
Andrijana Popov

Utvrđivanje zavisnosti stepena infestiranosti mikrosporidijama roda *Nosema* od jačine pčelinjih društava *Apis mellifera*

Jedno od najrasprostranjenijih i ekonomski najštetnijih oboljenja pčelinjih društava je nozemoza, čiji su uzročnici dve vrste mikrosporidija: Nosema apis i Nosema ceranae. Cilj ovog istraživanja je da se ispita zavisnost stepena infestiranosti mikrosporidijama roda Nosema od jačine pčelinjih društava. Istraživanje je obuhvatalo 15 društava – po 5 jakih, srednje jačine i slabih, koja nisu tretirana protiv oboljenja. Svaki uzorak činilo je 100 adultnih pčela radilica uzorkovanih u maju 2015. godine. Kategorizacija društava izvršena je na osnovu broja adultnih pčela u košnici, količine rezervi hrane (meda, polena, perge) i dnevnog unosa nektara. Stepennost infestiranosti je izražen brojem spora po pčeli. Spajanjem 5 uzoraka po grupi, napravljena su 3 zbirna uzorka iz kojih je izolovana DNK. Identifikacija vrsta mikrosporidija izvršena je duplex PCR metodom. Utvrđeno je da je uzročnik infekcije N. ceranae. Analiza podataka ukazuje na efekat jačine pčelinjeg društva na infestiranost.

Uvod

Medonosna pčela ili pčela medarica (*Apis mellifera*) je insekt svrstan u red Hymenoptera, podred Apocrita. Živi u visoko organizovanim zajednicama, tj. rojevima ili pčelinjim društvima,

unutar kojih je zastupljena podela rada. Prema parametrima jačine društva: broju adultnih pčela u košnici, količini rezervi hrane (meda, polena, perge), površini otvorenog i zatvorenog legla i dnevnom unosu nektara, izvršena je klasifikacija na jaka društva, društva srednje jačine i slaba društva. Jaka društva su otpornija na bolesti i štetnošću, bolje prezimljavaju, u proleće su spremnija za glavnu pašu i donose veću količinu meda (Antonić 1999; Tomanović 2012).

Udeo pčela u ukupnom oprašivanju iznosi 70-90%, što ih čini najznačajnijim oprašivačima (Arbol 2012; Levy 2011). Smatra se da čak trećina namirnica zastupljenih u ishrani ljudi zavisi od oprašivanja koje vrše pčele. Utiču na povećanje prinosa i kvaliteta plodova, a njihovi produkti (med, vosak, propolis, matični mleč, perga) koriste se za proizvodnju dijetetskih suplemenata, lekova i kozmetičkih preparata (Veličković 2007).

Upotrebom različitih vrsta pesticida čovek vrši izuzetno jak negativan uticaj na pčele, čineći ih sve podložnijim raznim virusnim, bakterijskim i gljivičnim oboljenjima (Stanimirović *et al.* 2000).

Jedno od najrasprostranjenijih i ekonomski najštetnijih oboljenja pčela je nozemoza (Pakistan 2011). Danas su poznate nozemoza tipa A, čiji je uzročnik mikrosporidija *Nosema apis* i nozemoza tipa C, čiji je uzročnik mikrosporidija *Nosema ceranae* (COLOSS workshop 2009; Glavinić *et al.* 2013). Nasuprot ranijoj klasifikaciji u praživotinje, utvrđeno je da rod *Nosema* pripada carstvu gljiva (Manger 2011). Česta je pojava mešovite infekcije tj. prisustvo obe mikrosporidije u okviru istog društva (Mussen 2011). Obe vrste mikrosporidija su obligatni unutarćelijski paraziti. Parazitiraju u epitelnim ćelijama želuca i srednjeg creva adultnih pčela, a *N. ceranae* pokazuje afinitet i prema drugim

Andrijana Popov, učenica 3. razreda IX beogradske gimnazije „Mihajlo Petrović Alas”, Beograd

MENTOR: Uroš Glavinić, dr vet. med, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

tkivima (Mussen 2011). Dok nozemoza tipa A uglavnom ne dovodi do uginuća inficiranih pčela, posledice nozemoze tipa C su daleko pogubnije.

