



ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra	V4-1605
Naslov	Uporaba hmeljnih pripravkov za ekološko zatiranje varoje (Varroa destructor)
Vodja	17916 Iztok Jože Košir
Naziv težišča v okviru CRP	1.2.2 Uporaba hmeljnih pripravkov za ekološko zatiranje varoje (Varroa destructor)
Obseg učinkovitih ur raziskovalnega dela	806
Cenovna kategorija	D
Obdobje trajanja	10.2016 - 09.2019
Nosilna raziskovalna organizacija	416 Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	401 Kmetijski inštitut Slovenije 406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta 425 ČEBELARSKA ZVEZA SLOVENIJE 787 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.04 Veterina 4.04.03 Terapija in zdravstveno varstvo živali
Družbeno-ekonomski cilj	08. Kmetijstvo
Raziskovalno področje po šifrantu FORD	4 Kmetijske vede in veterina 4.03 Veterina

2. Sofinancerji

	Sofinancerji		
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano	
	Naslov	Dunajska cesta 22, 1000 Ljubljana	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

V času izvajanja projekta smo naredili pregled in popis na tržišču dostopnih pripravkov za zatiranje varoje.

Proučevali smo učinek hmeljnih kislin na smrtnost varoj in njihovo toksičnost na varoje. Komore s čebelami ali/in petrijevke z varojami smo namestili v termostatsko sobo s temperaturo 34° C in vlago 65 % in učinkovitost hmeljnih kislin ter toksičnost na čebele preverjali v nekaj urnih časovnih intervalih. V raziskavi smo ugotovili, da v laboratorijskih pogojih hmeljne kisline že v kratkem času pri nizkih koncentracijah učinkujejo na smrtnost varoj, način delovanja pa je nepoznan. Hmeljne kisline in topilo so toksični tudi za čebele, zlasti še pri daljšem delovanju. Hmeljne kisline imajo potencial za razvoj zdravila za zatiranje varoj, čeprav je smrtnost čebel v laboratorijskih pogojih visoka in že pri nižjih koncentracijah doseže 10%.

Hmeljne ekstrakte smo dodali v standardno krmilno mešanico vode in sladkorja. Mešanice smo dali čebelah »ad libitum«, »per os« ter mešanice aplicirali tudi topikalno na toraks čebel. V vseh treh poskusih smo ugotavljali smrtnost, večjo od pričakovane. Histološki pregled črevesja je pokazal poškodovanost celičnih membran, zlasti v področju peritrofične membrane. Domnevamo, da mehanizem delovanja hmeljnih kislin (HBA) ni sistemski.

Pripravili smo opazovalne panje, v katerih smo z videokamero spremljali čistilno vedenje čebel. Primerjali smo število čistilnih plesov v panjih, v katere smo vstavili hmeljni ekstrakt, s čistilnim vedenjem družin brez ekstrakta. Po vstavitvi HBA smo opazili začetno averzijo čebel v družini, ki se je pokazala kot umik čebel iz bližine nosilca in povečano število čistilnih plesov.

Učinkovitost hmeljnega ekstrakta smo preskušali na čebeljih družinah. Preizkus smo izvajali v letih 2017 do 2019. Ugotovili smo, da so za nanos hmeljnega ekstrakta vileda krpe primernejše od celuloznih trakov. Glede učinkovitosti hmeljnega ekstrakta smo ugotovili, da 16 % kot tudi 18 in 20 % nimajo dovolj velike učinkovitost za zatiranje varoj. Učinkovitost je bila manjša od 25 %.

Pri preskušanju stabilnosti razredčenih hmeljnih ekstraktov pri kontroliranih pogojih smo ugotovili, da vsebnost beta-kislin s časom zelo intenzivno pada. Že po 3 dneh njihova vsebnost pade za 65 %, po 6 dneh pa že za približno 88%.

V projektu smo se osredotočili tudi na vsebnosti beta-kislin v različnih genotipih hmelja. V ta namen smo v času tehnološke zrelosti izbrali 53 vzorcev in v njih določili hmeljne kisline ter vsebnosti eteričnega olja. Med genotipi smo odkrili pet takšnih, kjer je bila vsebnost beta-kislin več kot 6 %.

V času izvajanja projekta smo uspeli navezati stike s podjetjem Škrlj d.o.o., kjer smo poskusno izvedli ekstrakcije hmelja, pod različnimi pogoji ekstrakcije. Iz podatkov lahko razberemo, da je sestava ekstraktov zelo različna, glede na ekstrakcijske pogoje. Oprema v podjetju omogoča pridobivanje različnih ekstraktov, v odvisnosti od zasnove tehnološkega postopka.

ANG

During the implementation of the project, we made a broad search and inventory of available preparations for suppression of varroa. Hop acids effects on varroa mortality and honeybee toxicity was studied. Chambers with bees and/or petri dishes with varroa were placed in a thermostat with temperature of 34 °C and 65 % of humidity where the efficacy of the hops on varroa mortality and bee toxicity was checked at hourly intervals. In the study was found that, under laboratory conditions, hop acids in short time, at low concentrations, have an effect on the varroa mortality however the mode of their action is unknown. However, hop acids and the solvent were toxic also for the bees, especially after prolonged action. Hop acids have the potential to develop a drug for varroa control, although the mortality of bees is high in laboratory conditions and reaches 10% already at lower concentrations.

Hops extracts were added to standard feeding syrup. The feeds syrups were available to bees »*ad libitum*«, »*per os*« and applied syrups topically on the bee's thorax. In all three experiments we recorded higher-than-normal mortality. Histological examination of the mid-gut showed cell damages especially in the area of peritrophic membrane. We exclude the possibility of systemic mode of action of HBA.

Observation hives were set up to monitor the hygienic behavior with focus on the grooming dances. We compared the number of grooming dances in hives with and without hops extracts. After the insertion of hops extract we noted initial aversion of bees, which removed themselves away from the carrier and increased number of grooming dances.

The efficacy of hop extracts was tested on honey bee families. The test was performed from 2017 to 2019. We found that willow cloths were more suitable than cellulose strips. Regarding the efficiency of hop extracts, we found that 16%, as well as 18% and 20%, did not have a sufficiently high efficiency to suppress the varroa. The efficiency was less than 25%.

In testing the stability of the diluted hop extracts under controlled conditions, we found that the beta-acid content decreased very intensely over time. After 3 days their content drops by 65% and after 6 days it drops by about 88%.

In the project work, we focused also on the content of beta-acids in various hop genotypes. We selected 53 hop genotypes during the technological maturity and determined alpha- and beta-acids, as well as the content of essential oil. Among the genotypes we found five breeding lines where beta-acids content was over 6%.

During the implementation of the project, we managed to establish contact with the company Škrlj d.o.o., where we experimentally extracted hops, under different extraction conditions. It can be seen from the data that the composition of the extracts is very different, depending on the extraction conditions. Equipment in the company is so flexible that it allows the production of various extracts, depending on the design of the technological process.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev raziskovalnega projekta²

Celoten izvedeni ciljni raziskovalni projekt V4-1605 (CRP v nadaljevanju) je bil sestavljen iz štirih delovnih sklopov DS1 do DS4, ki so sledili ciljem pri temi 1.2.2. javnega razpisa v letu 2016. Zaradi kompleksnosti in interdisciplinarnosti projekta, je bilo v projektno skupino vključenih več različnih strokovnjakov in inštitucij za

posamezna področja.

V nadaljevanju podajamo aktivnosti rezultate, ključne ugotovitve, rezultate in učinke po posameznih sklopih/ciljih.

DS1: Pridobitev podatkov o sestavi in načinu aplikacij pripravkov za zatiranje varoje

V času izvajanja projekta smo naredili pregled in popis na tržišču dostopnih pripravkov za zatiranje varoje. Pripravili smo popis različnih načinov aplikacije in primerjali učinkovitosti in mehanizme njihovega delovanja ter morebitnih negativnih lastnosti. Na osnovi teh podatkov smo pripravili strokovno monografijo, ki bo prosto dostopna vsem zainteresiranim čebelarjem. Trenutno je v tehnični pripravi za tisk in bo izdana v 1000 izvodih.

DS2: Izvedba praktičnih preskušanj pripravkov na osnovi hmelja v različnih časovnih okvirih in na različno prizadetih čebeljih družinah

Delo v tem sklopu je bilo glede na različna podpodročja razdeljeno v 7 delovnih podsklopov od DS2.1 do DS2.7.

DS2.1 - DS2.3 Ugotavljanje vpliva hmeljnih kislin na smrtnost varoj (*Varroa destructor*) in toksičnosti za čebele (*Apis mellifera carnica*) v laboratoriju

Učinek hmeljnih beta-kislin (BHK) na smrtnost varoj in njihovo toksičnost na varoje smo proučevali na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Za poskuse smo varoje pridobivali v močno napadenih čebeljih družinah v čebelnjakih po Sloveniji, čebele pa v inštitutskem čebelnjaku. Priredili smo komore s pitalnikom, v katere smo namestili čebele same ali pa čebele, na katere smo nanесли po eno varojo, varoje same pa smo namestili v petrijevke. Komore s čebelami ali/in petrijevke z varojami smo namestili v termostatsko kontrolirano atmosfero in vlago in učinkovitost hmeljnih kislin ter toksičnost na čebele preverjali v nekaj urnih časovnih intervalih. Preskušali smo različne koncentracije hmeljnih kislin ter eteričnih olj od 0,1% do 5%. V raziskavi smo ugotovili, da v laboratorijskih pogojih hmeljne kisline že v kratkem času pri nizkih koncentracijah učinkujejo na smrtnost varoj, način delovanja pa je nepoznan, saj smrtnost varoj povzročajo že sama eterična olja in topilo. Na varoje delujejo že sama eterična olja, ob manjši toksičnosti za čebele, kot jo imajo hmeljne kisline. Hmeljne kisline imajo potencial za razvoj zdravila za zatiranje varoj, čeprav je smrtnost varoj v laboratorijskih pogojih visoka in že pri nižjih koncentracijah doseže 10%.

Zaključki DS2.1 – DS2.3

V raziskavi smo ugotovili, da BHK že v kratkem času pri nizkih koncentracijah učinkujejo na smrtnost varoj. Mehanizem delovanja je nepoznan. Žal pa BHK delujejo toksično tudi na čebele, zlasti še po daljšem delovanju. Poudariti je treba, da so eterična olja bistveno manj toksična na čebele, kar bi veljalo raziskati in morda za zatiranje varoj uporabljati samo eterična olja hmelja.

BHK sicer imajo potencial za razvoj zdravila za zatiranje varoj, je pa smrtnost čebel previsoka.

DS2.4 Test »oralne« toksičnosti hmeljevih ekstraktov za čebelo

Hmeljne ekstrakte smo dodali v standardno krmilno mešanico vode in sladkorja. Podobno smo pripravili tudi kontrolno mešanico, ki je vsebovala le topilo hmeljnih kislin, propilen glikol (PG). Mešanice smo dali čebelarjem »ad libitum«, »per os«, v enem poskusu smo mešanice aplicirali topikalno na toraks čebel. V vseh treh poskusih smo

ugotavljali smrtnost, večjo od pričakovane. Histološki pregled črevesja je pokazal poškodovanost celične stene, zlasti v področju peritrofične membrane. Domnevamo, da mehanizem delovanja hmeljnih beta-kislin ni sistemski, saj bi glede na histološke poškodbe, opazili povečano smrtnost čebel.

Zaključek DS2.4

Zaključek sklopa DS2.4 je presenetljiv: opazili smo toksičnost BHK (in PG!) za čebele. Prepričani smo, da učinek BHK na varoje ni sistemski, saj ob tem propadajo tudi čebele.

DS2.5 Vpliv hmeljevih ekstraktov na čistilno vedenje čebel

Pripravili smo opazovalne panje, v katerih smo z videokamero spremljali čistilno vedenje čebel. Primerjali smo čistilno vedenje čebelje družine v panjih, v katerega smo vstavili hmeljni ekstrakt, s čistilnim vedenjem družin brez ekstrakta. Po vstavitvi BHK smo opazili začetno averzijo čebel v družini, ki se je pokazala kot umik čebel iz bližine nosilca in povečano število čistilnih plesov, ki je verjetno prispeval k zabeleženemu povečanemu odpadu varoj. Naravni odpad varoje je tesno koreliral z intenziviranjem čistilnega vedenja. V kontrolnem panju nismo opazili niti intenziviranja plesov niti odpada varoje. Po vstavitvi se je situacija spremenila, maksimalni odpad je bil 41 varoj/dan, ki je zlagoma upadal in se ustalil pri treh varojah na dan. Po sedmih dneh smo trak s z BHK odstranili in za štiri tedne vstavili Checkmite, ki je sprožil odpad v povprečju 1.75/dan. V kontrolnem panju je bil odpad v času poskusa med 0 in varoje na dan.

Zaključek DS2.5

Kaže, da je mehanizem delovanja povezan s stimulacijo čistilnih lastnega čiščenja. Vendar je averzija na vstavljeni nosilec BHK zaskrbujoča: nosilec z BHK bi lahko vsaj hipotetično pregnal čebele z zalege, kar bi prizadelo normalen razvoj. Opaženo averzijo bi bilo potrebno bolj detajlno preučiti.

DS2.6 Pilotni poskus delovanja z izvedbo testiranja na čebeljih družinah

Učinkovitost hmeljnega ekstrakta smo preskušali na čebeljih družinah. Preizkus smo izvajali v letih 2017 do 2019. V testu smo uporabili dva nosilca, celulozne trakove in »vileda« krpe ter koncentracije hmeljnega ekstrakta 16, 18 in 20 %. V poskus je bilo vključenih v prvem letu 30 čebeljih družin v naslednjih dveh pa po 24. Ugotovili smo, da so za nanos hmeljnega ekstrakta vileda krpe primernejše od celuloznih trakov. Celulozne trakove so čebele grizle in odstranjevale iz panjev. Vileda krpe so se izkazale kot obstojnejše. Glede učinkovitosti hmeljnega ekstrakta smo v pozno poletnem in jesenskem času ugotovili, da 16 % kot tudi 18 in 20 % nimajo dovolj velike učinkovitost za zatiranje varoj. Učinkovitost je bila manjša od 25 %. Prednost hmeljnega ekstrakta je v tem, da se ne nalaga v medu in je zato mogoče z njim zatirati čebele tudi pred točenjem medu oz. v času čebelje paše.

