačo, pa so bile najmanjše in najmanj razvite. Tudi Omar in sod. (2017) so v svojem delu dokazali, da so imele čebele, hranjene samo s sladkorno raztopino, manjše žleze v primerjavi s čebelami, hranjenimi z drugimi dodatki.

Ker čebele, ki jih nismo inokulirali, niso ostale neokužene, ne moremo primerjati premerov acinusov pri zdravih čebelah in okuženih ter razpravljati o vplivu noseme na velikost žlez. Izjema je 1. vzorčenje (7 dni stare čebele), ko še nismo zaznali spor pri neinokuliranih skupinah. Tu smo opazili večji premer žlez pri inokuliranih čebelah, razen pri kontrolni skupini, hranjeni s sladkorno pogačo. V poskusu DeGrandi-Hoffman in sod. (2018), ki je potekal v panju, so dobili ravno nasprotno rezultate. Žleze čebel, ki so jih okužili z *Nosema* sp., so bile značilno manjše kot pri čebelah, ki niso bile inokulirane, kljub temu da je bila poraba cvetnega prahu in končna vsebnost zaužitih beljakovin enaka pri inokuliranih in neinokuliranih čebelah.

Čeprav so bile spore prisotne pri vseh skupinah, smo opazili, da so bili na začetku poskusa premeri acinusov večji pri inokuliranih skupinah, ob 3. vzorčenju smo opazili, da so bili premeri pri obeh skupinah približno enaki. Pri 4. vzorčenju pa se je trend obrnil in so imele neinokulirane skupine večji premer.

Ugotovili smo, da so imele čebele, hranjene s cvetnim prahom, največji premer acinusov žlez, medtem ko so imele čebele, hranjene s sladkorno pogačo, najmanjši premer acinusov. Čeprav je bila vsebnost aminokislin in beljakovin v pripravku s cvetnim prahom občutno manjša kot pri obeh prehranskih dodatkih, so bile žleze večje pri čebelah, hranjenih s cvetnim prahom. V raziskavi DeGrandi-Hoffman in sod. (2010) so hranili testne čebele z beljakovinskim nadomestkom in cvetnim prahom (oba vsebujeta beljakovine). Poraba cvetnega prahu je bila večja od porabe komercialnega beljakovinskega nadomestka. Niso pa opazili razlik v velikosti žlez in vsebnosti beljakovin med obema skupinama. Manjši premer žlez je bil pri čebelah, ki so jih hranili s sladkorno raztopino, ki ne vsebuje beljakovin. Da cvetni prah pozitivno vpliva na velikost žlez, so potrdili tudi Crailsheim in Stolberg 1989, Hrassnigg in Crailsheim 1998 in Corby-Harris in sod. 2015.

Za sam razvoj žlez pri novo izleženih delavkah ni nujna prisotnost zalege, kar so potrdili Crailsheim in Stolberg (1989) ter DeGrandi-Hoffman in sod. (2010). Pomanjkanje zalege lahko negativno vpliva na dodatno razvitost žlez, ko so delavke starejše. Zato morajo biti delavke za maksimalen razvoj žlez stimulirane s feromonom, ki ga oddaja zalega (Deseyn

in Billen 2005). Ker je naš poskus potekal v kletkah, ne vemo kako bi zalega in interakcije med čebelami v panju vplivale na razvoj žlez. Lass in Crailsheim (1996) sta ugotovila, da se velikosti žlez čebel v panju in čebel v kletkah značilno razlikujejo na 8. in 16. dan starosti. Čebele v kletkah so imele nerazvite (8. dan) ali pa bolj izrazito zmanjšane (16. dan) žleze v primerjavi s čebelami v panju, pri isti starosti. Pri starosti 26. dni nista več opazila razlik. Žleze pri čebelah v kletki so bile manjše oz. slabše razvite kot pri enako starih čebelah v panju. Podobno sta opisala tudi Crailsheim in Stolberg (1989).

Velikost žlez se spreminja tudi s starostjo čebel. V literaturi je premer pri novo izleženih delavkah *in vivo* okoli 80 μm (Crailsheim in Stolberg 1989; Deseyn in Billen 2005). Kot začetna vrednost je uporabljena tudi v sliki 14, saj nismo imeli lastne vrednosti. Mlade čebele do starosti 3 dni imajo enako velike žleze, ne glede na to s kakšno hrano se prehranjujejo (Corby-Harris in sod. 2014). Žleze dosežejo svoj maksimum med 8. in 12. dnevom starosti (Crailsheim in Stolberg 1989; Knecht in Kaatz 1990; Lass in Crailsheim 1996; Hrasnigg in Crailsheim 1998). Tudi v našem poskusu je bil premer žlez največji v tem časovnem intervalu, z izjemo neinokulirane skupine, hranjene s cvetnim prahom, kar smo že pripisali napaki pri pripravi preparata. Pri čebelah, starejših od 12 dni, se velikost žlez začne zmanjševati in funkcija se spremeni (Deseyn in Billen 2005). Premer acinusov je pokazatelj aktivnosti žlez in odraža količino proizvedenih beljakovin (Knecht in Kaatz 1990).

4.4 PREHRANA

Prehranske dodatke z vsebnostjo beljakovin čebelarji dodajajo čebelam, ko je v naravi prisotno pomanjkanje cvetnega prahu in medicinske (DeGrandi-Hoffman in sod. 2010) zaradi vremenskih razmer ali zaradi izgube habitata, ki vpliva na manjšo diverzitetu flore in posledično na pašo (Goulson in sod. 2015), s tem pa na samo zdravje čebel in družine (Alaux in sod. 2010). Zaradi različnih vplivov, predvsem zaradi morebitnih negativnih vplivov, pa so potrebne raziskave prehranskih dodatkov pred samo uporabo, kar pa ni stalna praksa.