Antibiotik fumagilin do danas je jedino registrovano sredstvo za lečenje infekcije sporama *Nosema apis* (van den Heever *et al.* 2016). Smatra se i efikasnim sredstvom za suzbijanje skoro otkrivene *N. ceranae* (Huang *et al.* 2013) mada neka istraživanja osporavaju ovu tvrdnju (Williams *et al.* 2010; Huang *et al.* 2013). Kao oboljenje sa čestim odsustvom simptoma pre uginuća pčela, nozemoza tipa C danas predstavlja veliku pretnju pčelinjim društvima (Glavinić *et al.* 2013; Stanimirović i Stevanović 2012; Higes *et al.* 2008, 2009; Ikonov 2012).

Ovaj rad ima za cilj da utvrdi stepen zavisnosti jačine infekcije mikrosporidijama *N. apis* i *N. Ceranae* od jačine pčelinjeg društva.

Materijal i metode

Uzorkovanje je obavljeno u maju 2015. na pčelinjaku Katedre za biologiju Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu prema uputstvima Office International des Epizooties – OIE (2008). Selekcija društava izvršena je na osnovu merenja parametara jačine prema metodologiji Botías *et al.* (2013), pri čemu ni jedno od društava nije bilo izloženo tretmanima protiv oboljenja, niti je imalo vidljive simptome drugih oboljenja. Istraživanje je obuhvatalo tri grupe od po 5 društava (5 jakih društava, 5 društava srednje jačine i 5 slabih društava). Svaki uzorak sadržao je 100 pčela izletnica. Uzorkovane pčele uskladištene su na -20°C najmanje 15 minuta, nakon čega je izvršeno maceriranje.

Detekcija spora. Abdomeni pčela svakog uzorka su izmacerirani u 5 mL destilovane vode. Posmatranjem na svetlosnom mikroskopu pri uveličanju $400\times$ macerati su provereni na prisustvo spora.

Utvrđivanje stepena infestiranosti. Dodavanjem po 95 mL destilovane vode u macerat svakog uzorka dobijene su suspenzije od 100 mL (1 mL odgovara jednoj pčeli tj. abdomenu).

Korišćenjem Neubauerove komore za brojanje i Cantwell-ovog (1970) metoda brojanja utvrđen je broj spora po pčeli svakog uzorka.

Na osnovu dobijenog broja spora po pčeli, svakom uzorku dodeljen je odgovarajući stepen infestiranosti: slab (do 1 200 000 spora po pčeli),

srednji (od 1 200 000 do 12 000 000 spora po pčeli) ili jak (preko 12 000 000 spora po pčeli) (Glavinić *et al.* 2013).

Identifikacija vrste mikrosporidija roda *Nosema* rađena je duplex-PCR metodom. Napravljena su tri zbirna uzorka od po 1 mL, pri čemu jedan zbirni uzorak obuhvata uzorke pčela jakih društava, drugi uzorke društava srednje jačine i treći uzorke slabih društava, iz kojih je korišćenjem peqGOLD Tissue DNA Mini Kit-a izolovana DNK.

U duplex-PCR postupku korišćeni su species-specifični prajmeri koje su dizajnirali Martín-Hernández *et al.* (2007): 321APIS-FOR, 321APIS-REV, 218MITOC-FOR i 218MITOC-REV (Glavinić *et al.* 2013), uz sterilisanu vodu kao negativnu kontrolu i referentnu DNK mešovite infekcije *N. apis* i *N. ceranae* kao pozitivnu kontrolu. Primenjen je modifikovan PCR režim prema Martín-Hernández *et al.* (2007):

10 ciklusa

94°C, 4 min (inicijalna DNK denaturacija)

94°C, 15 s

61.8°C, 30 s

72°C, 45 s

20 ciklusa

94°C, 15 s

61.8°C, 30 s

72°C, 50 s (u svakom sledećem ciklusu ovaj korak traje 5 s duže)

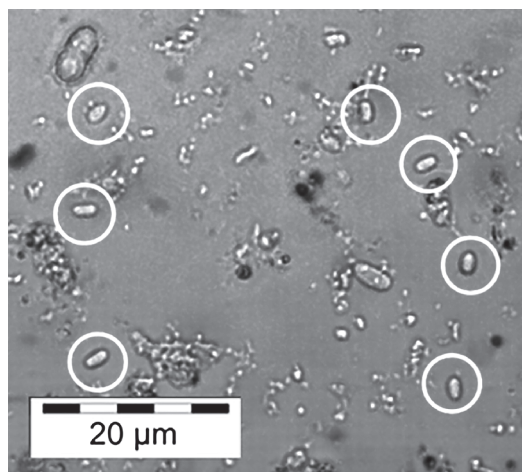
72°C, 7 min (završni korak ekstenzije)

(Glavinić *et al.* 2013)

Dobijeni PCR produkti su razdvojeni elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Nakon bojenja etidijum bromidom, gel je fotodokumentovan.