Zaključek DS2.5

V poskusu smo ugotovili, da so za nanos BHK vileda krpe bolj primerne od celuloznih trakov. Glede učinkovitosti pa smo ugotovili, da 16 % kot tudi 18 in 20 % nimajo dovolj veliko učinkovitost za zatiranje varoj. Učinkovitost je bila manjša od 25 %. Prednost HE pa je v tem, da se ne nalaga v medu in je zato mogoče z njim zatirati čebele tudi pred točenjem medu.

DS2.7 Izdelava prototipa farmacevtskega pripravka na osnovi ekstrakta BHK in

ocena vpliva staranja na stabilnost

Pri preskušanju stabilnosti razredčenih hmeljnih ekstraktov pri kontroliranih pogojih smo ugotovili, da vsebnost BHK s časom zelo intenzivno pada. Že po 3 dneh njihova vsebnost pade za 65 %, po 6 dneh pa že za približno 88%. Po 10 dneh kislin na nosilcih praktično ni več. Glede na poznano oksidacijsko nestabilnost beta-kislin, njihovo hitro padanje ob izpostavitvi kisiku pri povišani temperaturi ni presenečenje.

Zaključek DS2.7

Glede na poznano oksidacijsko nestabilnost BHK, njihovo hitro padanje ob izpostavitvi kisiku in pri povišani temperaturi ni presenečenje. Istočasno pa se je potrebno tudi zavedati, da bi moral pripravek delovati takoj po vstavitvi v panj, kamor bi ga po predvidevanjih morali vstaviti vsaj dvakrat zapored v razmiku 1 tedna. Iz tega zornega kota bi morala biti učinkovitost dosežena hitro po vstavitvi in dejstvo, da po 3 dneh pride do signifikantnega padca beta-kislin ne bi smelo biti ovira pri uporabi.

DS3: Nabor primernih sort hmelja, gojenih v Sloveniji, za uporabo v odvisnosti od aktivnih snovi

DS3.1 in DS3.2 Določanje količine alfa- in beta-kislin ter količine eteričnega olja v vzorcih hmelja

V projektu smo se osredotočili na vsebnosti beta-kislin v različnih genotipih hmelja iz kolekcije žlahtniteljskega programa IHPS, z namenom ugotavljanja potencialno zanimivih za gojenje za namen pridelave beta-kislin, katerih potencialna uporaba se kaže v uporabi pripravkov za zatiranje varože pri čebelah. V ta namen smo v času tehnološke zrelosti izbrali 53 vzorcev in v njih določili alfa- in beta-kislino ter vsebnost eteričnega olja. Med genotipi smo odkrili pet takšnih, kjer je bila vsebnost beta-kislin več kot 6 %. Vsebnosti alfa-kislin pri teh genotipih niso dosegale visokih vrednosti.

ZAKLJUČEK DS3.1 – 3.2

Z vidika pridelave hmelja z namenom pridobivanja beta-kislin in s tem diverzifikacije uporabe hmelja tudi v druge panoge kot je pivovarska, je smiselno poiskati primerne genotipe, ki bi bili najustreznejši. V opisani raziskavi smo ugotovili, da je v kolekciji IHPS kar nekaj potencialnih kandidatov, ki bi lahko bili primerni, kot so 108/57, 74/142, 236/149. Analiza je pokazala veliko heterogenost izbranih križancev hmelja, saj so njihove vrednosti določenih parametrov v velikem razponu med minimalno in maksimalno določeno vrednostjo.

DS3.3 Določanje količine alfa- in beta-kislin in vsebine ter sestave eteričnega olja v ekstraktih hmelja

Na tržišču smo uspeli pridobiti 9 različnih ekstraktov hmelja. Od tega pet najpogostejših na tržišču, pridobljenih z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂, enega pridobljenega z etanolno ekstrakcijo in še nadaljnje tri, ki so prečiščene variante CO₂ ekstraktov. Dvema izmed njih so odvzete alfa-kislino in sta obogatena z beta-kislinami, enemu pa so odvzete beta-kislino in je obogaten z alfa-kislinami.

Vsem vzorcem smo s standardizirano analizo metodologijo s HPLC določili vsebnost posameznih in skupnih alfa- in beta-kislin ter razmerij med njimi. V nadaljevanju smo v ekstraktih določili tudi vsebnost eteričnega olja.

Iz primerjave rezultatov lahko razberemo, da klasični ekstrakti, pridobljeni s CO₂, različnih proizvajalcev vsebujejo primerljive količine beta-kislin okoli 25%. V deležu beta-kislin je odstopal etanolni ekstrakt hmelja, ki je imel med klasičnimi ekstrakti najmanjšo vsebnost beta-kislin. Za naš namen, kjer želimo najti ekstrakt s čim višjo vsebnostjo beta-kislin, se je kot popolnoma neprimeren pokazal vzorec α-ekstrakta, ki je vseboval beta-kislino samo v sledovih pod 0,5%.

ZAKLJUČEK DS3.3

Optimalen ekstrakt za naš namen se je pokazal ekstrakt hmelja, ki je vseboval 38,9% BHK. Pri njemu so bile tudi alfa-kislino in eterično olje vsebovano samo v sledovih. Takšen ekstrakt nam je služil tudi kot izhodna snov za pripravo razredčenih vzorcev za testiranja v drugih delovnih sklopih.

DS4: Proučitev možnosti izdelovanja pripravkov na osnovi hmelja v Sloveniji

V času izvajanja projekta smo uspeli navezati stike s podjetjem Škrlj d.o.o., ki ima v lasti opremo za ekstrakcijo rastlinskih tkiv s superkritičnim CO₂. V svojem obratu so tudi že poskusno izvedli ekstrakcijo dveh različnih hmeljnih sort, pod različnimi pogoji ekstrakcije (tlak, temperatura), ki bistveno vplivajo na fizikalne lastnosti topila. Na ta način smo pridobili po sestavi različne ekstrakte, ki smo jih kemijsko okarakterizirali.

Zaključek DS4

Iz podatkov lahko razberemo, da je sestava ekstraktov zelo različna, glede na ekstrakcijske pogoje, kar smo pričakovali. Oprema v podjetju Škrlj d.o.o. je tako fleksibilna, da omogoča pridobivanje različnih ekstraktov, v odvisnosti od zasnove tehnološkega postopka. Njihova kapaciteta je dovolj velika, da bi lahko zadostila pridobivanju ekstrakta za slovenske razmere in bi lahko imeli zaprt krog od surovine do končnega izdelka v Sloveniji. Obstaja tudi možnost povezave s podjetjema Steiner ali Barth Hass v Nemčiji, saj je pri njih predelava hmelja v ekstrakte že rutinsko vpeljana.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

V skladu s predvidenim časovnim razporedom izvajanja posameznih delovnih sklopov v zaključenem projektu, ocenjujemo, da je bil program v celoti realiziran. V sklopu dela na projektu smo:

- naredili smo primerjavo med aplikacijami in učinkovitostmi na tržišču dostopnih pripravkov za ekološko zatiranje varoje in na osnovi tega pripravili strokovno monografijo za čebelarje v tiskani obliki,
- izvedli smo teste toksičnosti hmeljevih ekstraktov pri varoji v laboratorijskih pogojih,
- izvedli smo teste toksičnosti hmeljevih ekstraktov za čebele v laboratorijskih pogojih,
- izvedli smo teste toksičnosti hmeljevih ekstraktov pri čebelah napadenih z varojo v laboratorijskih pogojih,
- izvedli smo teste oralne toksičnosti hmeljevih ekstraktov za čebelo v laboratorijskih pogojih,
- proučili smo vpliv hmeljevih ekstraktov na čistilno vedenje čebel v laboratorijskih pogojih,
- izvedli smo pilotni poskus delovanja hmeljevih ekstraktov z izvedbo testiranja na družinah v naravi v treh zaporednih letih,
- izvedli smo teste obstojnosti preparatov v laboratorijskih pogojih,
- izbranim genotipom hmelja iz kolekcijskega nasada IHPS smo določili vsebnosti alfa- in beta-kislin ter količino in sestavo eteričnega olja hmelja v dveh zaporedni rastni sezoni in na ta način določili potencialno primerne za gojenje za pridelavo beta-kislin,
- določili smo količine alfa- in beta-kislin in vsebnost ter sestavo eteričnega olja v ekstraktih hmelja dostopnih na tržišču,
- vzpostavili smo povezavo s potencialnim proizvajalcem hmeljnih ekstraktov s superkritičnim CO₂ in izvedli preliminarne poskuse pridobivanja ekstraktov in njihovo kemijsko karakterizacijo,
- poskrbeli smo za diseminacijo naših rezultatov zainteresirani javnosti čebelarske in hmeljarske stroke s strokovnimi prispevki kakor tudi z objavami v obliki izvirnih znanstvenih člankov.

Glede na vsebinski in terminski plan dela na projektu smo v realizirali vse postavljene cilje. V času izvajanja projekta smo izvedli vse načrtovane poskuse in testiranja iz programa dela in v obliki pisnih ali ustnih podajanj naših rezultatov izpolnili ves program diseminacije rezultatov.

6. Spremembe programa dela raziskovalnega projekta oziroma spremembe sestave projektne skupine⁴

Ni bilo sprememb.

7. Najpomembnejši dosežki projektne skupine na raziskovalnem področju⁵

Dosežek			
1.	COBISS ID	5582952	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Potencialni pozitivni učinki hmeljnih beta-kislin na parazitsko pršico Varroa destructor v čebeljih družinah
		ANG	Potential positive effects of hop beta acids on parasitic mite Varroa destructor control in honey bee colonies
	Opis	SLO	V članku smo predstavili rezultate strupenosti HBA na preskusih čebel v različnih koncentracijah in vpliva na obnašanje čebel delavk. Za namene študije so bili opravljeni toksikološki testi na čebelah v kletkah. HBA različnih koncentracij smo testirali per os in topikalno, naneseemo tudi neposredno na prsnico čebele. Čistilni plesi so bili video dokumentirani pred, vmes in po vstavitvi celuloznega nosilca, ki vsebuje HBA. Naši rezultati kažejo, da mehanizem delovanja HBA morda ni prek heolimfe, ki jo zaužije pršica, ampak je lahko strupen ob stiku z varojo ali pa čebele spodbudi k izvajanju plesa, ki je eden od uspešnih mehanizmov za odstranjevanje pršic v čebeljih družinah.
		ANG	In the article we presented the results of HBA toxicity on honey bees tests in different concentrations and whether they have any influence on the grooming behavior of worker bees. For the purpose of the study toxicological tests were made on caged bees. HBA of different concentrations were tested per os and topically, application of 0.5 µl of each di-rectly on the thorax of a bee. The allogrooming dances were video-documented before, in-between, and after the insertion of cellulose carrier containing HBA, and mite fall during the experiments was counted in parallel. Our results suggest that the mechanism of HBA action may not be through the haemolymph ingested by a mite but may be either contact-toxic to Varroa or may stimulate bees into performing allogrooming which is one of the successful mechanisms of Varroa mite resistance in bee colonies.
	Objavljeno v	Consulting and Training Center Key; Journal of hygienic engineering and design; 2018; Vol. 24; str. 21-28; Avtorji / Authors: Moškrič Ajda, Bubnič Jernej, Smodiš Škerl Maja Ivana, Prešern Janez	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
2.	COBISS ID	760204	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Primerjava različnih genotipov hmelja glede na vsebnost beta-kislin
		ANG	Comparison of different hop genotypes with respect to beta-acids content
	Opis	SLO	V pričujoči raziskavi smo se osredotočili na vsebnosti beta-kislin v različnih genotipih hmelja iz kolekcije žlahtniteljskega programa IHPS, z namenom ugotavljanja potencialno zanimivih za gojenje za namen pridelave beta-kislin, katerih potencialna uporaba se kaže v uporabi pripravkov za zatiranje varoje pri čebelah. V ta namen smo v času tehnološke zrelosti izbrali 31 vzorcev in v njih določili alfa- in beta-kislino ter vsebnosti eteričnega olja. Med genotipi smo odkrili pet takšnih, kjer je bila vsebnost beta-kislin več kot 6 %. Vsebnosti alfa-kislin pri teh genotipih niso dosegale visokih vrednosti in je bilo zato tudi razmerje alfa/beta relativno nizko.
		ANG	In this study, we focused on the content of beta-acids in various hop genotypes from the SIHRB breeding program, with the aim to identify potentially interesting cultivars for producing beta-acids which are recently showing potential use for varroa suppression on bees. We selected 31 hop genotypes during the technological maturity and determined alpha- and beta-acids, as well as the content of essential oil. Among the genotypes we found five breeding lines where beta-acids content was over 6%. The alpha-acids content of these genotypes did not reach high values and therefore the alpha/beta ratio was relatively low.

