

## UGOTAVLJANJE SPOR BACILLUS LARVAE V MEDU PRI ZATIRANJU HUDE GNILOBE ČEBELJE ZALEGE

J. MEHLER\*, B. KRTA, B. ŠNAJDER\*

Veterinarska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo, \*IBEMA, Inštitut za bioelektromagnetiko in okolje

### UVOD

Huda gniloba čebelje zalege, imenovana tudi ameriška gniloba ali kuga, ki jo povzroča bakterija *Bacillus larvae*, je ena izmed najbolj nalezljivih čebeljih bolezni, zaradi katere čebelja družina lahko tudi odmre. Tudi če bolezen odkrijemo dovolj zgodaj, moramo okuženo družino največkrat uničiti, včasih pa moramo s sežiganjem uničiti tudi vse satje in panj, da bi preprečili širjenje bolezni v druge, še zdrave družine. Ta bolezen povzroča tudi znatno gmotno škodo, zahteva veliko napornega dela, pri tem pa čebelar nikoli ne ve, ali se bo bolezen spet pojavila in kdaj se bo to zgodilo. V enakem položaju so tudi čebelarji, ki v svojem čebelnjaku te bolezni še niso imeli, saj obstaja nevarnost, da se bodo znaki hude gnilobe kdaj pojavili tudi pri njih. Huda gniloba se prenaša s spori bakterije *Bacillus larvae*, ne pa tudi z rastočimi oblikami teh bakterij, navzočimi v bolni družini. Spore so zelo trdožive, tako da v panju lahko preživijo tudi več deset let, preden se pokažejo znamenja bolezni. Včasih se bolezen razvije v manjšem obsegu, tako da je čebelar niti ne opazi, in potem sama izgine. Vendar pa v vsaki celici, kjer je čebelja ličinka odmrta zaradi hude gnilobe, nastane več milijard novih spor, ki jih potem čebelar največkrat sam s prestavljanjem satja raznese v druge panje. Okužbo čebelnjaka s spori lahko povečuje tudi čebelar z občasnim preventivnim dodajanjem antibiotikov, če je čebelnjak že okužen s spori. Antibiotik sicer uniči rastoče bakterije, ki so ta hip v bolnih celicah, in tako odstrani vidne znake bolezni, število spor pa se medtem lahko poveča, s tem pa tudi verjetnost vnovičnega izbruha bolezni.

Da čebelarji ne bi še naprej tavalili v temi, so Hansen, Shimanuki in drugi v minulih desetih letih izpopolnili in uvedli v prakso metodo za ugotavljanje števila spor v medu. Po izidih te analize čebelar izve, ali je njegov čebelnjak že okužen s spori in kakšna je stopnja okuženosti. Zato lahko začne izvajati preventivne ukrepe in tako preprečevati, da bi bolezen sploh izbruhnila. Preventivni so le tisti ukrepi, ki zmanjšujejo število spor v čebelnjaku! Ugotavljanje stopnje okuženosti z analizo medu se je v zadnjih letih uveljavilo že v številnih državah po svetu. Znano je, da se ta bolezen vse bolj pojavlja povsod po svetu. Številni strokovnjaki to naraščanje pripisujejo prav občasni preventivni uporabi antibiotikov.

Lani smo metodo ugotavljanja spor v medu uvedli tudi pri nas, in sicer na pobudo Zveze čebelarskih društev Slovenije in ob podpori Republiške veterinarske uprave. Metodo je v prakso uvedel Inštitut za mikrobiologijo na veterinarski fakulteti.

### PREISKAVA MEDU NA SPORE

Preiskavo medu na spore *Bacillus larvae* je v praksi mogoče opraviti le, če uporabimo posebno metodo, s katero na umetnem gojišču ugotovimo rast bakterij. Na teh gojiščih, na katera nanesimo preiskovani material (med), po določenem času (nekaj dni) iz spor vzklijejo rastoče (vegetativne) oblike bakterij, se tu hitro razmnožujejo in oblikujejo posebne vidne tvorbe, ki jih imenujemo kolonije. Videz kolonije *B. larvae* je precej specifičen, tako da izkušenemu preiskovalcu razlikovanje od kolonij drugih vrst bakterij, ki so navadno v preiskovanem materialu in ki tudi lahko zrastejo na umetnem gojišču, ne dela posebnih težav. Kolo-



Zažiganje okuženega satja je že stara metoda zatiranja hude gnilobe, ko se že pojavijo znaki bolezni. Foto: A. Gregorc

nije drugih vrst bakterij, kot na primer kolonije vrste *Bacillus alvei*, pogosto rastejo hitreje kot kolonije *B. larvae* in jih prerastejo, tako da kolonij *B. larvae* ne opazimo oziroma ne spoznamo.