Opazili smo, da so delavke pojedle več hrane s cvetnim prahom kot pa hrane s prehranskimi dodatki in sladkorne pogače, razen pri 1. vzorčenju, kjer sta največ porabili inokulirana in neinokulirana skupina, hranjena z Bees-Strong[®] in pri 2. vzorčenju, kjer smo nekoliko več porabljene hrane zaznali pri inokulirani kontrolni skupini. Pri obeh skupinah, hranjenih z Bees-Strong[®], smo opazili povečano iztrebljanje čebel med 1. in 2. vzorčenjem in tudi najhitrejšo umiranje, kar lahko morda pripisemo motnjam v prebavi.

Porabo hrane smo normalizirali glede na porabo do 1. vzorčenja, tako smo videli dinamiko prehranjevanja. Pri skupinah, hranjenih z Bees-Strong[®], smo opazili bistveno zmanjšano porabo hrane oz. zmanjšanje teka čebel. Na to je lahko vplivalo povečano iztrebljanje teh čebel in motnje v prebavi. Tek se je najbolj povečal pri neinokulirani skupini, hranjeni z Bees Vita plus[®]. Nihanje v porabi hrane smo opazili pri čebelah, hranjenih s cvetnim prahom.

Na podlagi prehranskih analiz smo ugotovili, da je vsebnost aminokislin največja ravno pri Bees-Strong® (22,06%, od tega je esencialnih aminokislin 9,85%). DeGroot (1953) je dokazal, da potrebujejo čebele za svojo rast in razvoj 27% esencialnih aminokislin (razmerje posameznih aminokislin navedeno v Preglednici 7) od skupnih aminokislin v svoji prehrani. Hranilno vrednost cvetnega prahu lahko ocenimo glede na razmerje aminokislin in ne samo kot končno vrednost beljakovin (Pirk in sod. 2010). Hranilna vrednost je zmanjšana, kadar so količine aminokislin nesorazmerne (DeGroot 1953; Cook in sod. 2003). V našem poskusu je hrana pri vsaki skupini vsebovala občutno manj esencialnih aminokislin.

Potrebe po hranilih se spreminjajo tudi s starostjo delavk. Mlade delavke potrebujejo več beljakovin, ki jih dobijo s cvetnim prahom in zato proizvedejo več proteolitičnih encimov v srednjem črevesu za prebavo le-teh (Crailsheim in sod. 1992). Starejše (pašne) čebele potrebujejo več ogljikovih hidratov, zato se poveča proizvodnja encimov za prebavo ogljikovih hidratov. Proizvedejo pa manj proteolitičnih encimov. Beljakovine, ki jih v manjših količinah še vedno potrebujejo, dobijo iz fermentiranega cvetnega prahu, ki ga pripravijo mlajše čebele (Moritz in Crailsheim 1987).

Hranilna sestava komercialnih prehranskih dodatkov ni dobro raziskana. Zato so lahko dodatki slabše kakovosti kot hrana, ki jo čebele dobijo v naravi (Gregorc in sod. 2019). Optimalna količina beljakovin v prehrani pri čebelah v kletkah je 23 – 30% (Herbert in sod. 1977). Surovih beljakovin v naši pogači s cvetnim prahom je 9,6 g/kg (0,96%), v Bees Vita plus® 58,1 g/kg (5,81%) in v Bees-Strong® 255,3 g/kg (22,53%). Glede na literaturo bi bila količina surovih beljakovin v Bees-Strong® dovolj, vendar sta količina in razmerje esencialnih aminokislin neustrezna, kar je lahko razlog za negativen vpliv na delavke.

Najmanj surovih beljakovin in aminokislin je vseboval cvetni prah (0,96% surovih beljakovin in 1,34% aminokislin, od tega 0,41% esencialnih aminokislin.). V poskusu smo uporabili suha zrna cvetnega prahu in ne fermentiran cvetni prah, zato je vsebnost beljakovin tudi zaradi tega manjša, kot jo navajajo. Čebele so pojedle največ pogače z dodanim cvetnim prahom. Pri teh čebelah je bilo prisotnih tudi največ spor *Nosema* sp. Nižja vsebnost hranil in ogromne količine mikrosporidija, ki porablja ATP iz citoplazme (Weidner 1999) in aminokislino svojega gostitelja (Wang in Moeller 1970), sta lahko razloga, da so delavke pojedle več hrane kot pri drugih skupinah, da nadomestijo izgube, medtem ko je poraba hrane pri drugih skupinah po 2. vzorčenju močno upadla. V literaturi navajajo, da je cvetni prah najboljša hrana tako za čebele kot tudi za mikrosporidij, posledično se količina spor močno poveča, hkrati pa se poveča toleranca čebel do patogenov in s tem tudi njihova življenjska doba. Enake rezultate so dobili tudi Rinderer in Elliot (1977), Porrini in sod. (2011), Basualdo in sod. (2014), Zheng in sod. (2014a), Wang in sod. (2014) in Jack in sod. (2016). Drugi razlog, da so pojedle več pogače s cvetnim prahom, je lahko boljši okus le-tega. V delu Li in sod. (2012) in DeGrandi-Hoffman in sod. (2010) navajajo, da je količina

zaužite hrane povezana s fizikalnimi in kemijskimi lastnostmi, zaradi katerih je cvetni prah čebelam bolj okusen kot prehranski dodatki. Posledično pojedjo več cvetnega prahu.