	Dosežek		
	Objavljeno v	Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo; Hmeljarski bilten; 2018; 25; str. 26-35; Avtorji / Authors: Košir Iztok Jože, Čerenak Andreja, Ocvirk Miha	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	22103062	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Hmeljne spojine: tehnike ekstrakcije, kemične analize, antioksidativni, protimikrobni in antikarcinogeni učinki
		ANG	Hop compounds: extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects
	Opis	SLO	V članku smo predstavili hmeljne naravne spojine in pregled metod za njihovo izolacijo, kemijsko analizo ter za določanje njihovih antioksidativnih, protimikrobnih in antigenotoksičnih potencialov. Ta prispevek ponuja pregled tehnik ekstrakcije in frakcioniranja najpomembnejših spojin hmelja, ki so znane po svojih lastnostih, ki spodbujajo zdravje. Čeprav je hmelj še vedno glavna sestavina za zagotavljanje okusa, stabilnosti in protimikrobne zaščite piva, so našli tudi uporabo v farmacevtski in drugi prehrambeni industriji. Ta pregled se osredotoča na številne učinke hmelja na zdravje, ki segajo od antioksidativnih, pomirjevalnih in protivnetnih potencialov, prek antikancerogenih lastnosti do estrogenega in repelentnega delovanja.
		ANG	In this paper, we present hop natural compounds and an overview of methods for their isolation, chemical analysis and for the determination of their antioxidant, antimicrobial and antigenotoxic potentials. This paper provides an overview of extraction and fractionation techniques of the most important hop compounds, which are known for their health-promoting properties. Although hops are still the main ingredient to ensure the taste, stability and antimicrobial protection of beer, they have also found use in the pharmaceutical and other food industries. This review focuses on a number of health effects of hops, ranging from antioxidant, sedative and anti-inflammatory potentials, through anticancer properties to estrogenic and repellent action.
	Objavljeno v	MDPI; Nutrients; 2019; Vol. 11, iss. 2; str. 1-37; Impact Factor: 4.171; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.987; A1: 1; WoS: SA; Avtorji / Authors: Knez Hrnčič Maša, Španinger Eva, Košir Iztok Jože, Knez Željko, Bren Urban	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

8. Najpomembnejši dosežek projektne skupine na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti⁶

	Dosežek		
1.	COBISS ID	763276	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Uporaba hmeljevih proizvodov za zatiranje varoje v čebelarstvu
		ANG	Use of hop products to control varroa in beekeeping
	Opis	SLO	V strokovnem prispevku smo zainteresirani hmeljarsko pridelovalni javnosti predstavili delo na projektu in zaključke. Osredotočili smo se predvsem na prikaz delovanja pripravkov na osnovi hmelja. Prikazali smo tudi možnosti gojenja hmelja z namenom pridelave hmeljnih beta-kislin in s tem možnosti diverzifikacije prodaje hmelja izven tradicionalne pivovarske panoge.
		ANG	In an expert article, we presented the work on the project and the conclusions to the interested hop-growing public. We focused mainly on demonstrating the action of hop-based preparations. We also presented the possibilities of growing hops with the aim of producing hop beta-acids and thus the possibility of diversifying the sale of hops outside the

	Dosežek		
			traditional brewing industry.
	Šifra	F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Objavljeno v	Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo; Hmeljar; 2018; Letn. 80, št. 1-12; str. 42; Avtorji / Authors: Košir Iztok Jože	
	Tipologija	1.04 Strokovni članek	
2.	COBISS ID	1024461903	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Raziskava o učinkovitosti hmeljevih pripravkov za ekološko zatiranje varoj
		ANG	Research on the effectiveness of hop preparations for the ecological control of varroa
	Opis	SLO	V prispevku v strokovnem glasilu Čebelarstva Slovenije smo predstavili rezultate projekta in opis postopkov s katerimi smo ugotavljali ali bi bila uporaba hmeljnih pripravkov priporočljiva za zatiranje varoj v čebeljih družinah. Predstavitev je bila namenjena čebelarji zainteresirani javnosti.
		ANG	In the article in the professional journal of the Beekeepers' Association of Slovenia, we presented the results of the project and a description of the procedures used to determine whether the use of hop preparations would be recommended for the control of varroa in bee families. The presentation was intended for the beekeeping interested public.
	Šifra	F.17 Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Objavljeno v	Zveza čebelarstev Slovenije; Slovenski čebelar; 2018; Letn. 120, št. 7/8; str. 215-216; Avtorji / Authors: Kozmus Peter	
	Tipologija	1.04 Strokovni članek	
3.	COBISS ID	5482344	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Novi mejniki pri nadzoru varoje - ali so HBK učinkovite proti varoji?
		ANG	New frontiers in varroa control - are HBAs an effective treatment against varroosis?
	Opis	SLO	Na konferenci smo predstavili poskuse praktičnega testiranja hmeljevih beta kislin (HBK). Izvedli smo teste toksičnosti na čebele in varoje ter vpliv HBK na čistilno vedenje čebel. S pilotskim poskusom na čebeljih družinah smo upoštevali okoljske faktorje, ki bi dodatno vplivali na stanje družin. V nadaljevanju smo predstavili cilje raziskave.
		ANG	We presented our experiments on practical testing of hops extracts (HBA) in the form of toxicity tests on varroa infested bees and the effects of hop extracts on the cleaning behaviour of bees. A pilot trial on colonies was carried out taking into account the environmental factors that may affect the condition of the colony. Moreover, we described the goals of our research.
	Šifra	F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Objavljeno v	Bee Research Association; Bee world; 2018; Vol. 95, No. 1; str. 30; Avtorji / Authors: Smodiš Škerl Maja Ivana, Bubnič Jernej, Jenčič Vlasta, Kandolf Borovšak Andreja, Košir Iztok Jože, Kozmus Peter, Ocvirk Miha, Pislak Metka, Prešern Janez, Srčič Stanko	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
4.	COBISS ID	5540712	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Potencialni pozitivni učinki hmeljnih beta-kislin na kontrolo parazitske pršice Varroa destructor v čebeljih družinah

	Dosežek	
	ANG	Potential positive effects of hop beta acids on parasitic mite Varroa destructor control in honey bee colonies
Opis	SLO	V prispevku opisujemo preskus večih možnih načinov delovanja hmeljevih beta kislin. Naši rezultati niso pokazali možnosti sistemskega delovanja (t. j. preko hemolimfe in tkiv, s katerimi se varoje hranijo med parazitiranjem na gostitelju). Bolj verjetno je kontaktno delovanje in/ali spodbujanje čebel k bolj intenzivnemu medsebojnemu čiščenju.
	ANG	Our work suggests that mechanism of HBA action may not be through the haemolymph and tissues ingested by a mite but may be either contact-toxic to Varroa or may stimulate bees into performing allogrooming which is one of the successful mechanisms of Varroa mite resistance in bee colonies. This preliminary study is a stepping stone for further research on toxicity, suitable concentrations and applications of HBA as natural alternatives of suppression of Varroa in the future.
Šifra	F.02 Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
Objavljeno v	Consulting and training center - Key; Book of abstracts; 2018; Str. 52-53; Avtorji / Authors: Moškrič Ajda, Bubnič Jernej, Smodiš Škerl Maja Ivana, Prešern Janez	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
5.	COBISS ID	4798074 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Uporaba hmeljnih kislin za ekološko zatiranje varoj
	ANG	Use of hop acids for organic varroa control
Opis	SLO	V laboratoriju smo ugotavljali toksičnost hmeljnih kislin na čebele (Apis mellifera) in njihov učinek na smrtnost varoj (Varroa destructor). Raztopine alfa- in beta-kislin v koncentracijah 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10% in razredčilo hmeljnih kislin smo testirali na čebelah in varojah posamič ter skupaj. Ugotovili smo, da je pri vseh koncentracijah smrtnost varoj med 90 in 100%, pri višjih koncentracijah pa je visoka tudi smrtnost čebel.
	ANG	In the laboratory, the toxicity of hop acids to honeybees (Apis mellifera) and their effect on varroa (Varroa destructor) mortality were determined. Alpha- and beta-acid solutions in concentrations of 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10% and the diluent of hop acids were tested on bees and varroa mites individually and together. It was found that at all concentrations the mortality of varroa mites is between 90 and 100%, however at higher concentrations the mortality of bees is high as well.
Šifra	F.02 Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
Objavljeno v	Veterinarska fakulteta; [7th Slovenian Veterinary Congress; Slovenian veterinary research; 2019; Str. 105; Impact Factor: 0.170; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.130; WoS: ZC; Avtorji / Authors: Jenčič Vlasta, Pislak Metka, Žvokelj Lucija, Vreček Šulgaj Jerica, Bubnič Jernej, Smodiš Škerl Maja Ivana, Kozmos Peter, Ocvirk Miha, Prešern Janez, Košir Iztok Jože	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

Kot je bilo omenjeno že v zgornji točki 4 "Poročilo o realizaciji predloženega programa dela oz. ciljev raziskovalnega projekta", smo v okviru delovnega sklopa 1, pripravili strokovno monografijo s pregledom vseh dostopnih pripravkov za zatiranje varoje, načini njihovega delovanja in aplikacijskimi tehnikami. Namenjena je čebelarjem pri njihovem vsakodnevem delu na področju zatiranja varoje. Monografija je v fazi tehničnega/tiskarskega urejanja, vsebinsko pa že pripravljena za izdajo. Izšla bo v nakladi 1000 izvodov. Ker monografija še ni izšla, posledično še ni vpisana v sistem COBISS in jo zato podajamo na tem mestu.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Zaradi popularnosti in pomena čebelarstva v prehrani je nujen stalen razvoj učinkovin, ki so sprejemljiva za stroko tako s stališča učinkovitosti kot enostavnosti pri ravnanju z njimi. Pripravki na osnovi hmeljnih beta-kislin zadostijo obema pogoju. Istočasno ti pripravki spadajo v skupino ekoloških/naravnih sredstev za zatiranje varoje, s čimer sledimo trendom uporabe takšnih pripravkov v čebelarstvu.

Raziskava je bila izrazito aplikativno usmerjena in je že v času trajanja projekta z rezultati pomagala uporabnikom, to je čebelarjem in hmeljarjem. Rezultati so direktno uporabni in prenosljivi v prakso. Hmeljarski panogi nudi možnost novih uporab hmelja izven tradicionalne pivovarske industrije. To pomeni diverzifikacijo prodaje in s tem zmanjšanje poslovnega tveganja ob prisotnosti prevelike ponudbe na mednarodnem trgu hmelja.

Čebelarska panoga, ki predstavlja zelo pomembno gospodarsko dejavnost v polju kmetijskega sektorja, je preko rezultatov dobila informacije o možnosti uporabe novih pripravkov na osnovi hmelja, ki do zdaj pri nas še niso bili uporabljeni.

V sklopu projekta smo preučili kandidate za mehanizme delovanja hmeljnih beta-kislin in njihovo bazično biologijo. Ti rezultati predstavljajo pomemben doprinos znanosti tega področja. Z vključevanjem končnih uporabnikov in deležnikov v določene faze projekta, smo dosegli večjo uporabnost ter takojšnje preverjanje projektnih rezultatov.

Izvajalci projekta smo predstavili svoje rezultate dela tudi na javnih predstavitev in v obliki pisnih prispevkov v strokovnih in znanstvenih revijah.

ANG

Due to the popularity and importance of beekeeping in the diet it is necessary continuous development of active substances which are acceptable to the profession in terms of efficiency and ease of handling. Preparations of hop beta-acids satisfy both two conditions. At the same time, these preparations belonging to the group of organic/natural remedies to control varroa, which follow trends in the use of such products in beekeeping.

The research was highly applicable and helped users, ie beekeepers and hop growers, with the results during the project. The results are directly useful and transferable to practice. It offers the hop industry the possibility of new uses of hops outside the traditional brewing industry. This means diversifying sales and thus reducing business risk in the presence of oversupply in the international hop market.

The beekeeping industry, which represents a very important economic activity in the field of the agricultural sector, received information on the possibility of using new preparations based on hops, which have not been used in Slovenia so far.

As part of the project, we examined candidates for the mechanisms of action of hop beta-acids and their basic biology. These results represent an important contribution of science in this field. By involving end users and stakeholders in certain phases of the project, we achieved greater usability and immediate verification of project results.

The contractors of the project also presented their work results in public presentations and in the form of written articles in professional and scientific journals.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Raziskava je bila izrazito aplikativno usmerjena in je že v času trajanja projekta z rezultati pomagala uporabnikom, to je čebelarjem in hmeljarjem. Rezultati so direktno uporabni in prenosljivi v prakso. Hmeljarski panogi je ponudila možnost novih uporab hmelja izven tradicionalne pivovarske industrije. To pomeni diverzifikacijo prodaje in s tem zmanjšanje poslovnega tveganja ob prisotnosti prevelike ponudbe na mednarodnem trgu hmelja. Rezultati bodo lahko uporabljeni za promocijo slovenskega hmeljarstva, zlasti zaradi dejstva, ker se več kot 95 % slovenskega hmelja prodaja izven Slovenije.

Čebelarska panoga, ki predstavlja zelo pomembno gospodarsko dejavnost v polju kmetijskega sektorja, je preko rezultatov dobila spoznanja o možnosti uporabe novih pripravkov na osnovi hmelja, ki do zdaj pri nas še niso bili uporabljeni.

Zahteve potrošnikov o pomembnosti zdrave in varne hrane in skrb proizvajalcev za varno in sonaravno pridelavo vodi v trende uporabe zaščitnih sredstev naravnega izvora. Rezultat

predlaganega projekta so nova znanja o uporabnosti in načinu uporabe pripravkov na osnovi beta-kislin hmeljnega izvora. Posebnega pomena je dejstvo, da so to snovi, ki so naravno prisotne v naravi in zato ne predstavljajo tveganja za človeka, kakor tudi ne med in drugo čebelji proizvodi.

Z iskanjem možnosti povezav med različnimi deležniki (hmeljarji, podjetji za predelavo rastlinskih materialov in podjetji, ki imajo znanje in kapacitete za proizvodnjo farmacevtskih sredstev) smo razvili možnosti za razvoj povsem novih produktov, ki jih v Sloveniji še nimamo.

Projekt je vplival na prenos znanja med raziskovalnimi institucijami in podjetji v Sloveniji.

Rezultate projekta bodo lahko kmetijske družbe uporabile za nadgradnjo svojega znanja, kar bo dvignilo kakovost njihovih storitev.

Pri izvajanju projekta sta kot opazovalca sodelovala tudi dva mlada raziskovalca, ki sta na ta način pridobila izkušnje in dodatna znanja za lažje vstopanje na trg dela po zaključenem izobraževanju.

ANG

The study was highly application-oriented and helped users, that are beekeepers and hopgrowers with the project results already during the duration of it. The results are directly applicable and transferable into practice. It offers the possibility to hopgrowing branch of new uses for hops outside the traditional brewing industry. That means diversification of sales, thereby reducing the financial risk in the presence of oversupply in the international hop market. The results of the proposed project could be directly used to promote Slovenian hopgrowing, particularly due to the fact that more than 95% of Slovenian hops is sold outside of Slovenia.

Beekeeping branch, which represents a very important economic activity in the field of the agricultural sector has got the opportunity to use new products on the basis of hops, which until now have not been used yet.

The requirements of consumers about the importance of healthy and safe food and concern of producers for safe and sustainable production lead to trends in the use of protective agents of natural origin. The result of the proposed project is a new knowledge about usability and way of application of the products based on beta-acids of hop origin. Of special importance is the fact that they are substances that are naturally present in nature and therefore do not represent a risk to humans as well as honey and other bee products. By searching the possibilities of links between the various stakeholders (hop, enterprises for processing of plant materials and companies that have the expertise and capacity to manufacture pharmaceutical products), we showed opportunities to develop new products, which are not present in Slovenia yet.

The project resulted in the transfer of knowledge between research institutions and enterprises in Slovenia. The results of the project will be used by agricultural companies to upgrade their skills, which will increase the quality of their services.