Da v preiskavi ne bi nastale takšne motnje, skušamo preiskovani material na različne načine predhodno obdelati (na primer segrevanje materiala na 80 do 90 °C od 5 do 10 minut) in dodajati gojišču posebne zaviralne snovi, ki včasih ustavijo rast nezaželenih bakterij na gojišču. Kljub temu se včasih zgodi, da je v posameznih vzorcih medu preveč spor drugih bakterij, to pa nam onemogoča preiskavo.

Kolonijo bakterij, za katero menimo, da je nastala iz spore *B. larvae*, preiščemo s posebnimi testi (tudi mikroskopsko), da zanesljivo dokažemo vse lastnosti, značilne za to vrsto.

Raziskovalci (Hansen<sup>1</sup> in drugi) so ugotovili, da številne spore *B. larvae* niso sposobne vzkliti na gojišču. Dokazali so, da od približno 2.000 spor v enem gramu medu na gojišču vzklije samo ena. To pa, na žalost, pomeni, da ne moremo ugotoviti navzočnosti spor v medu, če je število spor majhno. Za pregled vzorca medu na prisotnost spor *B. larvae* je navadno potrebna posebna priprava vzorca. V literaturi je opisanih več načinov priprave vzorcev. Vsem je skupno to, da vzorec pred nanašanjem na umetno gojišče za 5 do 10 minut termično obdelamo pri 80 do 90 °C. S tem ubijemo vse bakterije, ki niso v obliki spor.

To je potrebno zaradi tega, da nam številne rastoče bakterije različnih vrst, ki so vedno v medu, ne zrastejo na umetnem gojišču in s tem ne preprečijo, da bi dognali pravi rezultat preiskave.

V začetku so pri preiskavah medu<sup>2</sup> na prisotnost *B. larvae* po termični obdelavi nanašali manjše količine medu (pribl. 0,08 g) neposredno na umetno gojišče. Pozneje sta se uveljavila predvsem dva postopka priprave vzorcev za preiskavo.

Po enem postopku vzorec medu (posamezni preiskovalci uporabljajo različne količine, od 25 g do 125 g) najprej raztopimo v sterilni fiziološki raztopini, nato pa s centrifugiranjem pri velikem številu obratov dosežemo, da se bakterije ali njihove spore zberejo skupaj na dnu posode. Usedlino, v kateri so med drugim tudi spore, nato termično obdelamo, tako da ostanejo žive samo spore. Termično obdelano usedlino nanesemo na umetno gojišče. Da bi lahko ugotovili število spor *B. larvae*, hkrati pa zmanjšali možnost, da bi gojišče prerasle spore drugih vrst bakterij, na gojišče nanašamo različne točno odmerjene količine usedline.

Po drugem postopku<sup>3</sup> med raztopino v sterilni fiziološki raztopini in nato vzorec prenesemo v dializno cev, ki jo tesno zapremo in namestimo v večjo količino vode (v 24 urah vodo večkrat zamenjamo). Skozi steno dializne cevi lahko prehajajo samo kristaloidi. Tako se s pomočjo ozmoze iz dializne cevi izloči (sladkor), v cevi pa se

nabere voda. V cevi ostanejo v vodi nekristaloidi, predvsem pa morebitni večji trdni delčki (smeti) in mikrobi (bakterije in njihove spore). Vsebino cevi nato centrifugiramo. Nadaljnji postopek je enak prvemu. Če v vzorcu pričakujemo majhno število spor, si pri izolaciji spor *B. larvae* pomagamo tudi s filtracijo.

Laboratoriji sporočajo rezultate preiskav navadno z izrazom »pozitivno«, če v vzorcu ugotovijo spore *B. larvae*, oziroma »negativno«, če teh spor ne izolirajo. Nekateri ob rezultatu navedejo tudi število ugotovljenih spor *B. larvae* v enem ali petih gramih. Drugi ugotovljeno število spor izražajo s številom križcev. Na primer takole: Hornitzky<sup>4</sup> označuje pozitiven rezultat, če je v enem gramu medu ugotovil 2.000 do 40.000 spor, s »+«, če jih je ugotovil med 40.000 in 100.000 v enem gramu, s »++«, če pa je spor v vzorcu več kot 100.000 v enem gramu, rezultat označi s »+++«.

Preizkušali smo vse opisane postopke za ugotavljanje spor *Bacillus larvae* v medu. Odločili smo se za postopek, po katerem večjo količino medu (50 do 150 g) raztopimo v sterilni vodi, centrifugiramo, usedlino termično obdelamo in jo v različnih točno znanih količinah nanesimo na več posebnih selektivnih gojišč. Vzorec inkubiramo do 10 dni pri 36 °C. Če nam vsa gojišča, ki smo jih cepili za en vzorec, prerastejo druge vrste bakterij, postopek ponovimo.