5 SKLEPI

V delu smo spremljali vpliv prehranskih dodatkov in cvetnega prahu na število spor *Nosema* sp. in dolgoživost kranjske sivke. Cilj je bil ugotoviti, ali prehranski dodatki preprečujejo razvoj spor *Nosema* sp. pri čebelah in v kakšni meri se njihovo delovanje kaže.

Ugotovili smo, da so imele čebele, hranjene s cvetnim prahom, večji premer acinusov žlez kot čebele, hranjene s prehranskimi dodatki, najmanjši premer pa smo opazili pri čebelah v kontroli, hranjenih s sladkorno pogačo. Pri vseh skupinah je premer acinusov naraščal, dosegel svoj maksimum med 8. in 12. dnevom starosti ter nato začel upadati. Obe ugotovitvi sta v skladu z rezultati drugih raziskav.

Prvo postavljeno hipotezo, da bodo prehranska dodatka in cvetni prah vplivali na število spor *Nosema* sp. smo potrdili delno. Potrdili smo, da je cvetni prah omogočal razvoj spor in s tem pripomogel k večji količini spor v črevesju testiranih delavk v primerjavi z drugimi skupinami. Medtem ko prehranska dodatka nista vplivala, saj je bila številčnost spor primerljiva s količino spor pri kontrolni skupini. Uporaba testiranih dodatkov torej ne pomaga v boju proti nosemavosti.

Drugo hipotezo, in sicer da bodo prehranska dodatka in cvetni prah vplivali na dolgoživost čebel (*Apis mellifera carnica*), smo sprejeli. Cvetni prah je pozitivno vplival na dolgoživost delavk, saj so preživele najdlje kljub velikemu številu spor v srednjem črevesu. Vpliv Bees-Strong® dodatka je bil negativen, saj je povzročil hitrejše odmiranje delavk. Prav tako so čebele, hranjene z Bees Vita plus® odmrle nekoliko prej kot pri kontrolni skupini.

Tretjo hipotezo, da bo stopnja okuženosti kontrolne skupine, okužene s sporami *Nosema* sp. večja, smo zavrnil. Največ spor je imela namreč skupina, hranjena s cvetnim prahom, ki je pozitivno vplival na delovanje imunskega sistema čebel ter hkrati na rast in razvoj patogena. Število spor v kontrolni skupini je bilo primerljivo z Bees Vita plus® in z Bees-Strong®.

Pri skupini, hranjeni s cvetnim prahom, smo beležili tudi največ zaužite hrane, kar je lahko posledica ogromne količine mikrosporidija, ki porablja hranila svojega gostitelja. Hkrati so rezultati prehranskih analiz pokazali, da je vsebnost hranil najmanjša pri pogači s cvetnim prahom, kar bi tudi lahko vplivalo na večjo potrebo po hrani. Razlog, da so pojedle več cvetnega prahu, so lahko tudi fizikalno-kemijske lastnosti, zaradi katerih je cvetni prah čebelam bolj okusen kot prehranski dodatki.

Rezultati dela so uporabni in prinašajo nekaj novih ugotovitev ter idej za prihodnje raziskave, predvsem ugotovitev, da je pogača s cvetnim prahom bolj primerna kot kontrola kot pa sama sladkorna pogača, kar se bo tudi v prihodnje upoštevalo. Prav tako je pomembna ugotovitev, da je metoda za ugotavljanje prisotnosti spor *Nosema* sp. (Doull in Celier 1961) premalo občutljiva in je potrebno opraviti PCR analizo, da smo res lahko prepričani o zdravju čebelje družine. Ker je tudi cvetni prah lahko vir okužbe, bi bilo v prihodnje smiselno le-tega sterilizirati na način, da ohrani hranilne vrednosti.

Zaključimo lahko, da prehranska dodatka ne preprečujeta razvoja spor *Nosema* sp. pri kranjski sivki. Njuno delovanje se je izkazalo kot negativno, saj so čebele hitreje odmirale. Na zdravje delavk najboljše vpliva cvetni prah, ki ga nabirajo same v naravi, na žalost pa pozitivno vpliva tudi na rast in razvoj spor patogena. Z raznovrstnim cvetnim prahom čebele dokazano pridobijo dovolj potrebnih hranil za svojo rast in razvoj na individualnem nivoju in na nivoju družine. Hkrati smo s pregledom literature ugotovili, da k preprečevanju pojavljanja klinično zaznavne oblike bolezni znatno pripomorejo preventivni apitehnični ukrepi.

6 LITERATURA IN VIRI

Alaux C., Ducloz F., Crauser D., Le Conte Y. 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters* 6, 562–565.

Antúnez K, Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A., Zunino P., Higes M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11:2284-2290.

Ashida M., Brey P. 1998. Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. V: Antúnez K, Martín-Hernández R., Prieto L., Meana A., Zunino P., Higes M. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11:2284-2290.

Bailey L. 1972. *Nosema apis* in drone honey bees. *Journal of Apicultural Research* 11, 171-174.

Bailey L. 1983. *Melissococcus pluton*, the cause of European foulbrood of honey bees (*Apis* spp.). *Journal of Applied Bacteriology*. 55, 65–69.

Bailey L. 1953. The transmission of nosema disease. *Bee World*. 24 (9), pp. 171-172.

Bailey L., Ball B.V. 1991. *Honey Bee Pathology*. New York, NY; London: Academic Press. 36-41, 41-45, 53-56, 60-62, 64-69.