In addition, in the project also two young researchers participated as observers, which acquired experience and additional skills to ease their entry into the labor market after completing education.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

☒ v domačih znanstvenih krogih

☒ pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹¹

- Zveza hmeljarjev Slovenije; slovenski hmeljarji
- Čebelarska društva v Sloveniji, slovenski čebelarji
- profesionalni čebelarji
- Hmezad export-import d.d., Žalec
- Škrli d.o.o., Batuje

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ v mednarodnih znanstvenih krogih
☐ pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:¹²

Pri izvajanju projekta ni bilo predvideno in tudi nismo sodelovali s tujimi raziskovalnimi inštitucijami. Smo pa sodelovali s podjetjem Steiner GmbH iz Mainburga v Nemčiji, ki nam je tudi priskrbelo material s katerim smo lahko izvajali del naših aktivnosti na projektu.

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹³

Podpora podjetja Steiner GmbH iz Mainburga, Nemčija pri zagotavljanju materiala, ki je bil osnova za izvedbo nekaterih delov projekta.

12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	

	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☒ DA ☐ NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☒ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar**13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja**

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☒	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☒	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☒	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☒	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☒	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☒	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☒	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☒	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☒	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☒	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☒	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☒	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☒	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☒	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☒	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☒	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☒	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☒	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☒	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☒	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☒	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☒	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	☐	☐	☒	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	☒	☐	☐	☐	

G.07.02.	Prometna infrastruktura					
G.07.03.	Energetska infrastruktura					
G.07.04.	Drugo:					
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva					
G.09.	Drugo:					

Komentar

G.02 Gospodarski razvoj

G.02.01. Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu

G.02.02. Širitev obstoječih trgov

G.02.05. Razširitev področja dejavnosti

V sklopu izvedenega projekta smo raziskovali na področju uporabnosti hmeljnih beta-kislin na področju čebelarstva. Na ta način smo hmeljarski panogi, ki je praktično v celoti odvisna od pivovarske industrije, ponudili možnosti gojenja hmelja tudi za pridobivanje beta-kislin in njihovo nadaljnjo uporabo v drugih sektorji. Na ta način je omogočen razvoj novih produktov in s tem širitev njihove gospodarske dejavnosti na novih trgih.

G.06.Varovanje okolja in trajnostni razvoj

V sklopu projekta smo raziskovali možnosti razvoja in uporabe pripravkov za zatiranje varoje pri čebelah na osnovi hmeljnih beta-kislin, ki so naravnega izvora in tudi s strani EMME klasificirani z MRL, ki ni potreben. Zaradi tega ti produkti predstavljajo povsem varno in ekološko alternativo pri uporabi v čebelarstvu. Njihova uporaba je tako pomembna s stališča varovanja okolja in trajnostnega razvoja saj ne predstavlja škodljivega vnosa tujih spojin v okolje.

14.Naslov spletne strani za projekte, odobrene na podlagi Javnih razpisov za sofinanciranje ciljnih raziskovalnih projektov za leta 2016, 2017, 2018 in 2019¹⁴

<http://www.ihips.si/kemijske-analize-in-pivovarstvo/uporaba-hmeljnih-pripravkov-za-ekolosko-zatiranje-varoje-varroa-destructor-v4-1605/>

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni;
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS;
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki (v primeru, da poročilo ne bo oddano z digitalnima podpisoma);
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta;
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Inštitut za hmeljarstvo in
pivovarstvo Slovenije

Iztok Jože Košir

ŽIG

Datum: 19.5.2020

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2020/13

- ¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)
- ² Navedite cilje iz prijave projekta in napišite, ali so bili cilji projekta doseženi. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- ³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- ⁴ Navedite morebitna bistvena odstopanja in spremembe od predvidenega programa dela raziskovalnega projekta, zapisanega v prijavi raziskovalnega projekta. Navedite in utemeljite tudi spremembe sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta. Če sprememb ni bilo, navedite »Ni bilo sprememb«. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)
- ⁵ Navedite dosežke na raziskovalnem področju, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FORD področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)
- ⁶ Navedite dosežke na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti, ki so nastali v okviru tega projekta. Dosežke iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FORD področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.
- Dosežek na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti je po svoji strukturi drugačen kot dosežek na raziskovalnem področju. Povzetek dosežka na raziskovalnem področju je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.
- Povzetek dosežka na področju gospodarstva, družbenih in kulturnih dejavnosti praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)
- ⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. v sistemu COBISS rezultat ni evidentiran). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)
- ⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- ¹⁴ Izvajalec mora za projekte, odobrene na podlagi Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2016« v letu 2016, Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2017« v letu 2017 in Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2019« v letu 2019 ter Javnega razpisa za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2016 in Ciljnega raziskovalnega programa »Zagotovimo.si hrano za jutri« v letu 2018, na spletnem mestu svoje RO odpreti posebno spletno stran, ki je namenjena projektu. Obvezne vsebine spletne strani so: vsebinski opis projekta z osnovnimi podatki glede financiranja, sestava projektne skupine s povezavami na SICRIS, faze projekta in njihova realizacija, bibliografske reference, ki izhajajo neposredno iz izvajanja projekta ter logotip ARRS in drugih sofinancerjev. Spletna stran mora ostati aktivna še 5 let po zaključku projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2020 v1.00

99-2E-63-06-A2-41-79-B6-9A-70-94-A7-A6-6E-32-0C-CC-31-02-C4

Priloga 1

Vsebinsko raziskovalno poročilo o delu in rezultatih na ciljnem raziskovalnem projektu V4-1605, »Uporaba hmeljnih pripravkov za ekološko zatiranje varoje (*Varroa destructor*)«

Vsebina

1. a Povzetek	2
1. b Abstract	3
2. Opis problema in ciljev	5
DS1: Pridobitev podatkov o sestavi in načinu aplikacij pripravkov za zatiranje varoje.....	5
DS2: Izvedba praktičnih preskušanj pripravkov na osnovi hmelja v različnih časovnih okvirih in na različno prizadetih čebeljih družinah	5
DS3: Nabor primernih sort hmelja, gojenih v Sloveniji, za uporabo v odvisnosti od aktivnih snovi ...	6
DS4: Proučitev možnosti izdelovanja pripravkov na osnovi hmelja v Sloveniji.....	6
3. Povzetek ključnih ugotovitev iz literature	7
4. Uporabljene metode dela, rezultati in razprava z zaključki	8
DS1: Pridobitev podatkov o sestavi in načinu aplikacij pripravkov za zatiranje varoje.....	9
DS2: Izvedba praktičnih preskušanj pripravkov na osnovi hmelja v različnih časovnih okvirih in na različno prizadetih čebeljih družinah	11
DS2.1 - DS2.3 Ugotavljanje vpliva hmeljnih kislin na smrtnost varoj (<i>Varroa destructor</i>) in toksičnosti za čebele (<i>Apis mellifera carnica</i>) v laboratoriju	11
DS2.4 Test »oralne« toksičnosti hmeljevih ekstraktov za čebelo	20
DS2.5 Vpliv hmeljevih ekstraktov na čistilno vedenje čebel	24
DS2.6 Pilotni poskus delovanja z izvedbo testiranja na družinah	27
DS2.7 Izdelava prototipa farmacevtskega pripravka na osnovi ekstrakta beta-kislin in ocena vpliva staranja na stabilnost.....	33
DS3: Nabor primernih sort hmelja, gojenih v Sloveniji, za uporabo v odvisnosti od aktivnih snovi .	35
DS3.1 in DS3.2 Določanje količine alfa- in beta-kislin ter količine eteričnega olja v vzorcih hmelja	35
DS3.3 Določanje količine alfa- in beta-kislin in vsebine ter sestave eteričnega olja v ekstraktih hmelja	37
DS4: Proučitev možnosti izdelovanja pripravkov na osnovi hmelja v Sloveniji.....	38
5. Bibliografija povezana z delom in rezultati projekta	39

1.a Povzetek

V času izvajanja projekta smo naredili pregled in popis na tržišču dostopnih pripravkov za zatiranje varoje. Pripravili smo popis različnih načinov aplikacije in primerjali učinkovitosti in mehanizme njihovega delovanja ter morebitnih negativnih lastnosti. V zaključni fazi je priprava elektronske oblike strokovne monografije, ki bo prosto dostopna na spletnih straneh sodelujočih institucij.

Učinek hmeljnih kislin na smrtnost varoj in njihovo toksičnost na varoje smo proučevali v laboratoriju Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Za poskuse smo vitalne varoje pridobivali v močno napadenih čebeljih družinah v različnih čebelnjakih po Sloveniji, čebele pa v inštitutskem čebelnjaku. Priredili smo komore s pitalnikom, v katere smo namestili čebele same ali pa čebele, na katere smo nanесли po eno varajo, varoje same pa smo namestili v petrijevke. Komore s čebelami ali/in petrijevke z varojami smo namestili v termostat s temperaturo 34° C in vlago 65 % in učinkovitost hmeljnih kislin ter toksičnost na čebele preverjali v nekaj urnih časovnih intervalih. Poleg hmeljnih kislin smo testirali tudi topilo propilen glikol, v katerem so bile raztopljene hmeljne kisline ter eterična olja v hmeljnih kislinah. Preskušali smo različne koncentracije hmeljnih kislin ter eteričnih olj in sicer: 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2% in 5%. V raziskavi smo ugotovili, da v laboratorijskih pogojih hmeljne kisline že v kratkem času pri nizkih koncentracijah učinkujejo na smrtnost varoj, način delovanja pa je nepoznan, saj smrtnost varoj povzročajo že sama eterična olja in topilo. Hmeljne kisline in topilo pa so toksični tudi za čebele, zlasti še pri daljšem delovanju. Na varoje pa delujejo že sama eterična olja ob manjši toksičnosti za čebele, kot jo imajo hmeljne kisline. Hmeljne kisline imajo potencial za razvoj zdravila za zatiranje varoj, čeprav je smrtnost varoj v laboratorijskih pogojih visoka in že pri nižjih koncentracijah doseže 10%. V nadaljnjih raziskavah bo treba proučiti načine za zmanjšanje tveganja za čebele in se morda posvetiti le eteričnim oljem v hmeljnih kislinah.

Hmeljne ekstrakte smo dodali v standardno krmilno mešanico vode in sladkorja. Podobno smo pripravili tudi kontrolno mešanico, ki je vsebovala le topilo hmeljnih kislin, propilen glikol. Mešanice smo dali čebelah »ad libitum« v prvem poskusu, »per os« v drugem poskusu; V tretjem poskusu smo mešanice aplicirali topikalno na toraks čebel. V vseh treh poskusih smo ugotavljali smrtnost, večjo od pričakovane. Histološki pregled črevesja je pokazal poškodovanost celičnih membran, zlasti v področju peritrofične membrane. Domnevamo, da mehanizem delovanja hmeljnih kislin (HBA) ni sistemski, saj bi glede na histološke poškodbe, opazili povečano smrtnost čebel.

Pripravili smo opazovalne panje, v katerih smo z videokamero spremljali čistilno vedenje čebel. Primerjali smo število čistilnih plesov čebelje družine v panjih, v katerega smo vstavili hmeljni ekstrakt, s čistilnim vedenjem družin brez ekstrakta. Po vstavitvi HBA smo opazili: 1) začetno averzijo čebel v družini, ki se je pokazala kot umik čebel iz bližne nosilca 2) povečano število čistilnih plesov, ki je verjetno prispeval k zabeleženemu povečanemu odpadu varoj.

Učinkovitost hmeljnega ekstrakta smo preskušali na čebeljih družinah. Za ta namen smo uporabili čebele na stojšču, ki so bile 500 m odmaknjene od ostalih čebelnjakov in na višini 500 m n. v. Preizkus smo izvajali v letih 2017 do 2019. V testu smo uporabili dva nosilca, celulozne trakove in vileda krpe ter koncentracije hmeljnega ekstrakta 16, 18 in 20 %. V poskus je bilo vključenih v prvem letu 30 čebeljih družin v naslednjih dveh pa po 24. Ugotovili smo, da so za nanos hmeljnega ekstrakta vileda krpe primernejše od celuloznih trakov. Celulozne trakove so čebele grizle in odstranjevale iz panjev. Vileda krpe so se izkazale kot obstojnejše. Glede učinkovitosti hmeljnega ekstrakta smo ugotovili, da 16 % kot tudi 18 in 20 % nimajo dovolj velike učinkovitost za zatiranje varoj, v pozno poletnem in jesenskem času. Učinkovitost je bila manjša od 25 %. Prednost hmeljnega ekstrakta pa je v tem, da se ne nalaga v medu in je zato mogoče z njim zatirati čebele tudi pred točenjem medu oz. v času čebelje paše.

Pri preskušanju stabilnosti razredčenih hmeljnih ekstraktov pri kontroliranih pogojih smo ugotovili, da vsebnost beta-kislin s časom zelo intenzivno pada. Že po 3 dneh njihova vsebnost pade za 65 %, po 6 dneh pa že za približno 88%. Po 10 dneh beta-kislin na nosilcih praktično ni več. Z ozirom na poznano

oksidacijsko nestabilnost beta-kislin, njihovo hitro padanje ob izpostavitvi kisiku pri povišani temperaturi ni presenečenje. Istočasno pa se je potrebno tudi zavedati, da bi moral pripravek delovati takoj po vstavitvi v panj, kamor bi ga tudi po predvidevanjih morali vstaviti vsaj dvakrat zapored v razmiku 1 tedna.

V projektu smo se osredotočili tudi na vsebnosti beta-kislin v različnih genotipih hmelja iz kolekcije žlahtniteljskega programa IHPS, z namenom ugotavljanja potencialno zanimivih za gojenje za namen pridelave beta-kislin, katerih potencialna uporaba se kaže v uporabi pripravkov za zatiranje varroje pri čebelah. V ta namen smo v času tehnološke zrelosti izbrali 31 vzorcev in v njih določili alfa- in beta-kislino ter vsebnosti eteričnega olja. Med genotipi smo odkrili pet takšnih, kjer je bila vsebnost beta-kislin več kot 6 %. Vsebnosti alfa-kislin pri teh genotipih niso dosegale visokih vrednosti in je bilo zato tudi razmerje alfa/beta relativno nizko.