Rezultate analiz smo v prvem letu prei-

Tabela 1: Rezultati preiskav medu na spore *Bacillus larvae*

Preiskava	Rezultat	Število	Odstotek
Čebelnjakov	pozitiven	116	39.73
	negativen	176	60.27
	skupaj	292	100.00
Vzorcev medu	pozitiven	137	42.02
	negativen	189	57.98
	skupaj	326	100.00

skav (1993) sporočali povečini z oznako »pozitivno« oziroma »negativno«. Le v nekaj primerih smo navedli tudi ugotovljeno število spor v enem gramu vzorca.

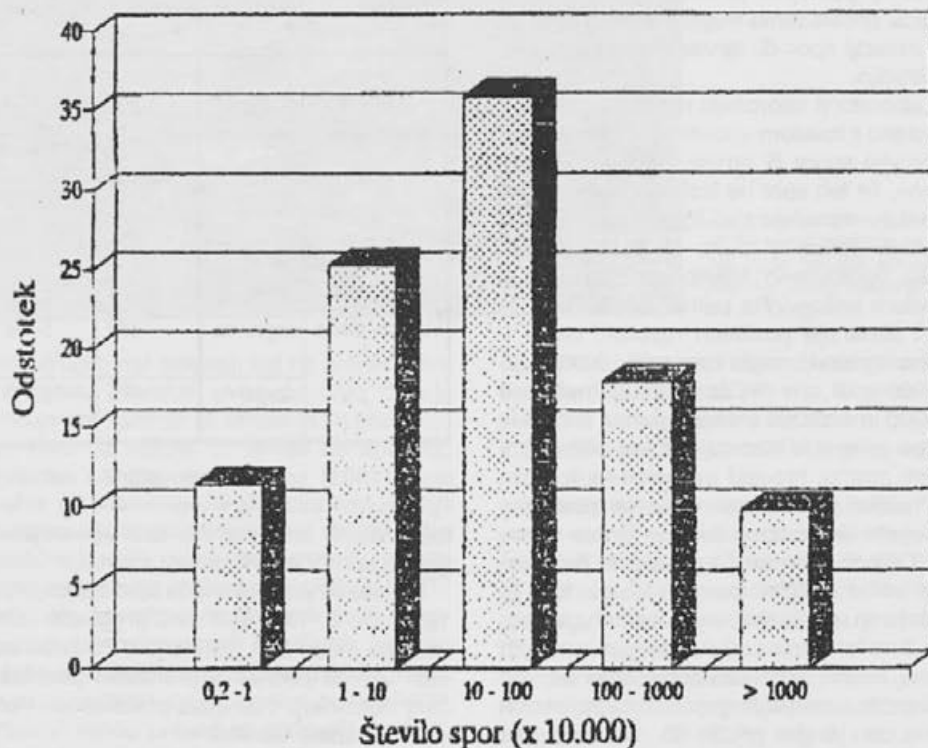
Preiskave vzorcev medu smo začeli julija 1993. Do 1. 12. 1993 smo pregledali 326 vzorcev medu 292 čebelarjev. Povečini so nam vzorce pošiljali v preiskavo pooblaščenim veterinarjem. Rezultati preiskav so razvidni iz tabele številka 1.

V začetne preiskave smo želeli zajeti predvsem vzorce iz okolišev z ugotovljeno hudo gnilobo čebelje zalege oziroma s sumom na to bolezen. Tak je bil tudi pred-

Dobro oskrbovana in živalna družina z močnim čistilnim nagonom je že precejšnja garancija, da se družina lahko do neke meje sama obrani okužbe.  
Foto: J. Mihelič



**Grafikon 1: Odstotek vzorcev glede na število spor  
*Bacillus larvae***



log Republiške veterinarske uprave, ki je financirala preiskave. Zaradi tega je bilo število pozitivnih vzorcev in število spor v vzorcih razmeroma veliko. Zelo podobne rezultate so v raziskavah ugotovili tudi v nekaterih drugih državah. Tako so v začetnih raziskavah v Avstriji<sup>5</sup> leta 1992 preiskali le vzorce (79 domačih in 5 iz tujine) iz sumljivih in obolelih čebelnjakov. Ugotovili so 52,7 odstotka pozitivnih vzorcev.

V začetnih preiskavah od pošiljateljev vzorcev nismo zahtevali in povečini tudi nismo dobili podatkov o zdravstvenem stanju čebel glede na hudo gnilobo čebelje zalege. Tako nismo mogli primerjati ugotovljenega števila spor v posameznih vzorcih z zdravstvenim stanjem v čebelnjakih.