Rezultati i diskusija

Mikroskopskim pregledom macerata utvrđeno je prisustvo spora u svim uzorcima (slika 1). Rezultati kvantitativne analize infestiranosti prikazani su u tabeli 1. Dobijeno je da broj spora po pčeli opada sa jačinom društva. Takođe, uočljivo je da je varijabilnost u broju spora kod jačih društava znatno manje izražena nego kod slabijih (tabela 1 i slika 2). Rezultati dobijeni analizom varijanse takođe pokazuju statistički značajan efekat jačine pčelinjeg društva na infestiranost: $F(2, 12) = 5.468$; $p < 0.05$. Tukijevim naknadnim



Slika 1. Mikroskopski prikaz spora pri uveličanju 400 × (spore su zaokružene)

Figure 1. Microscopic recording of spores at 400 × magnification

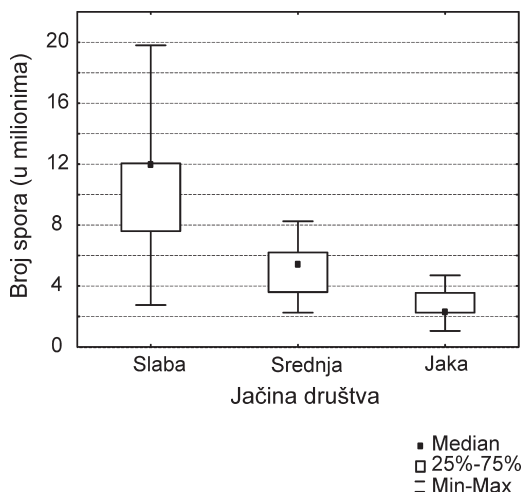
testom dobijena je statistički značajna razlika samo između slabih i jakih društava ($p < 0.05$).

Tabela 1. Broj sporta po pčeli (u milionima)

Grupa	Srednja vrednost	Standardna devijacija
Slaba društva	10.83	6.30
Društva srednje jačine	5.14	2.32
Jaka društva	2.77	1.39

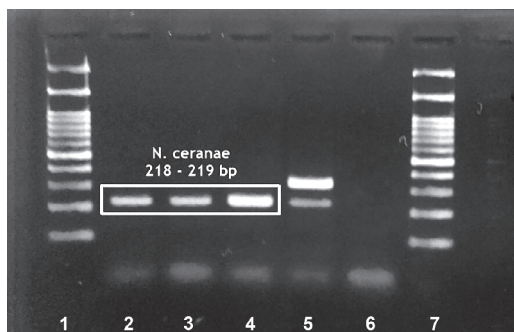
Utvrđeno je da dužine amplicona svih PCR produkata iznose 218–219 baznih parova, što odgovara dužini karakterističnog fragmenta vrste *N. ceranae* (slika 3).

N. ceranae pokazuje drugačiju sezonsku dinamiku od *N. apis*, koja vrhunac brojnosti dostiže u novembru i martu. Spore *N. ceranae* prisutne su tokom cele godine (Mussen 2011; Oliver 2015). Nivo infestiranosti raste tokom jeseni, vrhunac dostiže krajem decembra i opada u proleće da bi tokom leta bio neznatan (Oliver 2015). Pored toga, *N. ceranae* je zamenila *N. apis* kao dominantnu vrstu na prostorima čitavog Balkana (Stevanović *et al.* 2011; 2013). Uzevši ove podatke u obzir, moguće je bilo pretpostaviti



Slika 2. Zavisnost broja spora po pčeli od jačine društva

Figure 2. Dependence of number of spores per bee on bee colony strength



Slika 3. Rezultati elektroforetske analize:

1 – leder, 2 – PCR produkt zbirnog uzorka jakih društava, 3 – PCR produkt zbirnog uzorka društava srednje jačine, 4 – PCR produkt zbirnog uzorka slabih društava, 5 – pozitivna kontrola, 6 – negativna kontrola, 7 – leder

Figure 3. Electrophoretic analysis results: 1 – DNA ladder, 2 – PCR product of the collective sample of high strength bee colonies, 3 – PCR product of the collective sample of moderate strength bee colonies, 4 – PCR product of the collective sample of low strength bee colonies, 5 – positive control, 6 – negative control, 7 – DNA ladder

da će kod svih inficiranih uzoraka biti prisutna infekcija *N. ceranae* ili mešovita infekcija.