V času izvajanja projekta smo uspeli navezati stike s podjetjem Škrli d.o.o., ki ima v lasti opremo za ekstrakcijo rastlinskih tkiv s superkritičnim CO₂. V svojem obratu so tudi že poskusno izvedli ekstrakcijo dveh različnih slovenskih standardnih hmeljnih sort (Celeia in Aurora), pod različnimi pogoji ekstrakcije (tlak, temperatura), ki bistveno vplivajo na fizikalne lastnosti topila. Na ta način smo pridobili po sestavi različne ekstrakte, ki smo jih kemijsko okarakterizirali.

Iz podatkov lahko razberemo, da je sestava ekstraktov zelo različna, glede na ekstrakcijske pogoje, kar smo sicer tudi pričakovali. Oprema v podjetju Škrli d.o.o. je tako fleksibilna, da omogoča pridobivanje različnih ekstraktov, v odvisnosti od zasnove tehnološkega postopka. Istočasno je njihova kapaciteta dovolj velika, da bi lahko zadostila pridobivanju ekstrakta za slovenske razmere, v kolikor bi se tudi v praksi pokazala takšna potreba. Na ta način bi lahko imeli poleg pridelave hmelja, njegovega peletiranja in kasneje tudi ekstrakcije, zaprt krog od surovine do končnega izdelka v slovenskem merilu. Poleg te možnosti obstaja seveda tudi možnost povezave s podjetjema v Nemčiji, ki tudi imata vso potrebno infrastrukturo, saj je pri njih predelava hmelja v ekstrakte že rutinsko vpeljana.

1.b Abstract

During the implementation of the project, we made a broad search and inventory of available preparations for suppression of varroa. We have compiled a list of different application modes and compared the effectiveness and mechanisms of their operation and possible negative characteristics. The final stage is the preparation of an electronic version of a monograph, which will be freely available on the websites of the participating institutions

In the laboratory of the Institute for Pathology, Wild Animals, Fish and Honeybees of the Veterinary Faculty University of Ljubljana hop acids effects on varroa mortality and honeybee toxicity was studied. For the experiments varroa was obtained in the severely infected honey bee colonies across Slovenia while bees were obtained in the Institute's apiary. Chambers with small containers for sugar syrup were prepared where bees alone or bees infested with varroa were kept during the trial, while varroa mites in the petri dishes were kept. Chambers with bees and/or petri dishes with varroa were placed in a thermostat with temperature of 34 °C and 65 % of humidity where the efficacy of the hops on varroa mortality and bee toxicity was checked at hourly intervals. In addition to the hop acids, in the experiments the solvent for hop acids propylene glycol, and essential oils in hop acids were tested. Following concentrations of hop acids and essential oils were tested: 0.1%, 0.2%, 0.5% 1%, 2% and 5%. In the study was found that, under laboratory conditions, hop acids in short time, at low concentrations, have an effect on the varroa mortality however the mode of their action is unknown, since the varroa mortality was caused also by the essential oils and the solvent itself. However, hop acids and the solvent were toxic also for the bees, especially after prolonged action. Interestingly the effect on varroa mortality showed the essential oils from hop acids alone with lower toxicity for the bees. To conclude, hop acids have the potential to develop a drug for varroa control, although the mortality of varroa is high in laboratory conditions and reaches 10% already at lower concentrations. Further

research on hop acids is needed to reduce the risk of bee mortality and may only be focused on the essential oils in hop acids.

Hops extracts were added to standard feeding syrup (sugar : water, 1: 1, w/w). Similarly, we prepared control syrup with propylen glycol. In the first experiment, the feeds syrups were available to bees »*ad libitum*« and in the second they were fed »*per os*«. In the third experiment we applied syrups topically on the bee's thorax. In all three experiments we recorded higher-than-normal mortality. Histological examination of the mid-gut showed cell damages especially in the area of peritrophic membrane. We exclude the possibility of systemic mode of action of HBA.

Observation hives were set up to monitor the hygienic behavior with focus on the grooming dances, which invite other hive mates to attend and groom the dances. We compared the number of grooming dances in hives with and without hops extracts. After the insertion of hops extract we noted 1) initial aversion of bees, which removed themselves away from the carrier and 2) increased number of grooming dances, which likely contributed to increased mite fall.

The efficacy of hop extracts was tested on honey bee families. For this purpose we used bees at a place 500 m away from other apiaries and at a height of 500 m. v. The test was performed from 2017 to 2019. Two holders were used in the test, cellulose strips and willow cloths, and concentrations of hop extracts 16, 18 and 20%. In the first year, 30 bee families were included in the experiment in the next two, after each of 24. We found that willow cloths were more suitable than cellulose strips. The cellulose strips the bees biting and removing from the hives. Willow cloths have proven to be more durable. Regarding the efficiency of hop extracts, we found that 16%, as well as 18% and 20%, did not have a sufficiently high efficiency to suppress the hedges in the late summer and autumn. The efficiency was less than 25%. The advantage of hop extracts is that it is not loaded in honey and therefore it is possible to treat the bees even before collecting honey or during flowering period.

In testing the stability of the diluted hop extracts under controlled conditions, we found that the beta-acid content decreased very intensely over time. After 3 days their content drops by 65% and after 6 days it drops by about 88%. After 10 days, the beta-acids on the carriers are practically gone. Given the known oxidation instability of beta-acids, their rapid decline upon exposure to oxygen at elevated temperature is no surprise. At the same time, it should also be borne in mind that the preparation should work immediately after insertion into the hive, which is also expected to be inserted at least twice in a row at intervals of 1 week.

In the project work, we focused also on the content of beta-acids in various hop genotypes from the SIHRB breeding program, with the aim to identify potentially interesting cultivars for producing beta-acids which are recently showing potential use for varroa suppression on bees. We selected 31 hop genotypes during the technological maturity and determined alpha- and beta-acids, as well as the content of essential oil. Among the genotypes we found five breeding lines where beta-acids content was over 6%. The alpha-acids content of these genotypes did not reach high values and therefore the alpha/beta ratio was relatively low.

During the implementation of the project, we managed to establish contact with the company Škrlj d.o.o., which owns equipment for the extraction of plant tissues with supercritical CO₂. At their plant, they have already experimentally extracted two different Slovenian standard hop varieties (Celeia and Aurora), under different extraction conditions (pressure, temperature), which significantly affect the physical properties of the solvent. In this way, various extracts were obtained which were chemically characterized. It can be seen from the data that the composition of the extracts is very different, depending on the extraction conditions, which we otherwise expected. Equipment in the company Škrlj d.o.o. is so flexible that it allows the production of various extracts, depending on the design of the technological process. At the same time, their capacity is large enough to satisfy the need to obtain an extract for the Slovenian needs, if such a need would prove to be practical. In this way, in addition to the production of hops, pelleting and later extraction, they could form a closed circle from the raw material to the final product on a Slovenian scale. In addition to this, there is, of course, the possibility

of connecting with companies in Germany, which also have all the necessary infrastructure, since they are already routinely introduced to the extraction of hops.

Celoten izvedeni ciljni raziskovalni projekt V4-1605 (CRP v nadaljevanju) je bil sestavljen iz štirih delovnih sklopov, označenih od DS1 do DS4, ki so sledili ciljem pri temi 1.2.2. javnega razpisa v letu 2016. Zaradi kompleksnosti in interdisciplinarnosti projekta, je bilo v projektno skupino vključenih več različnih strokovnjakov in inštitucij za posamezna področja.

2. Opis problema in ciljev

DS1: Pridobitev podatkov o sestavi in načinu aplikacij pripravkov za zatiranje varoje

V čebelarstvu je v zadnjih letih prisotna tendenca naraščajoče uporabe ekoloških pripravkov zatiranja varoje, torej takih, ki so sprejemljivi za čebeljo družino in zagotavljajo neoporečnost čebeljih pridelkov. Trenutno so prevladujoči tretmaji s preparati na osnovi mravljične in oksalne kisline, slednja je namenjena predvsem zimskemu zatiranju varoje, poznan pa je tudi preparat, ki kombinira oboje. Hkrati so poznani in za ekološko zatiranje priznani še pripravki na bazi rastlinskih ekstraktov, npr. thymovar. Problem uporabe pripravkov na bazi mravljične in oksalne kisline predstavlja predvsem njuna agresivnost do čebelje družine in pa toksičnost oksalne kisline. Toksičnost slednje je problematična za same čebele, hkrati pa kristali oksalne kisline poškodujejo dlačice in prizadenejo voh ter posledično učenje. Oksalna kislina je toksična tudi za človeka – potrebna je previdnost pri aplikaciji oksalne kisline v panju, saj je potrebno paziti, da ne zaide v med.

V literaturi obstaja veliko zapisov o uporabi ekoloških pripravkov za namen zatiranja varoje. Osnovne surovine za pripravke so različni naravni rastlinski materiali. Poleg rastlinskih materialov so tu še preparati na osnovi tehničnih kislin, kot npr. mravljična in oksalna kislina, kateri v večjih in/ali nepravilno apliciranih odmerkih lahko prizadenejo čebeljo družino. Preko študija ustrezne in dostopne literature smo želeli pripraviti pregled na tržišču dostopnih pripravkov za ekološko zatiranje varoje in ga v obliki strokovne zgibanke v elektronski obliki objaviti na spletnih straneh sodelujočih inštitucij.

DS2: Izvedba praktičnih preskušanj pripravkov na osnovi hmelja v različnih časovnih okvirih in na različno prizadetih čebeljih družinah

Delo v tem sklopu je bilo glede na različna podpodročja razdeljeno v 6 delovnih podsklopov označenih od DS2.1 do DS2.6.

V čebelarstvu so na svetu razširjene različne tehnologije čebelarjenja in s tem povezani panjski sistemi, ki so do določene mere povezani tudi s podvrsto medonosne čebele na določenem območju in pašnimi razmerami. Najbolj razširjen panjski sistem je LR in njegove različne izpeljanke, ki se razlikujejo predvsem v velikost plodiščnega in mediščnega okvira. Posledično je temu prilagojena tudi uporaba registrirana zdravila za zatiranje varoj. V Sloveniji imajo čebelarji čebelnjak, v njih pa so nameščeni AŽ panji, ki je v osnovi drugačen panjski sistem, saj omogoča oskrbo čebeljih družin z zadnje strani in ne z zgornje, kot pri LR panjskemu sistemu. Pomembna razlika je tudi v podnici, ki pri AŽ panjskem sistemu ne omogoča tolikšne prezračenosti kot LR. Posledično tudi uporaba in učinkovitost zdravil za zatiranje varoj ni enaka pri različnih panjskih sistemih. V tem sklopu smo zato želeli poskuse izpeljati v AŽ panju in na v Sloveniji zaščiteni kranjski čebeli (*Apis mellifera carnica*).

V tem delovnem sklopu smo izvedli vse potrebne faze za razvoj preparata. Z vrsto predkliničnih testov smo imeli namen določiti učinkovite koncentracije za varoje, sprejemljive koncentracije za čebele pri topikalni in oralni aplikaciji ter ugotoviti učinkovitost ekstraktov v čebeljih družinah.

Ugotavljali smo želeli učinkovitost preiskovanega ekstrakta na različno prizadetih čebeljih družinah in v različnih časovnih okvirih in na ta način preverili možnost uporabe pripravka tudi v času pridobivanja medu. S tem v zvezi smo opravili tudi senzorično analizo pridelanega medu.

DS3: Nabor primernih sort hmelja, gojenih v Sloveniji, za uporabo v odvisnosti od aktivnih snovi

Delo v tem sklopu je bilo glede na različna podpodročja razdeljeno v 3 delovne podsklope označene od DS3.1 do DS3.3.

Iz stališča uporabe hmelja v pivovarske namene, kjer se ga v svetovnem merilu uporabi približno 95 % so najpomembnejši sekundarni metaboliti eterična olja, ki dajejo pivu značilno hmeljno aromo in alfa-kisline, ki prispevajo bistveni del grenčice. To je glavni vzrok, da so vsi žlahtniteljski programi naravnani na vzgojo novih sort s primerno količino in sestavo prej omenjenih metabolitov. Slovenija je peta proizvajalka hmelja v svetovnem merilu in zaradi tega imamo na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenijo zelo dobro razvit žlahtniteljski program vzgoje novih sort hmelja. Kemijska karakterizacija novih kandidatnih križancev je bila v preteklosti usmerjena predvsem v analitiko določanja skupnih alfa-kislin z različnimi metodami in manj v podrobno analitiko slednjih. To je predvsem posledica dejstva, da so glavni cilji programa vzgoje novih sort prilagojeni potrebam in zahtevam pivovarske industrije. Sama sestava alfa-kislin je sicer pomemben parameter, vendar še vedno podrejen celokupni vsebnosti. Beta-kisline so bile v preteklosti zelo malo ali skoraj nič raziskane in zaradi tega nimamo željenih podatkov. V kolikor so se v procesu žlahtnjenja pojavili križanci, ki so imeli višje vsebnosti beta-kislin, to dejstvo ni predstavljalo posebne teže in so bili izločeni iz nadaljnje obravnave, v kolikor niso vsebovali tudi primerne količine alfa-kislin in eteričnega olja želene sestave ter ostalih zelenih lastnosti kot so habitus rastline in odpornost na bolezni. Posledica povedanega je, da imamo na IHPS v genski banki hmelja velik nabor uveljavljenih sort hmelja slovenskega in tujega porekla, kakor tudi novih križancev, ki so rezultat križanj. Med njimi obstajajo tudi takšni genotipi, ki po kriterijih pivovarske industrije niso zanimivi, vendar vsebujejo visoke količine beta-kislin, ki se lahko gibljejo od 1 do 10 % v suhi snovi in bi lahko bili pomemben naravni vir beta-kislin. V kolikor bi bili na osnovi sestave prepoznani kot primerni, bi lahko v bodoče predstavljali alternativo uporabe hmelja izključno za pivovarsko industrijo. Zaradi tega je bil cilj kemijsko okarakterizirati križance preko sestave alfa- in beta-kislin in vsebnosti eteričnega olja v hmeljnih storžkih izbranega rastlinskega materiala, s ciljem pripraviti nabor ustreznih genotipov, ki bi lahko bili primerni za gojenje za namen pridobivanja beta-kislin.