Barker R.J., Lehner Y. 1978. Laboratory comparison of high fructose corn syrup, grape syrup, honey and sucrose syrup as maintenance food for caged honey bees. *Apidologie*, 9 (2), 111-116.

Barron A.B. 2015. Death of the bee hive: understanding the failure of an insect society. *Current Opinion in Insect Science*, 10:45-50.

Basualdo M., Barragán S., Antúnez K. 2014. Beebread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environmental Microbiology Reports* 6 (4), 396–400.

Boecking O., Spivak M. 1999. Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni*. *Oud. Apidologie* 30, 141–158.

Botias C., Martín-Hernández R., Barrios L., Meana A., Higes M. 2013. *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research* 44, 25.

Bourgeois A.L., Rinderer T.E., Beaman L.D., Danka R.G. 2010. Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), 53–58.

Brodschneider R., Crailsheim K. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278–294.

Bromenshenk J.J., Henderson C.B., Wick C.H., Stanford M.F., Zulich A.W., Jabbour R.E. in sod. 2010. Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. *PLoS ONE* 5(10): e13181.

Burnham A.J. 2019. Scientific Advances in Controlling *Nosema ceranae* (*Microsporidia*) Infections in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Frontiers in Veterinary Science* 6:79.

Cantwell G.E. 1970. Standard Methods for Counting *Nosema* Spores. *American Bee Journal*, 110, 222-223.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. 1993. Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *The Journal of Biological Chemistry*. 268, 7044-7054.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaek M. in Tempst P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honey bees. *The EMBO Journal*, 8: 2387-2391.

Casteels P., Ampe C., Riviere L., Damme J.V., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial peptide in the honey bees (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187: 381-386.

Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P. 1994. Acute transcriptional response of the honey bees peptide-antibiotics gene repertoire, required posttranslational conversion of the precursor structures. *Journal Biological Chemistry*, 269: 28569-28575.

Cerenius L., Lee B.L., Söderhäll K. 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology* Vol.29 No.6.

Chainmanee V., Chantawannakul P., Chen Y., Evans J.D., Pettis J.S. 2012. Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of insect physiology* 58, 1090-1095.

Chapman R.F. 1978. *The Insects Structure and Function*. Engl. Univ. Press. Ltd, London, England.

Chen W.T.Q., Melathopoulou P.A., Pernel F.S., Foster J.L. 2009. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC Genomics*, 10:387.

Chen Y.P., Huang Z.Y. 2010. *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie* 41, 364–374.

Chen Y.W., Chung W.P., Wang C.H., Solter L.H., Huang W.F. 2012. *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111: 264-267.

Cook S.M., Awmack C.S., Murray D.A., Williams I.H. 2003. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology* 28 , 622–627.

Corby-Harris V., Jones B.M., Walton A., Schwan M.R., Anderson K.E. 2014. Transcriptional markers of sub-optimal nutrition in developing *Apis mellifera* nurse workers. *BMC Genomics* 15, 134.

Corby-Harris V., Meador C.A., Snyder L.A., Schwan M.R., Maes P., Jones B.M., Walton A., Anderson K.E. 2015. Transcriptional, translational, and physiological signatures of undernourished honey bees (*Apis mellifera*) suggest a role for hormonal factors in hypopharyngeal gland degradation. *Journal of Insect Physiology* 85, 65–75.

Correa-Fernandez, F., Cruz-Landim C. 2010. Differential Flight Muscle Development in Workers, Queens and Males of the Eusocial Bees, *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica*. *Journal of Insect Science*, 10(85), 1–9.

Costa C., Lodesani M., Maistrello L. 2010. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. *Apidologie* 41, 2: 141-150.

Crailsheim K. 1991. Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Comparative Physiology B* 161, 55–60.

Crailsheim K. 1998. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.), *Apidologie* 29, 97–112.

Crailsheim K., Riessberger-Galle U. 2001. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie* 32, 91–103.

Crailsheim K., Stolberg E. 1989. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 35, 595–602.

Crailsheim K., Schneider L.H.W., Hrassnigg N., Bühlmann G., Brosch U., Gmeinbauer R., Schöffmann B. 1992. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function, *Journal of Insect Physiology* 38, 409–419.

Cremer S., Sixt M. 2009. Analogies in the evolution of individual and social immunity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 129-142).

Čebelja glava z iztegnjenim sesalnim aparatom. <https://askabiologist.asu.edu/honey-bee-anatomy> (datum dostopa: 4.11.2019).

De Groot A.P. 1953. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.), *Physiol. Comp. Oecol.* 3, 197–285.

Decourtye A., Mader E., Desneux N. 2010. Landscape enhancement of floral resources for honey bees in agro-ecosystems. *Apidologie* 41: 264-277.

DeGrandi-Hoffman G., Chen Y., Huang E., Huang M.H. 2010. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 56, 1184–1191.

DeGrandi-Hoffman G., Chen Y., Rivera R., Carroll M., Chambers M., Hidalgo G., de Jong E.W. 2015. Honey bee colonies provided with natural forage have lower pathogen loads and higher overwinter survival than those fed protein supplements. *Apidologie* 47: 186-196.

DeGrandi-Hoffman G., Gage S.L., Corby-Harris V., Carroll M., Chambers M., Graham H., Watkins DeJong E., Hidalgo G., Calle S., Azzouz-Olden F., Meador C., Snyder L., Ziolkowski N. 2018. Connecting the nutrient composition of seasonal pollens with changing nutritional needs of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies, *Journal of Insect Physiology*.

Deseyn J., Billen J. 2005. Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* 36, 49–57.