Istraživanje Williams *et al.* (2010) sprovedeno u Novoj Škotskoj (Kanada) tvrdi da se infestiranost sporama *N. ceranae* ne može dovesti u vezu sa promenom stepena jačine društva u periodu od septembra do maja. *N. ceranae* je imala veoma mali uticaj na društva tokom ovog istraživanja.

Do sličnih rezultata došao je i Oliver (2015) koji je istraživanje sproveo na teritoriji Sierra Foothills (Kalifornija). Opadanje jačine društva u periodu od septembra do januara nije u korelaciji sa brojem spora u okviru društva, tj. stepenom infestiranosti, iako su društva sa nižim stepenom infestiranosti u decembru bila neznatno jača u martu.

Podaci koji se kose sa rezultatima Williams *et al.* (2010) i Oliver (2015) su zapažanja pčelara koji retko nalaze nozemozu kod svojih najjačih društava, dok je prisustvo spora u najslabijim društvima česta pojava (Oliver 2015).

Varijacije u virulentnosti haplotipova *N. ceranae* u okviru različitih geografskih područja, nedovoljno precizno određeni pragovi infestiranosti, razlike u metodama korišćenim za određivanje stepena infestiranosti (Williams *et al.* 2010), kao i podatak da postoji jaka zavisnost između stepena infestiranosti društva sporama *N. ceranae* i srednje mesečne vrednosti temperature (Oliver 2015) predstavljaju faktore koji su mogli da uzrokuju razliku u rezultatima između našeg istraživanja i pomenutih istraživanja sprovedenih u Kaliforniji i Kanadi.

S obzirom na to da je u pitanju nedavno otkriveni parazit, veoma malo je poznato o njegovoj biologiji (OIE 2004), kao i faktorima koji utiču na razvoj infekcije i posledicama koje ona ima na pčelinje društvo (Fries 2009; Williams *et al.* 2010).

Jedan od trenutno najviše zastupanih pogleda na *N. ceranae* jeste da se radi o parazitu koji je u okviru društva konstantno prisutan u malom procentu, a predstavlja pretnju kada je društvo već oslabljeno dejstvom drugih faktora (npr. nedostatak nutrijenata, prisustvo toksičnih materija u staništu, opadanje temperature, druga oboljenja) (Oliver 2015).

Pošto prilikom sprovođenja našeg istraživanja, izuzev vizuelnog pregleda društava na prisustvo drugih oboljenja, nije uzet u obzir uticaj ovih dodatnih faktora, na osnovu dobijenih rezultata ne može se sa sigurnošću reći da su društva sa porastom jačine sposobnija da se

izbore sa *N. ceranae* kao faktorom koji deluje samostalno. Ipak, može se zaključiti da jaka društva efikasnije suzbijaju štetne efekte izazvane sadejstvom *N. ceranae* i drugih potencijalno prisutnih negativnih faktora.

Zaključak

U okviru ispitanih pčelinjih društava, ona kategorisana kao jaka, u stanju su da se najefikasnije izbore sa infekcijom sporama *N. ceranae* i potencijalnim dejstvom faktora koji imaju štetan uticaj na društva (npr. nedostatak nutrijenata, prisustvo toksičnih materija u staništu, opadanje temperature, razna oboljenja). Podatak o stepenu infestiranosti može se koristiti za predviđanje jačine društva.

U cilju dobijanja preciznijih rezultata istraživanje bi trebalo ponoviti, uz uzimanje u obzir abiotičkog i biotičkog stresa kome su pčele izložene u životnoj sredini. Takođe, promene u jačini društava i stepenu infestiranosti potrebno je pratiti u dužem periodu kako bi se mogli doneti zaključci o sezonskoj dinamici ovih parametara.

Literatura

Antonić M. 1999. Deset pčelarskih zapovedi. *Pčelar*, 7: 333.

Arbol D. P. 2012. *Pollination biology: Biodiversity conservation and agricultural production*. Springer

Botías 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 (1): 25.

Cantwell G. E. 1970. Standard methods for counting Nosema spores. *American Bee Journal* 110: 222-223.