V praksi se približno polovica vsega pridelanega hmelja predela v ekstrakt, ki se pridobi z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂ ali z etanolom. Ekstrakcijski postopki so optimirani na maksimalen izkoristek ekstrakcije alfa-kislin in/ali eteričnih olj. Beta-kisline v ekstraktih so tako sekundarnega pomena in dostikrat v praksi njihova vsebnost in sestava niti nista določeni in poznani. Z ozirom na to, da za samo pivovarsko industrijo ne predstavljajo bistvenega kriterija in so istočasno prepoznane kot spojine naravnega izvora, ki nimajo znanih negativnih učinkov na človeški organizem njihove količine in sestave tudi iz zakonskega vidika ni potrebno spremljati v živilskih proizvodih. Obstojnost beta-kislin je omejena in pogojena predvsem z oksidacijskimi procesi ob prisotnosti zraka in termičnim razpadom pri povišanih temperaturah. Velikokrat je tako njihova vsebnost v dostopnih ekstraktih ali drugih proizvodih iz hmelja dosti manjša kot bi lahko pričakovali glede na izhodni material hmelj. Cilj tega delovnega sklopa je bila tako kemijska karakterizacija dostopnih ekstraktov hmelja glede vsebnosti alfa- in beta-kislin ter eteričnih olj. Posebno pozornost smo namenili ekstraktom na tržišču, iz katerih so bile v procesu rafinacije odstranjene alfa-kisline in beta-kisline tako predstavljajo pravzaprav stranski pojav.

DS4: Proučitev možnosti izdelovanja pripravkov na osnovi hmelja v Sloveniji

V Sloveniji imamo zelo dobro razvito hmeljarsko panogo, ki letno proizvede okoli 3 % svetovne proizvodnje hmelja in tako zaseda peto mesto med državami proizvajalkami. Tako imamo idealno surovinsko bazo za pridobivanje beta-kislin kot osnove za pripravke za zatiranje varoje. Trenutno v Sloveniji ne razpolagamo z možnostjo ekstrakcije hmelja, ker so takšni industrijski pogoni na samo treh mestih v svetovnem merilu. Kljub temu imamo v Sloveniji podjetja, ki se ukvarjajo s pripravo izdelkov, temelječih na ekstrakciji surovin z različnimi tehnikami. Nekatera izmed teh podjetij že imajo uveden t.i. dobra proizvodno prakso (GMP; good manufacturing practice), kar je tudi pogoj za izdelavo surovin, ki se uporabljajo za pripravo medicinskih in drugih podobnih izdelkov. Ob njihovem angažmaju bi lahko dosegli pripravo osnovnih surovin. Poleg omenjenih podjetij je v Sloveniji tudi določeno število

podjetij, katerih dejavnost je proizvodnja galenskih proizvodov in proizvodov na področju kozmetike, ki imajo kapacitete in znanje za izdelavo različnih oblik farmacevtskih izdelkov. Cilj tega delovnega sklopa je bila proučitev možnosti povezave posameznih deležnikov v slovenskem prostoru, ki bi lahko sodelovali pri morebitni izdelavi primerne pripravke za zatiranje varoj.

3. Povzetek ključnih ugotovitev iz literature

Hmelj (storžki oz. ženska socvetja) se uporablja zlasti kot pivovarska surovina. Je vir snovi, ki dajo pivu značilno sveže grenak okus (alfa- in beta-kisline) in tistih, ki prispevajo k aromi piva (poleg omenjenih alfa- in beta-kislin tudi nekatere sestavine hmeljnega eteričnega olja). Primarne spojine so grenčine, iz njih pa nastanejo z oksidacijo in kondenzacijo mehke in trdne smole. Smole sestavljajo alfa-kisline (humuloni) in beta-kisline (lupulon, kolupulon in adlupolon). Različne sorte hmelja se razlikujejo po zgradbi grenčin in obstojnosti le-teh med skladiščenjem. Količina kislin je odvisna od sorte hmelja, rastišča, klimatskih pogojev in stopnje zrelosti pridelka. Beta-kisline pri varjenju piva ne dajejo toliko grenkega okusa kot alfa-kisline, zato visok delež beta-kislin ni cilj vzgoje novih sort hmelja, uporabnih v pivovarstvu. Beta-kislinam se pripisuje tudi ostrejša, manj želena grenčica kot alfa-kislinam, zato se za pivovarstvo razvijajo sorte z nižjo celokupno vsebnostjo beta-kislin. Ravno beta-kisline pa imajo protivnetno in antibakterijsko delovanje (predvsem proti Gram pozitivnim bakterijam). Znana je objava o vplivu beta-kislin hmelja na antilisterijski učinek v živilski industriji (Shen and Sofos, 2008), ravno tako poročajo o uporabi beta-kislin v industriji sladkorja, kjer beta-kisline (blagovna znamka BetaStab®) zelo dobro biocidno zavirajo razvoj anaerobnih bakterij (Pollach in sod., 2002).

Ostanki hmelja so se v preteklosti uporabljali kot dodatek pri krmi živali, zlasti pri omnivorih prašičih (Brorsen in sod., 2002). Opaženo je bilo, da so te živali imele izboljšano zdravstveno stanje v primerjavi s kontrolnimi živalmi, ki jim niso dodajali hmelja. Glede na to so bili opravljeni poskusi na kokoših v baterijski reji, kjer so opazili, da dodatki hmelja kažejo podobne učinke kot dodatki antibiotikov (Cornelison in sod., 2006). Nadaljnje študije pri ljudeh so dokazale antibakterijsko delovanje hmelja na številne bakterije tudi v medicini (Natarajan in sod., 2007; Ohsugi in sod., 2007). Kljub temu, da se 5% hmelja porabi v farmacevtski industriji, pa se še nobeno farmacevtsko podjetje ne ukvarja z antibakterijskim delovanjem hmelja.

Ugotovljeno je tudi (U.S. Pat. No. 6,423,317), da grenčične smole hmelja uničijo praživali (Protozoa) in alge v rekah in jezerih. Mehanizem delovanja hmeljnih kislin je enak kot pri ionofornih antibiotikih – s spremenjeno pH vrednostjo v bakterijski celici povzročijo propad le-te.

Za hmeljeve beta-kisline je bilo pokazano, da učinkujejo kot repelent na nekatere vrste rastlinskih uši in pršic, hkrati pa pri nekaterih pršičjih taksonih zmanjšajo ovipozicijo in imajo negativen vpliv na preživetje odraslih pršic (Hampton et al. 2002; Jones et al., 1996, 2003). Prednost uporabe hmeljevih beta-kislin je v tem, da niso toksične in da so na voljo kot stranski produkt hmeljarske industrije (DeGrandi – Hoffman et al., 2012). Ravno tako je za njih odločeno, da ni postavljene MRL.

Toksičnost hmeljevih beta-kislin za čebele

Toksičnost hmeljevih beta-kislin za čebele je bila preučena na treh nivojih: s topikalno aplikacijo, v čebeljih družinah in v paketnih čebelah. Pri topikalnih aplikacijah so bile preskušane različne koncentracije HBK, raztopljenih v propilen glikolu, katere so bile aplicirane v odmerkih 0.5 µl na čebelji abdomen. Pri koncentraciji 1,0% je bila po 21 h smrtnost čebel 5%, 0,5% koncentracija pa v tem časovnem okvirju ni povzročila smrtnosti (DeGrandi – Hoffman et al., 2012). Neodvisna študija je na podoben način ugotovila, da 5% smrtnost povzroča šele uporaba 3,0% koncentracije, vendar tip topila v tej študiji ni bil podan (Rademacher et al., 2015). Za poskus v čebeljih družinah so pripravili 16% koncentracijo HBK na kartonskih trakovih. Pri preverjanju smrtnosti ni bilo zabeležene statistične razlike med odmiranjem čebel pred in po aplikaciji (DeGrandi—Hoffman et al., 2012). Slabše se je odrezalo vstavljanje takih trakov v paketne čebele, kjer je smrtnost močno narasla, če so bili v paket vstavljeni 4 trakovi. 2 -3 trakovi so povzročili sprejemljivo smrtnost čebel, ki pa je bila višja kot v kontrolni skupini (DeGrandi – Hoffman et al, 2012).

Smrtnost pršic kot posledica aplikacije HBK

0,5 in 1,0% HBK raztopine (v propilen glikolu) so bile topikalno aplicirane na čebelji abdomen. Po uspešni aplikaciji, so raziskovalci na čebelo namestili varjo. Po petih urah je bila smrtnost čebel 30 oz

23% za 0,5 in 1,0% koncentracijo, po 21 urah pa 100% oz. 87% za 0,5 % raztopino. Zabeleženo je bilo tudi repelentno delovanje (DeGrandi – Hoffman et al., 2012). V podobni študiji sta bili uporabljeni 0,5 in 1,0% hmeljevih alfa-kislin (HAK) in hmeljevih beta-kislin (HBK) v neznanem topilu. HBK so dosegle 78% in 85% učinkovitost ob 14 oz 8% smrtnosti čebel, HAK pa so bile manj učinkovite in so dosegale le 27% oz. 30% učinkovitost ob 3 in 18% smrtnosti čebel. Povišanje koncentracije (>1,0%) ni izboljšalo izplena (Rademacher et al., 2015).

Smrtnost varoje v čebeljih družinah je bila preskušana v duetu z 13-dnevnim omejevanjem matice. V čebelje družine so vstavili kartonske trakove, prepojene s 16% HBK. Trakovi so bili vstavljeni za 21 dni oz. 2x po 14 dneh. Kontrolo učinkovitosti so izvedli z namenskim zdravilom Apistan. Učinkovitost je bila različna, med 51 in 75%. Pri paketnih čebelah je bila učinkovitost vstavljenih trakov precej višja, med 94 in 100%.

Učinkovitost komercialnega zdravila HopGuard®

O učinkovitosti zdravila HopGuard®, narejenega na osnovi HBK, obstajata v literaturi dve diametralno nasprotni mnenji.

Študija, ki jo je opravil Vandervalk s sod. (2014) je pokazala, da aplikacija HopGuarda nima negativnega učinka na zalego, vendar je tudi relativno neučinkovit v svojem delovanju na varojo (42%). V spomladanskem času je bila učinkovitost nekoliko višja le, če so bili trakovi zamenjani vsake 3 dni.

Nasprotno, je klinični test v sodelovanju s podjetjem BetaTec (proizvajalec HopGuard® preparata) pokazal učinkovitosti med 75 in 88% (Rademacher et al., 2015).

Literatura

- Brorsen W., Lehenbauer T., Ji D., Connor J., 2002. Economic Impacts of Banning Subtherapeutic Use of Antibiotics in Swine Production. *Journal of Agricultural and Applied Economics* 34, 489-500.
- Cornelison J.M., Watkins, S.E., Waldgroup, P.W. 2006. Evaluation of Hops (*Humulus lupulus*) as an Antimicrobial in Broiler Diets. *Internat Jour Poultry Sci* 5(2): 134-136.
- DeGrandi-Hoffman G., Ahumada F., Probasco G., Schantz L. 2012, The effects of beta-acids from hops (*Humulus lupulus*) on mortality of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), *Exp. Appl. Acarol* 58:407-421.
- Jones G., Campbell C.A.M., Pye B.J., Maniar S.P., Mudd A., 1996, Repellent and Oviposition-Deterring Effects of Hop Beta-Acids on the Two-Spotted Spider Mite *Tetranychus urticae*, *Pest Management Science* 47:165-169.
- Natarajan S., Katta I., Andrei V., Babu Rao Ambati M., Leonida G., 2007. Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. *Phytomedicine* 15, 194-201.
- Ohsugi M., Kadota S., Ishii E., Tamura T., Okamura Y., 2007. Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori*. *Phytomedicine* 15, 194-201.
- Polach G., Hein W., Beddie D. 2002. Application of hop Beta-acids and rosin acids in the sugar industry. *Zuckerindustrie* 127(12): 921-930.
- Rademacher E., Harz M., Schneider S., 2015, *The development of HopGuard® as a winter treatment against Varroa destructor in colonies of Apis mellifera*, *Apidologie* 46:748-759.
- Shen C., Sofos J.N. 2008. Antilisterial Activity of Hops Beta Acids in Hops with or without other antimicrobials. *Journal Food Sci* 73(9): 438-442.
- Vandervalk L.P., Masr M.E., Dosdall L.M., 2014, New Miticides for integrated Pest Management of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in Honey Bee Colonies on the Canadian Prairies, *J. Econ. Entomol.* 107(6): 2030-2036.

4. Uporabljene metode dela, rezultati in razprava z zaključki

V obdobju izvajanja projekta od oktobra 2016 oktobra 2019 smo izvajali aktivnosti, predvidene v programu dela na projektu. Delo je potekalo po posameznih sklopih in pri vseh partnerjih na projektu (IHPS, VF, KIS, ČZS in FFA).

V nadaljevanju podajamo aktivnosti in rezultate po posameznih sklopih.

DS1: Pridobitev podatkov o sestavi in načinu aplikacij pripravkov za zatiranje varoje

V času izvajanja projekta smo naredili pregled in popis na tržišču dostopnih pripravkov za zatiranje varoje. Pripravili smo popis različnih načinov aplikacije in primerjali učinkovitosti in mehanizme njihovega delovanja ter morebitnih negativnih lastnosti. V zaključni fazi je priprava elektronske oblike strokovne monografije, ki bo prosto dostopna na spletnih straneh sodelujočih institucij. V spodnji preglednici 1 zato samo podajamo kratek pregled, ki bo dostopen v obliki monografije.