Di Pasquale G., Salignon M., Le Conte Y., Belzunces L. P., Decourtye A., Kretzschmar A., Suchail S., Brunet J.L., Alaux, C. 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter?. *PLoS ONE* 8(8): e72016.

Dolezal A.G., Toth A.L. 2018. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science*. 26:114–119.

Doull K.M., Eckert J.E. 1962. A survey of the incidence of nosema disease in California. *Journal of Economic Entomology*, 55, 313-317. V: Pirk C.W.W., de Miranda J.R., Kramer M., Murray T., Nazzi F., Shutler D., van der Steen J.J.M. in van Dooremalen C. 2013. Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research* 52(4).

Dussaubat C., Brunet J-L., Higes M., Colbourne J.K., Lopez J., in sod. 2012. Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 7(5): e37017.

Eischen F.A., Graham R.H. 2008. Feeding overwintering honey bee colonies infected with *Nosema ceranae*. *Am. Bee J.* 148, 555. V: Jack C.J., Uppala S.S., Lucas H.M. in Sagili R.R. 2016. Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *Journal of Insect Physiology* 87, 12-19.

Evans J.D., Spivak M. 2009. Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (2010), S62-S72.

Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.-L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark D. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* 15, 645–656.

Evans J.D., Chen Y.P., di Prisco G., Pettis J., Williams V. 2009. Bee cups: single-use cages for honey bee experiments, *Journal of Apicultural Research*, 48:4, 300-302.

Fine J.D., Shpigler H.Y., Ray A.M., Beach N.J., Sankey A.L., Cash-Ahmed A., Huang Z.Y., Astrauskaite I., Chao R., Zhao H., Robinson G.E. 2018. Quantifying the effects of pollen nutrition on honey bee queen egg laying with a new laboratory system. *PLoS ONE* 13(9): e0203444.

Fleming J.C., Schmehl D.R., Ellis J.D. 2015. Characterizing the impact of commercial pollen substitute diets on the level of *Nosema* spp. in honey bees (*Apis mellifera* L.). *PLoS One* 10 (7): e0132014.

Forsgren E. 2010. European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (2010) S5–S9.

Forsgren E., Fries I. 2010. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Veterinary Parasitology* 170: 212-217.

Fries I. 1989. Observations on the Development and Transmission of *Nosema apis* Z. In the Ventriculus of the Honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 28(2), 107–117.

Fries I. 1993. *Nosema apis* – A parasite in the honey bee colony. *Bee World* 74(1): 5-19.

Fries I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S73–S79.

Fries I., Chauzat M.P., Chen Y.P., Doublet V., Genersch E., Gisder S., Higes M., McMahon D.P., Martín-Hernández R., Natsopoulou M., Paxton R.J., Tanner G., Webster T. C., Williams G.R. 2013. Standard methods for nosema research. V: Dietemann, V., Ellis, J.D., Neumann, P. (Eds.), *The Coloss Beebook, Volume II, Standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research*, 51.

Fries I., Feng F., da Silva A., Slemenda S.B., Pieniazek N.J. 1996. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis ceranae* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32: 356–365.

Fries I., Granados R.R., Morse R.A. 1992. Intracellular germination of spores of *Nosema apis*. *Apidologie*. 23: 61-70.

Fries I., Martin R., Meana A., Garcia-Palencia, P., Higes M. 2006. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 45: 230–233.

Furgala B. 1962. Residual fumagillin activity in sugar syrup stored by wintering honeybee colonies. *Journal of Apicultural Research* 1: 35-37.

Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *Pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 501–511.

Gillespie J.P., Kanost M.R., Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42, 611–643.

Gilliam M., Prest D.B., Lorenz B.J. 1989. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidologie* 20, 53-68.

Gisder S., Hedtke K., Moeckel N. in sod. 2010. Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? *Applied and Environmental Microbiology* 76: 3032-3038.

Glavinic U., Stankovic B., Draskovic V., Stevanovic J., Petrovic T., Lakic N., Stanimirovic Z. 2017. Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. PLoS ONE 12(11).

Glinski Z., Jarosz J. 2001. Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*. *Apiacta* 36: 12–24.

Goblirsch M., Huang Z.Y., Spivak M. 2013. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. PLoS ONE 8(3).

Goulson D., Nicholls E., Botz Aas C., Rotheray E.L. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347: 1255957.

Gregorc A. 2013. Spremljanje kakovosti vzrejenih matic kranjske čebele za programsko obdobje 2011-2013 : poročilo o izvedenem ukrepu (končno poročilo za triletno obdobje : poročilo o izvedenih nalogah v letu 2013). Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana: str. 40.

Gregorc A. 2008. Telo in zdravje čebel: anatomija in fiziologija čebel. V: Zdešar P. (ur.). 2008. Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje 1. Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 97-100.

Gregorc A., Sampson B., Knight P.R. in Adamczyk J. 2019. Diet quality affects honey bee (Hymenoptera: Apidae) mortality under laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research* Vol. 58, No. 4, 492-493.

Hassanein M.H. 1953. The influence of infection with *Nosema apis* on the activities and longevity of the worker honey bee. *Annals of Applied Biology*, 40: 418-423.

Haydak H.M. 1970. Honey bee nutrition. *Annual Review of Entomology* 15:1, 143-156.

Herbert E.W., Shimanuki H., Caron D. 1977. Optimum protein levels required by honey bees (Hymenoptera, Apidae) to initiate and maintain brood rearing. *Apidologie* 8, 141–146.

Higes M., García-Palencia P., Martín-Hernández R., Meana A. 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranea* (*Microsporidia*). *Journal of Invertebrate Pathology* 94: 211-217.