COLOSS workshop 2009. Conclusions. *Proc. Workshop "Nosema disease: lack of knowledge and work standardization" (COST Action FA0803)*. Guadalajara, Spain. Dostupno na: <http://www.coloss.org/publications/Nosema-Workshop-Proceedings.pdf>

- DeGrandi-Hoffman, Wardeli G., Ahumada-Segura F., Rinderer T., Danka R., Pettis J. 2008. Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, **47**: 265.
- Fries I. 2009. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **130** (S1): S73.
- Glavinić U., Stanković A., Stevanović J., Simeunović P., Aleksić N., Stanimirović Z. 2013. Comparison of methods for detection of microsporidia species of the genus *Nosema* in honey bees (*Apis mellifera*). *Arhiv veterinarske medicine*, **6** (1): 19.
- Higes M., Martín-Hernández R., Botías C., Garrido-Bailón E., González-Porto A. V., Barrios L., Del Nozal M. J., Bernal J. L., Jiménez J. J., García-Palencia P., Meana A. 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, **10**: 2659.
- 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.
- Huang W., Solter L. F., Yau P. M., Imai B. S. 2013. *Nosema ceranae* escapes Fumagillin control in honey bees. *PLoS Pathog*, **9** (3): e1003185.
- Ikonov A. 2012. *Medonosna pčela (Apis mellifera) – problem nestajanja pčela (CCD)*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu
- Levy S. 2011. The pollinator crisis: Understanding bees' relationship with introduced species could help. *Nature*, **479**: 164.
- Manger M. 2011. *Nozemoza u pčela*. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador A. M., Garrido-Bailón E., Higes M. 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(20): 6331-6338.
- Mussen E. C. 2011. Diagnosing and Treating *Nosema* Disease. UC Davis – 3/11/11 <http://entomology.ucdavis.edu/files/147621.pdf>
- OIE (Office International des Epizooties) 2004. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. World organization for animal health
- OIE (Office International des Epizooties) 2008. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. World organization for animal health
- Oliver R. 2015. The seasonality of *Nosema ceranae*. *American Bee Journal*, **155** (4): 447.
- Pakston R. J. 2011. *Nosema ceranae* i nestajanje medonosnih pčela (*Apis mellifera*). *Pčelarski žurnal*, **10**: 16
- Stanimirović Z., Soldatović B., Vučinić M. 2000. *Medonosna pčela*. Beograd: Medicinska knjiga
- Stanimirović Z., Stevanović J. 2012. Primena molekularno-genetičkih analiza u veterinarskoj medicini. U *Zbornik predavanja sa XXXIII seminara za inovacije znanja veterinarara* (red. V. R. Stojić). Beograd: Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, str. 17–35.
- Stevanović J., Simeunović P., Gajić B., Lakić N., Radović D., Fries I., Stanimirović Z. 2013. Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. *Apidologie*, **44** (5): 522.
- Stevanović J., Stanimirović Z., Genersch E., Kovačević R. S., Ljubenković J., Radaković M., Aleksić N. 2011. Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*, **42**: 49.
- Tomanović Ž. 2012. *Primenjena entomologija*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Van den Heever J. P., Thompson T. S., Otto S. J. G., Curtis J. M., Ibrahim A., Pernal S. F. 2016. Evaluation of Fumagilin-B® and other potential alternative chemotherapies against *Nosema ceranae*-infected honeybees (*Apis mellifera*) in cage trial assays. *Apidologie*, **47** (5): 617.

Veličković N. 2007. *Pčelarstvo*. Bijelo Polje: Pegaz

Williams G. R., Shutler D., Little C. M., Burger-Maclellan K. L., Rogers R. E. L. 2010. The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagilin-B, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength. *Apidologie*, **42**: 15.

Andrijana Popov

Dependance of *Nosema* spp. Infestation Rates on Honey Bee (*Apis mellifera*) Colony Strength

One of the most widespread and economically harmful honey bee colony diseases is nosema disease or nosemosis, caused by two species of microsporidia: *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. The aim of this study is to determine the dependence of nosema infestation level on bee colony strength. The research included 15 colonies (samples) divided into high, moderate and low strength groups, each group consisting of 5 samples. The colonies had not been exposed to disease treatment prior to sampling. Each sample contained 100 forager bees sampled in May 2015 on the apiary of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Department of Biology. The categorization of colonies was carried out based on the following strength parameters: adult bee population, honey and pollen reserves, open and sealed brood area and daily intake of nectar. The infestation level was expressed as number of spores per bee. The DNA was isolated from 3 bulk samples which were made by merging the five samples within each strength group. Species identification of microsporidia was carried out using the duplex PCR method. The cause of the infestation was identified as microsporidia *Nosema ceranae*. This species is a potential causative factor of colony collapse disorder (CCD).