Preglednica 1: Seznam pripravkov in njihovih aktivnih učinkovin, proizvajalcev in načinov delovanja ter držav v katerih so registrirani

Ime pripravka	aktivna učinkovina	proizvajalec	delovanje	država registracije
Varidol	amitraz (125mg)	Bee Research Institute, Dol, Češka	različni načini aplikacije, delovanje je kontaktno	CZ, SK
Apivar	amitraz	Veto Pharma	kontaktno	FR, ES
Apivar	amitraz	Laboratories Biove	kontaktno	I
Apivar 500 mg trakovi	amitraz	Iberil Sa	kontaktno	PT
Apiwarol 12,5 mg tablete	amitraz	Biowet Pulawy Sp.z.o.o, Poljska	tableto se zažge ; delovanje kontaktno	PL
Biowar 500	amitraz	Biowet Pulawy Sp.z.o.o, Poljska	kontaktno	PL
Apitraz 500 mg trakovi	amitraz	Qalian Portugal	kontaktno	PT
Varatraz	amitraz	Pasteurjev inštitut, Romunija	kontaktno in skozi dihala (inhalacija)	RO
Apitraz	amitraz	Laboratories Calier	kontaktno	ES
Avartin 01-B90	amitraz, 18% solucija KNO ₃	Bares Nitra, Slovak Republic	kontaktno	SK
Varachet forte	amitraz, tau-fluvalinate	Institutul de cercetare - dezvoltare pentru apicultura s.a.	kontaktno s plinjenjem (inhalacija)	RO
Checkmite	coumaphos	Bayer Hispania,s.l.	kontaktno	ES
Perizin external solution	coumaphos	Bayer Hungaria Co, Ltd	ni več v uporabi	HU
Checkmite plus	coumaphos 1,36 g/ trak	Bayer HealthCare AG, Germany (ALAPIS S.A.)!	kot CheckMite	BG, HR, CY, GR, RO
Perizin	coumaphos 32,0 mg/ml	Bayer HealthCare AG, Germany (!)	ni več v uporabi	BO, HR, DE, GR, RO, SI
Varostop	flumethrin	Bičiu Austeja, Lithuania	kontaktno	LV
Bayvarol trakovi	flumethrin 3,6 mg/trak	Bayer, Germany , Bayer Hungaria Co Ltd	kontaktno	BO,HR,EE,DE,GR,HU,IE, LV,LT,HU,MT, RO, SK, SI, GB
Bayvarol trakovi	flumethrin 3,6 mg/trak	Bayer Hungaria Co Ltd	kontaktno	HU

Bayvarol trakovi	flumethrin 3,6 mg/trak	Bayer Portugal Sa	kontaktno	PT
Byvarol trakovi	flumethrin 3,6 mg/trak	Quimica farmaceutica Bayer	kontaktno	ES
Varostop trakovi	flumethrin 3,6 mg/trak	"Primavet -Sofia" OOD, Bolgarija	kontaktno	BG
Apistan trakov	fluvalinate	Vita (Evropa) Limited	kontaktno	CY, EE, FR, GR, IT, LT, ES
Apistan 0,8g/trak	fluvalinate	Hifarmax, Ltd.	kontaktno	PT
Ecostop lamellae	menta, piperit, thymol	"Primavet -Sofia" OOD, Bolgarija	kontaktno	BG
AMO Varroxal 85 %	mravljinčna kislina	Rösch & Handel vormals Gimborn u. Co GmbH u.	izhlapevanje, šok terapija, kontaktno, inhalacija	AT
Formidol	mravljinčna kislina	Bee Research Institute, Dol, Češka	hlapi	CZ, SK
MAQS	mravljinčna kislina	NOD Europe Ltd	hlapi, šok terapija	EE, FR, DE, IE, IT, PT, ES, GB
MAQS	mravljinčna kislina	BASF, UK		SI
Furmiton	mravljinčna kislina 25 ml, 60 %	Evrotom d.o.o. Republika Srbija		BG
Mehpatika	naravna zelišča !!	Chemor Research	s hrano	RO
BeeVital Hive Clean	OA, citronska, propolis..	Food&Beverage Handelsgesellschaft	s kapanjem (kontaktno in sistemsko)	RO
Dany's BienenWohl - 3,5% (m/m)	oksalna kislina	Dany Bienenwohl GmbH	kontaktno	AT
Api Bioxal	oksalna kislina	Erista Ltd.	kapanje in sublimacija	HU
Api Bioxal	oksalna kislina	Chemicals Laif	kapanje in sublimacija	IT
Exocal	oksalna kislina	Ceva Salud Animal, S.A.	verjetno enako kot zgoraj	ES
Mavrirol	tau-fluvalinate	Institutul de cercetare - dezvoltare pentru apicultura s.a.	kontaktno	RO
Apistan trakov	tau-fluvinat	Vita (Evropa) Limited	kontaktno	LV, NL, SE, GB
Gabon PF 90	tau-fluvinat	Bee Research Institute, Dol, Češka	kontaktno	CZ, LT, SK
MP 10 FUM 24 mg/ml	tau-fluvinat 24 mg/ml	Bee Research Institute, Dol, Češka	kontaktno	CZ
M-1 AER 240 mg/ml	tau-fluvinat 240 mg/ml	Bee Research Institute, Dol, Češka		CZ, SK
Varotom	taufluvinat 80 mg/trak	Evrotom d.o.o. Republika Srbija		BG
Apiguard	thymol	Vita (Evropa) Limited	izhlapevanjem in s kontaktom	AT, BE, HR, CZ, EE, FR, DE,GR,HU,IE,IT,LV,LT, NL,PL,RO,SK,ES,SE,GB
Apiguard 25%	thymol	Hifarmax, Ltd.		PT
THYMOVAR, 15 g	thymol	Andermatt BioVet GmbH	kontaktno	AT, BE, HR, CZ, FR, DE,

				GR, HU, NL, PT, RO, SK, ES, GB
Thymovar, 15 g	thymol	Dr. Schaette AG, Germany		PL, SI
APILIFE VAR	thymol, menthol, eucaliptusovo olje, kafa	Chemicals Laif SpA	kontaktno	AT, BE, HR, FR, DE, HU, IT, PL, PT, SK, SI, GB
Apiguard Gel	tymol	Laleham Healthcare Ltd, VB		AT, BO, SI

DS2: Izvedba praktičnih preskušanj pripravkov na osnovi hmelja v različnih časovnih okvirih in na različno prizadetih čebeljih družinah

Delo v tem sklopu je glede na različna podpodročja razdeljeno v 7 delovnih podsklopov označenih od DS2.1 do DS2.7.

DS2.1 - DS2.3 Ugotavljanje vpliva hmeljnih kislin na smrtnost varoj (*Varroa destructor*) in toksičnosti za čebele (*Apis mellifera carnica*) v laboratoriju

Teste smo opravili v laboratoriju Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele na Veterinarski fakulteti. Preskušali smo vpliv hmeljnih kislin v različnih koncentracijah, propilen glikol (PG), ki je služil kot topilo hmeljnih beta-kislin in samostojno eterična olja kot sestavino hmeljnih beta-kislin. Ob vseh testih smo imeli tudi kontrolno skupino.

Varoje za teste smo pridobivali iz močno napadenih čebeljih družin last različnih čebelarjev, čebele pa v čebelnjaku last Veterinarske fakultete. V močno napadenih čebeljih družinah smo varoje pridobivali iz pokrite delavske zalege, ki smo jo iz družin premestili v inkubator. Ko so bile čebele tik pred poganjanjem, smo odpirali in na bubah/čebelah iskali primerne varoje. Varoje smo pridobivali tudi iz živih čebel bodisi, da smo čebele narkotizirali s CO₂ in počakali, da so se z njih odpustile varoje ter padle na pladenj ali pa s pomočjo sladkornega testa, pri katerem čebel ni bilo treba omamiti, varoje, ki so se odpustile pa smo zajeli v pladenj. Varoje pridobljene v zalegi ali na čebelah smo ocenili kot primerne, če so bile temno rjave barve in so se živahno gibale ter jih do uporabe shranili v petrijevki z navlaženim filter papirjem. Čebele za poskus smo ometli s satja z nepokrito zalego, v dveh testih pa smo uporabili en dan stare čebele, ki so se izvalile v inkubatorju, kamor smo vstavili sat s pokrito zalego tik pred poganjanjem.

Vse teste, s katerimi smo ugotavljali učinek hmeljnih kislin, PG ali samo eteričnih olj smo izvajali v inkubatorju s temperaturo 34°C in vlago 65% ter smrtnost čebel in/ali varoj spremljali v nekaj urnih časovnih intervalih. Hmeljne beta-kislone in eterična olja smo testirali v naslednjih masnih koncentracijah: 0,1 %, 0,2%, 0,5%, 1%, 2% in 5%.

Raziskavo smo izvedli v treh sklopih. V prvem sklopu smo učinek hmeljnih beta-kislin na varoje in na čebele ugotavljali hkrati. Test smo opravili šestkrat s po eno paralelko, v kateri smo imeli po 10 čebel in po 10 varoj in enkrat v dveh paralelkah s po 20 čebel in 20 varoj.

Za testiranje smo pripravili komore, v katerih so bile čebele in varoje med poskusom nameščene v inkubator. Komora je bila sestavljena s petrijevke, ki je predstavljala dno, na katerega smo poveznili plastični kozarec. Na vrhu kozarca smo naredili odprtino, skozi katero smo vstavili manjšo epruveto, ki smo jo na spodnjem koncu naluknjali in je služila kot pitalnik. Tako pripravljene pitalnike smo napolnili s sladkorno raztopino 1:1 (Slika 1).

Testirali smo 0,5%, 1%, 2%, 5% in 10% koncentracijo hmeljnih beta-kislin v topilu (PG), kot kontrolo pa smo imeli samo PG. Na vsako čebelo smo s pipeto na toraks nanesli po 0,5 μ l pripravka in nanjo s čopičem nanesli po eno vitalno varojo. Komore z invadiranimi čebelami smo imeli 72 ur v inkubatorju, smrtnost varoj in čebel pa preverjali po 5 urah, po 12, 24, 48 in 72 urah.

Rezultati učinkovitosti hmeljnih beta-kislin ob hkratni toleranci čebel nanje so bili v prvi fazi vzpodbudni, saj je bila učinkovitost kislin na varoje v višjih koncentracijah zadovoljiva, smrtnost čebel pa tudi relativno visoka, vendar je bila smrtnost čebel (pre)visoka tudi pri nižjih koncentracijah, kar smo pripisovali neizenačeni starosti čebel, ki smo jih ometli s satja. Zato smo spremenili metodologijo in v zadnjih dveh poskusih uporabili mlade čebele, ki so bile v izvedbah poskusa pri vseh koncentracijah hmeljnih beta-kislin in v kontroli enako stare. Tudi v teh dveh testih so bile tudi nizke koncentracije zelo toksične za čebele ob sicer dovolj visoki učinkovitosti na varoje.



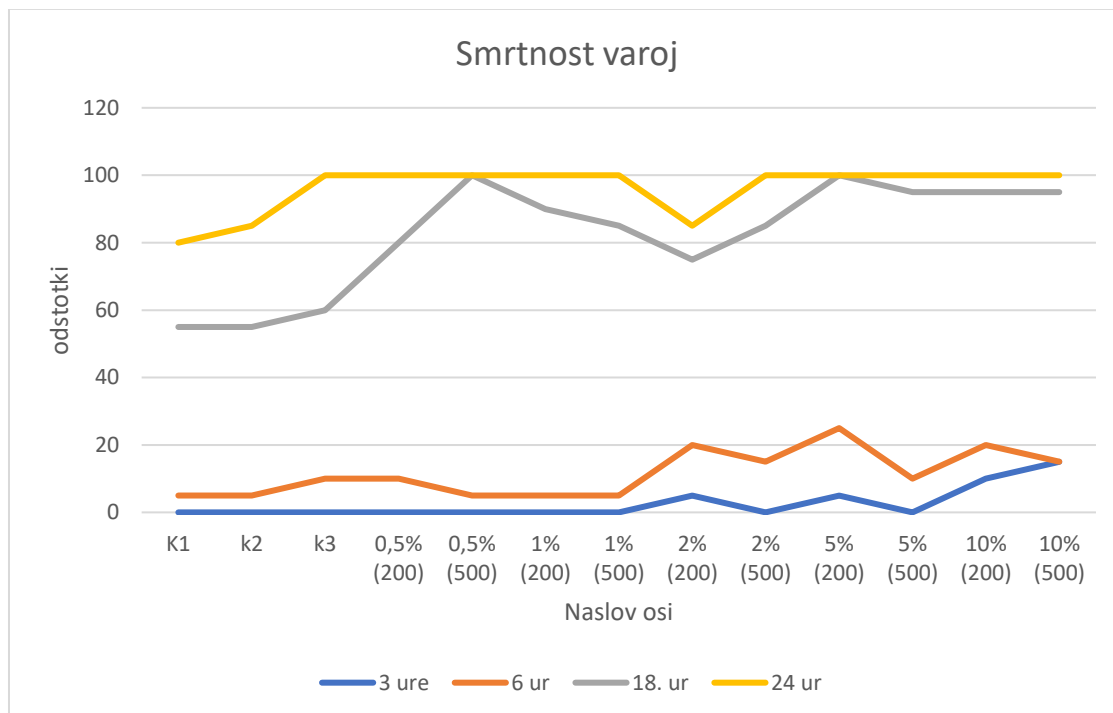
Slika 1: Čebele in varoje v poskusu.

V drugem sklopu smo vpliv hmeljnih beta-kislin na varoje in na čebele ugotavljali ločeno, saj hkraten test ni dal ustreznih rezultatov. Za ugotavljanje toksičnosti smo preskušali hmeljne beta-kislone v koncentracijah 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10% in PG. Izvedli smo štiri ponovitve. V vsaki ponovitvi smo za vsako preiskovano snov v petrijevke našteali po 20 varoj. Z ustreznimi koncentracijami hmeljnih beta-kislin smo prepojili filter papir in nanj v petrijevki izpostavili varoje (Slika 2). V vsako ponovitev smo vključili dve do tri kontrole, kjer so bile v petrijevkah samo varoje. Smrtnost varoj smo preverjali pod lupo, kjer smo zaznali tudi manj izražene aktivnosti varoj, in je bila ocena smrtnosti objektivna. Varoje smo premeščali in preverjali z manjšim čopičem, ki je imel vlogo odlakane čebele, tako da so ustrezno vitalne varoje same skočile na čopič, kot bi skočile na čebelo. Na ta način smo tudi preverili, če so bile varoje dovolj vitalne za poskus.