Higes M., Martín-Hernández R., Meana A. 2010. *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41, 375–392.

Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Bailón E.G., González-Porto A.V., Barrios L., Del Nozal M.Z., Bernal J.L., Jiménez J.J., Palencia P.G., Meana A. 2008. How natural

infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10, 2659–2669.

Higes M., Martín-Hernández R., Garrido-Bailón E., González-Porto A.V., García-Palencia P., Meana A., del Nozal M.J., Mayo R., Bernal J.L. 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports* 1(2), 110–113.

Higes M., Martín-Hernández R., Meana A. 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92, 2: 93–95.

Hrassnigg N., Crailsheim K. 1998. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies, *Journal of Insect Physiology* 44, 929–939.

Hrassnigg N., Crailsheim K. 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 36, 255–277.

Hrassnigg N., Crailsheim K. 1998. The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*. 44, 393–404.

Huang W.F., Solter L.F. 2013. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 113, 1: 35–41.

Huang W.F., Jiang J.H., Chen Y.W., Wang C.H. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 38: 30–7.

Huang Z.Y., Robinson G.E. 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 39, 147–158.

Huang Z.Y., Plettner E., Robinson G.E. 1998. Effect of social environment and mandibular gland removal on division of labor in worker honey bees. *Journal of Comparative Physiology B* 183: 143–152.

Human H., Brodschneider R., Dietemann V., Dively G., Ellis J., Forsgren E., Fries I, Hatjina F., Hu F.L., Jaffé R., Jensen A.B., Köhler A., Magyar J., Ózkólym A., Pirk C.W.W., Rose R., Strauss U., Tanner G., Tarpy D.R., van der Steen J.J.M., Vaudo A. in sod. 2013. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research* 52(4). V: Dietemann, V., Ellis, J.D., Neumann, P. (Eds.), *The Coloss Beebook, Volume I, Standard methods for Apis mellifera research. Journal of Apicultural Research* 52.

Jack C.J., Uppala S.S., Lucas H.M., Sagili R.R. 2016. Effects of pollen dilution on infection of *Nosema ceranae* in honey bees. *Journal of insect physiology* 87, 12–19.

- Keeling P. 2009. Five questions about microsporidia. *PLoS Pathogens* 5: e1000489.
- Khoury D.S., Myerscough M.R., Barron A.B. 2011. A Quantitative Model of Honey Bee Colony Population Dynamics. *PLoS ONE* 6(4): e18491.
- Klee J., Besana A., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam D.Q., in sod. 2007. Widespread dispersal of the microsporidium *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 1–10.
- Knecht D., Kaatz H.H. 1990. Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees. *Apidologie* 21, 457–468.
- Kralj J., Fuchs S. 2010. *Nosema* sp. influences flight behaviour of infected honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *Apidologie* Volume 41: 21-28.
- Kubo T., Sasaki M., Nakamura J., Sasagawa H., Ohashi K., Takeuchi H., Natori S. 1996. Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *Journal of Biochemistry* 119, 291– 295.
- L'Arrivee J.C.M. 1965. Sources of nosema infection. *American Bee Journal* 105, 246–248.
- Lass A., Crailsheim K. 1996. Influence of age and caging upon protein metabolism, hypopharyngeal glands and trophallactic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* 43, 347–358.
- Laughton A.M., Boots M., Siva-Jothy M. 2011. The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology* 57, 1023-1032.
- Lavine M.D., Strand M.R. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 1295–1309.
- Lemaitre B., Hoffmann J. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 25, 697–743.
- Li C., Xu B., Wang Y., Feng Q., Yang W. 2012. Effects of dietary crude protein levels on development, antioxidant status, and total midgut protease activity of honey bee (*Apis mellifera ligustica*). *Apidologie* 43: 576-586.
- Li X., Schuler M.A., Berenbaum M.R. 2006. Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology*.

Liu T.P. 1990. Ultrastructural changes in the secretion granules of the hypopharyngeal glands of the honeybee infected by *Nosema apis* and after treatment with fumagillin. *Tissue Cell*. 22, 523-531.

Loskotova J., Peroutka M., Vesely V. 1980. *Nosema* disease of honeybee queens (*Apis mellifica*). *Apidologie* 11, 2: 153-61.

Lotmar R. 1943. Über den Einfluss der Temperatur auf den Parasiten *Nosema apis*. *Beih. Schweiz. Bienenztg.*, 1, 261-284.

Maiolino P., Lafigliola L., Rinaldi L., De Leva G., Restucci B., Martano M. 2014. Histopathological findings of the midgut in European honey bee (*Apis Mellifera* L.) naturally infected by *Nosema* spp. *Veterinary Medicine and Animal Sciences*. 2, 4.

Maistrello L., Lodesani M., Costa C., Leonardi F., Marani G., Caldon M., Mutinelli F., Granato A. 2008. Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 39: 436-45.

Malone L.A., Gatehouse H.S. 1998. Effects of *Nosema apis* infection on honey bee (*Apis mellifera*) digestive proteolytic enzyme activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71, 169-74.

Malone L.A., Giacon H.A., Newton M.R. 1999. Comparison of the responses of some New Zealand and Australian honey bees (*Apis mellifera* L) to *Nosema apis* Z. *Apidologie* 26, 495–502.

Malovrh T. 2016. Obrambni sistem čebel. 2 znanstveno posvetovanje o čebelah in čebelarstvu. Poklukarjevi dnevi, Ljubljana.