#### **RAZPRAVA IN SKLEPI**

V prvem letu uvajanja metode nismo

namenili posebne pozornosti sistematiki odvzemanja vzorcev medu. Tako so bili vzeti vzorci medu iz bolnih družin, iz družin brez znamenj hude gnilobe in v večini primerov vzorci medu zadnjega točenja. V prihodnje bomo jemali samo povprečne vzorce, torej vzorce zadnjega točenja. Rezultat analize takega vzorca medu nam pove povprečno stopnjo okuženosti čebelnjaka. Stopnji okuženosti bodo potem prilagojeni tudi preventivni ukrepi.

Seveda bi bilo ugodno, če bi imeli dovolj preprosto metodo, po kateri bi hkrati lahko ugotovili stanje okuženosti oziroma navzočnosti spor v vsakem posameznem panju. Take metode intenzivno iščejo in preučujejo v svetu in tudi že pri nas.

## Literatura:

1. Hansen, H.: Methods for determining the presence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honey. Tidsskr. Planteavl 88 (1984), 325-328.
2. Hansen, H.: The incidence of the foulbrood bacterium *Bacillus larvae* in honeys retailed in Denmark. Tidsskr. Planteavl 88 (1984), 329-336.
3. Shimanuki, H.; Knox, D. A.: Improved Method

for the Detection of *Bacillus larvae* Spores in Honey. American Bee Journal, maj 1988, 353-354.

4. Hornitzky, M. A. Z.; Clark S.: Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. Journal of Apicultural Research, 30(1) (1992) 13-16.
5. Grimm, M.; Moosbeckhofer, R.: Untersuchung österreichischer Honige auf das Vorhandensein von *Bacillus larvae* - Sporen. Bienenvater 4 (1993), 167-171.

## NOVI ČEBELARSKI KNJIŽICI NA POT

VLASTA JENČIČ

Zadnje dni decembra lani je v Zagrebu izšla nova strokovna publikacija s področja čebelarstva z naslovom Temelji suvremenog pčelarenja. Avtorji so prof. dr. Đuro Sulimanović, mag. Ljerka Zeba in mag. Josip Marković. Knjižica je prva v zbirki strokovnih publikacij z naslovom Biblioteka; v njej bodo izšle še druge knjižice, ki bodo zajele vso tematiko čebelarstva in čebelarjenja na splošno, vzrejo matic, bolezni čebelje družine in drugo.

Znana knjiga Pčelarstvo je bila prvič izdana leta 1968, bila nekajkrat ponatisnjena, zadnjič leta 1990. Knjige so povečini pošle, veliko strokovnih spoznanj se je spremenilo, čebelarstva znanost je napredovala, predvsem pa se je spremenil pomen čebelarstva v družbi. Tako je bilo treba zapolniti vrzel, ki je nastala, in tega dela se je lotil prof. dr. Đuro Sulimanović, sicer tudi soavtor Pčelarstva. K delu je pritegnil mlada sodelavca – mag. Zebovo in mag. Markovića – in s publikacijo Temelji suvremenog pčelarenja začel izdajati Biblioteko. Organizacijsko in finančno sta zbirko podprla podjetje PIP iz Zagreba

in njegov lastnik gospod Ivan Bračić.

Prva knjižica je posvečena spominu na akademika prof. dr. Iva Tomašca. Razdeljena je na več poglavij: Biološke osnove čebelarjenja, Medovito in pelodno rastlinje, Čebelji pridelki in njihova uporaba, Sodobna tehnologija čebelarstva proizvodnje, Bolezni čebel in Izobraževanje za delo v čebelarstvu. Ta poglavja so kratke zaključene celote omenjenih tem, tako da je knjižica sama zaključena celota. Hkrati pa je tudi nekakšen uvod, saj vsako poglavje nakazuje snov drugih publikacij Biblioteka. Posameznik bo lahko kupil celotno zbirko ali pa le posamezno knjižico iz zbirke.

Knjižica je napisana pregledno in razumljivo. Vsekakor je prijetna in koristna obogatitev strokovne čebelarstva literature, sicer na tleh sosednje države, vendar bo dobrodošlo čtivo tudi za marsikaterega slovenskega čebelarja.

Asist. mag. Vlasta Jenčič, dr. vet. med.  
Veterinarska fakulteta, Ljubljana



z tuje literature

## DODAJANJE MATIC S POMOČJO UMETNEGA MATIČNIKA

JOHAN STICKLER – Bienenwelt, št. 3 1993

Če čebelja družina ostane brez matice ali če pride do preleganja, potem čebele potegnejo matičnike, iz katerih se izleže matica. Ko le-ta dozori, pregrize membrano, ki zapira matičnik, in prileze na dan. Tako v naravi. Pojavlja pa se vprašanje, ali

lahko z umetno oplojeno matico dosežemo učinek, enak opisanemu, naravnemu. Mislim, da lahko, zato bom opisal, na kakšen način.

Sam sem razvil t.i. umetni dodajalni matičnik, z njim pa lahko dosežemo naravno