Martín-Hernández R., Bartolomé C., Chejanovsky N., Le Conte Y., Dalmon A., Dussaubat C., García-Palencia P., Meana A., Pinto M.A., Soroker V., Higes M. 2018. *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental Microbiology*, 20(4), 1302–1329.

Martín-Hernández R., Botías C., Bailón E.G., MartínezSalvador A., Prieto L., Meana A., Higes M. 2012. Microsporidia infecting *Apis mellifera*: coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*? *Environmental Microbiology* 14: 2127–2138.

Martín-Hernández R., Botías C., Barrios L., Martínez-Salvador A., Meana A., Mayack C., Higes M. 2011. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). *Parasitology Research* 109, 605–612.

Meana A., Martín-Hernández R., Higes M. 2010. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *Journal of Apicultural Research* 49: 212–214.

Milbrath M.O., van Tran T., Huang W.F., Solter L.F., Tarpy D.R., Lawrence F., Huang Z.Y. 2015. Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 125:9-15.

Moritz B., Crailsheim K. 1987. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 33 (12), 923-931.

Nicolson S.W. 2011. Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixture of the two. *African Zoology* Vol. 46, 197-204.

Ohashi K., Natori S., Kubo T. 1999. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.), *European Journal of Biochemistry* 265, 127–133.

Omar E., Abd-Ella A.A., Khodairy M.M., Moosbeckhofer R., Crailsheim K., Brodschneider R. 2017. Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* (2017) 48:425–436.

Orešnik A., Kermauner A. 2009. *Osnove prehrane živali*. Slovenj Gradec, Kmetijska založba: 15-18.

Paoli P.P., Donley D., Stabler D., Saseendranath A., Nicolson S.W., Simpson S.J., Wright G.A. 2014. Nutritional balance of essential amino acids and carbohydrates of the adult worker honeybee depends on age. *Amino Acids* 46: 1449-1458.

Paris L., El Alaoui H., Delbac F., Diogon M. 2018. Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. *Current Opinion in Insect Science*, 26. 149-154.

Paxton R.J., Klee J., Korpela S. in sod. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie* 38, 6: 558-65.

Pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits (MRL) in foodstuffs of animal origin. Commission Regulation, EU, 2010, št. 37/2010. [https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/37\(1\)/oj](https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/37(1)/oj) (datum dostopa: 10.10.2019).

Pirk C.W.W., de Miranda J.R., Kramer M., Murray T., Nazzi F., Shutler D., van der Steen J.J.M., van Dooremalen C. 2013. Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. *Journal*

of Apicultural Research 52(4). V: Dietemann, V., Ellis, J.D., Neumann, P. (Eds.), The Coloss Beebook, Volume I, Standard methods for *Apis mellifera* research. Journal Apicultural Research. 52.

Pirk C.W.W., Boodhoo C., Human H., Nicolson S.W. 2010. The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (*Apis mellifera scutellata*). Apidologie 41, 62–72.

Porrini M.P., Audisio C.M., Sabate D.C. in sod. 2010. Effect of bacterial metabolites on microsporidian *Nosema ceranae* and on its host *Apis mellifera*. Parasitology Research 107, 2: 381-8.

Porrini M.P., Sarlo E.G., Medici S.K., Garrido P.M., Porrini D.P., Damiani N., Eguaras M.J. 2011. *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. Journal of Apicultural Research 50, 35–41.

Prebavila čebele delavke. <https://abejas.org/en/bees-internal-anatomy/> (datum dostopa: 11.10.2019).

Prehranski dodatek Bees Vita plus[©]. <https://healthybeesllc.com/> (datum dostopa: 28.5.2019).

Prehranski dodatek Bees-Strong[©]. <https://www.beevital.com/beestrong> (datum dostopa: 28.5.2019).

Ptaszyńska A., Borsuk G., Mułenko W., Demetraki-Paleolog J. 2014. Differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* spores under Scanning Electron Microscopy (SEM), Journal of Apicultural Research. 53: 537-544.

Rembold H. 1964. Die Kastenentstehung bei der Honigbiene *Apis mellifica* L., Naturwissenschaften 51, 49–54.

Rinderer T.E., Elliott K.D. 1977. Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*: influence of diet. Journal of Economic Entomology 70(4), 431–433.

Rortais A., Arnold G., Halm M.P., Touffet-Briens F. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees, Apidologie 36, 71–83.

Rothenbuhler W. 1964. Behaviour genetics of nest cleaning in honey bees IV. Responses of F1 and backcross generations to disease-killed brood. American Zoologist 4, 111–123.

Rothenbuhler W.C., Thompson V.C. 1956. Resistance to American foulbrood in honey bees: I. Differential survival of larvae of different genetic lines. *Journal of Economic Entomology* 49, 470–475.

RStudio Team. 2018. Rstudio: Integrated Development for R. Rstudio, Inc., Boston, MA
URL <http://www.rstudio.com/>.

Schmid M.R., Brockmann A., Pirk C.W.W., Stanley D.W., Tautz J. 2008. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology* 54, 439–444.

Schmidt O., Theopold U., Strand M.R. 2001. Innate immunity and evasion by insect parasitoids. *Bioessays* 23: 344–351.

Seeley T.D. 1989. The honey bee colony as a superorganism, *American Scientist* 77, 546–553.

Simone M., Evans J.D., Spivak M. 2009. Resin collection and social immunity in honey bees. *The Society for the Study of Evolution. Evolution* 63-11: 3016-3022.

Simone-Finstrom M.D., Foo B., Tarpay D.R., Starks P.T. 2014 Impact of food availability, pathogen exposure, and genetic diversity on thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of insect behavior* 27 (4).

Šimúth J. 2001. Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie* 32, 69–80.

Smart M.D., Sheppard W.S. 2012. *Nosema ceranae* in age cohorts of the western honey bee (*Apis mellifera*). *Journal Invertebrate Pathology* 109: 148–151.

Smith M.L. 2012. The honey bee parasite *Nosema ceranae*: transmissible via food exchange? *PLoS One* 7, e43319.

Snodgrass R.E. 1956. *Anatomy of the Honeybee*. Comstock Publishing Associates, New York. 168-200.

Snodgrass R.E., Erickson E.H. 2003. *The Hive and the Honeybee: The Anatomy of the Honey Bee*. Edit by Joe M. Graham. Revised Ed. Dadant & Sons. Hamilton, ILLINOIS. U.S.A.

Snodgrass R.E. 1984. *Anatomy of the honey bee*. Cornell University Press Ltd., London.

Soklič M. 2016. Spremembe v srednjem črevesu in goltnih žlezah po okužbi medonosne čebele s spori *Nosema*. Doktorska disertacija. Univerza v Mariboru.

Spivak M., Gilliam M. 1998. Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and Varroa: Part II. Studies on hygienic behaviour since the Rothenbuhler era. *Bee World* 79, 169–186.

Stanimirović Z., Stevanović J., Bajić V., Radović I. 2007. Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests in vivo. *Mutation Research* 628: 1-10.

Strand M.R. 2008. The insect cellular immune response. *Insect Science* 15, 1-14.

Strand M.R., Pech L.L. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology* 40: 31-56.

Tlak Gajger I., Vugrek O., Pinter L., Petrinc Z. 2009. “Nozevit patties” treatment of honeybees (*Apis mellifera*) for the control of *Nosema ceranae* disease. *American Bee Journal* 149, 1053–1056.

Uredba komisije ES št. 152/2009 o določitvi metod vzorčenja in analitskih metod za uradni nadzor krme. 2009. Uradni list Evropske unije, EC Priloga III F MOD, L 54/1.

van den Heever J.P., Thompson T.S., Curtis J.M., Ibrahim A., Pernal S.F. 2014. Fumagillin: an overview of recent scientific advances and their significance for apiculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:2728–37.

Vannette R.L., Mohamed A., Johnson B.R. 2015. Forager bee (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Scientific Reports* 5:16224.

Vavra J., Larsson J.I.R. 1999. Structure of the microsporidia. 7 – 84. V: Soklič M. in Gregorc A. 2016. Comparison of the two microsporidia that infect honey bees – a review. *Agricultura* 13, 49-56.

Vidau C., Panek J., Texier C., Biron D.G., Belzunces L.P., Le Gall M., Broussard C., Delbac F., El Alaoui H. 2014. Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *Journal of Invertebrate Pathology* 121: 89–96.

Wang H., Zhang S., Yan W. 2014. Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee workers. *Apidologie* 45, 618–625.

Wang I., Moeller F.E. 1969. Histological comparisons of the development of hypopharyngeal glands in healthy and nosema-infected worker honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14: 135-142.

Wang I., Moeller F.E. 1970. Comparison of the free amino acid composition in the hemolymph of healthy and *Nosema*-infected female honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 15, 202–206.

Wang I., Moeller F.E. 1971. Ultrastructural changes in hypopharyngeal glands of worker honey bees infected by *Nosema apis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17: 308-12.

Weidner E., Findley A.M., Dolgikh V., Sokolova J. 1999. Microsporidian biochemistry and physiology. V: The Microsporidia and Microsporidiosis. Wittner M. in Weiss L.M. (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 172– 195.

Williams G.R., Alaux C., Costa C., Csáki T., Doublet V., Eisenhardt D., Fries I., Kuhn R., McMahon D.P., Medrzycki P., Murray T.E., Natsopoulou M.E., Neumann P., Oliver R., Paxton R.J., Pernal S.F., Shutler D., Tanner G., van der Steen J.J.M., Brodschneider R. 2013. Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research* 52(1). V: Dietemann, V., Ellis, J.D., Neumann, P. (Eds.), *The Coloss Beebook, Volume I, Standard methods for Apis mellifera research*. *Journal Apicultural Research*, 52.

Williams G.R., Sampson M.A., Shutler D., Rogers R.E.L. 2008. Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal Invertebrate Pathology* 99, 342-4.

Wilson-Rich N., Dres S.T., Starks P.T. 2008. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 54, 1392–1399.

Wilson-Rich N., Spivak M., Fefferman N.H., Starks P.T. 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual Review of Entomology* 54, 405–423.

Winston M.L. 1987. *The Biology of the Honey Bee*. Cambridge, Mass: Harvard University Press.

Wu G. 2010. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Advances in Nutrition* 1, 31–37.

Zander E. 1909. Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung* 31, 196–204.

Zheng B., Wu Z., Xu B. 2014b. The effects of dietary protein levels on the population growth, performance, and physiology of honey bee workers during early spring. *Journal of insect science* 14 (191).

Zheng H.Q., Lin Z.G., Huang S.K., Sohr A., Chen Y.P. 2014a. Spore loads may not be used alone as a direct indicator of the severity of *Nosema ceranae* infection in honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 107 (6), 2037–2044.

Življenjski krog noseme. <http://scientificbeekeeping.com/the-nosema-twins-part-1/> (datum dostopa: 10.1.2020).

Življenjski krog noseme. Mehlhorn H. 2015. *Nosema apis*. V: Mehlhorn H. 2015. (eds) *Encyclopedia of Parasitology*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-642-27769-6_2149-2.pdf (datum dostopa: 10.1.2020).