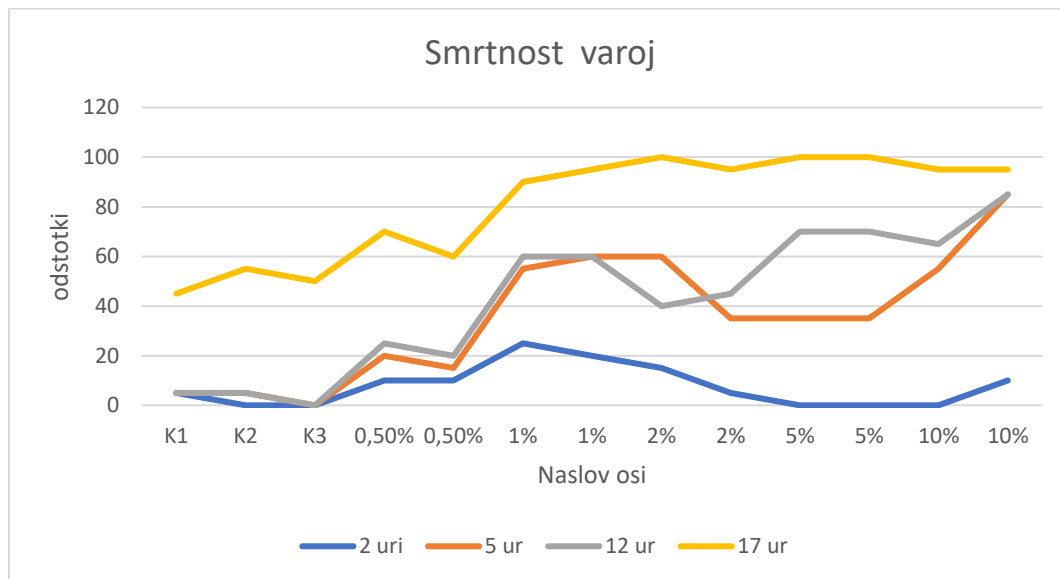
Slika 2: Petrijevke s prepojenim filtrirnim papirjem, kamor smo izpostavili varoje.

Pri prvi ponovitvi smo imeli dve paralelki in sicer smo v prvi varoje za pol ure izpostavili 200 μ l vsake razredčitve, v drugi pa 500 μ l vsake razredčitve. Po pol ure smo varoje prestavili v čiste petrijevke, jih vstavili v termostat in smrtnost varoj pregledovali po 3, 6, 18 in 24 urah. Rezultati so podani v Grafikonu 1.



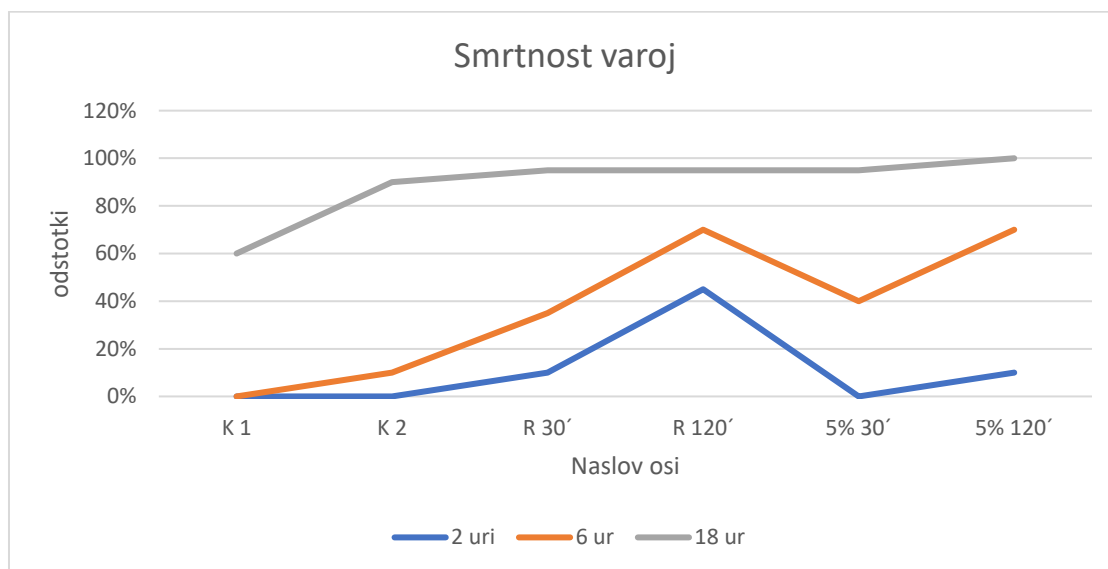
Grafikon 1: Smrtnost varoj po pol-urni izpostavljenosti varoj 200 μ l in 500 μ l posamezne razredčitve po 3, 6, 18 in 24 urah.

V drugi ponovitvi smo uporabili po 500 µl vseh obravnavanih razredčitev in jim za dve uri izpostavili varoje. Po dveh urah smo varoje prestavili v čiste petrijevke, jih namestili v termostaat in smrtnost varoj preverjali po 2, 5, 12 in 17 urah. Rezultati so prikazani v Grafikonu 2.



Grafikon 2: Smrtnost varoj po dve - urni izpostavljenosti varoj 500 µl razredčin po 2, 5, 12 in 17 urah.

Tretja ponovitev je bila podobna kot sta bili 1. in 2., le da smo tokrat testirali samo PG in ga primerjali z 5% hmeljno beta-kislino. Smrtnost smo ugotavljali po 2, 6 in 18 urah. Rezultati so prikazani v Grafikonu 3. Iz Grafikona je razvidno, da že samo topilo PG povzroča smrtnost varoj.

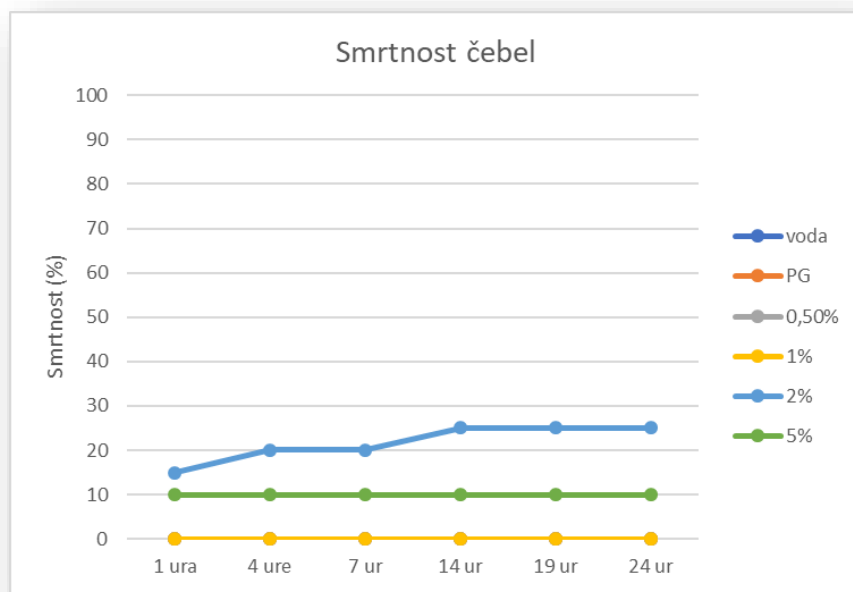


Grafikon 3: Smrtnost varoj po izpostavitvi pol in dve uri 500 µl PG in 5% beta hmeljne kisline po 2, 6 in 18 urah.

Če povzamemo rezultate, ugotovimo, da je smrtnosti varoj pri hmeljnih beta-kislinah različnih koncentracij višje kot pri kontrolah. Ugotovili smo tudi, da je po kratkem času smrtnost varoj pri različnih koncentracijah različna, nižje koncentracije povzročijo višjo smrtnost varoj kot višje. Pri daljšem delovanju pa ugotavljamo, da je pri vseh koncentracijah smrtnost med 90 in 100%. Ni razlik

pri izpostavitvi varoj hmeljnim beta-kislinam za pol ali za dve uri. Nenavadno je, da na smrtnost učinkuje že samo topilo PG.

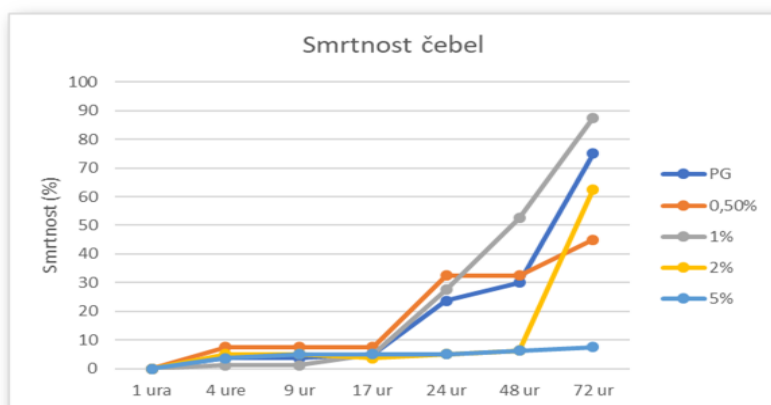
Za ugotavljanje toksičnosti hmeljnih kislin na čebele smo po 20 čebel nabranih v čebelji družini vložili v matičnice in jih za eno uro izpostavili hmeljnim beta-kislinam v koncentracijah 0,5%, 1%, 2% in 5% in PG. V kontrolni skupini smo čebele izpostavili destilirani vodi. Vsake snovi je bilo po 200 µl. Matičnice s čebelami smo vložili v termostatski ohišje in smrtnost ugotavljali po 1, 4, 7, 14, 19 in 24 urah. Rezultati so prikazani v Grafikonu 4.



Grafikon 4: Smrtnost čebel v prvem poskusu.

Smrtnost čebel je pri koncentraciji 2% in 5% hmeljnih beta-kislin že po eni uri znašala 10 % in več, po 4-ih in 24 urah pa se je smrtnost pri 2% dvignila na 20% in 25%, pri 5% pa je ostala na isti ravni.

Rezultati druge ponovitve so prikazani v Grafikonu 5.

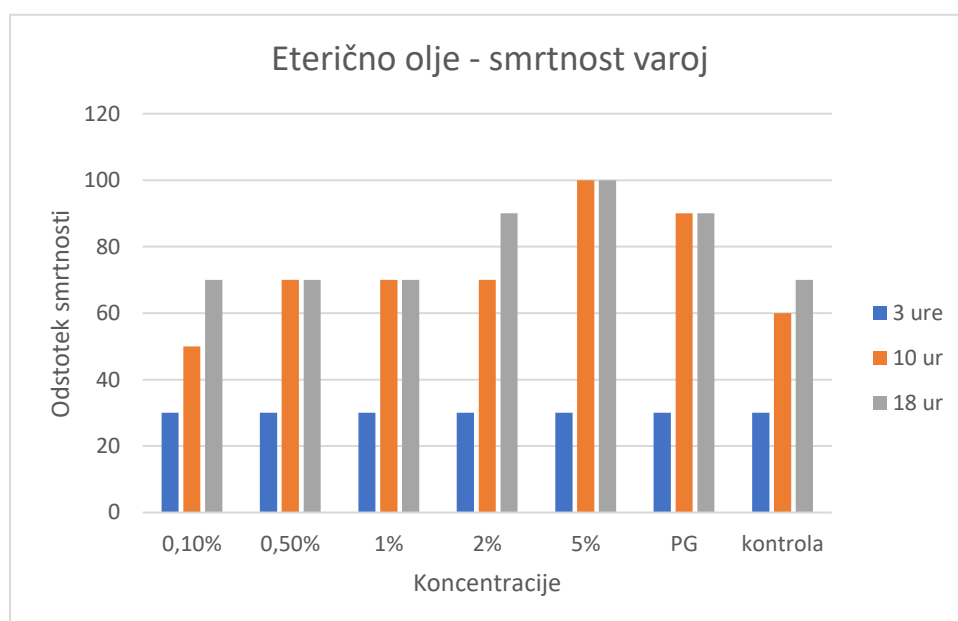


Grafikon 5: Smrtnost čebel v drugem poskusu

Smrtnost čebel je bila po 4 urah najvišja (7,5%) pri 0,5% razredčitvi, sledila je 5% smrtnost pri 2% razredčitvi hmeljnih beta-kislin. Pri razredčitvi 5% in pri PG pa je bila smrtnost po 4 urah enaka (3,7%). Po 17 urah ni bilo bistvenih sprememb v umrljivosti čebel, po 24 urah pa je 30% smrtnost presegla 0,5% koncentracija beta hmeljnih kislin. Zanimivo je, da je bila pri koncentracijah 2 in 5% tudi po 48 urah smrtnost čebel (le) 6,25%.

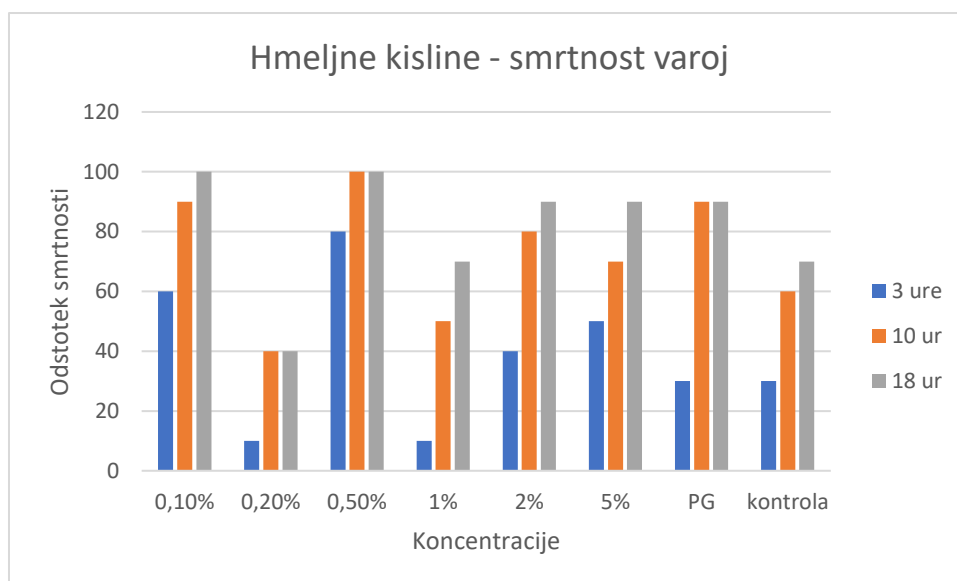
Iz dosedanjih rezultatov je razvidno, da na vpliv smrtnosti ne vplivajo le koncentracije, pač pa tudi drugi dejavniki. V drugem poskusu po 17 urah smrtnost pri nobeni koncentraciji ni presegla 7,5%.

V tretjem sklopu smo v poskusu iz hmeljnih kislin izločili eterična olja, da bi videli, če ta morda učinkujejo že sama po sebi. Poskuse smo opravili na varojah in čebelah ločeno. Na filter papir v petrijevki smo natopili po 500 µl vsake koncentracije hmeljih kislin, eteričnih olj, GP in kontrole (destilirana vode) ter čebele in varoje ločeno izpostavili za ves čas testa in za eno uro. Rezultati so podani v Grafikonih 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 in 13.



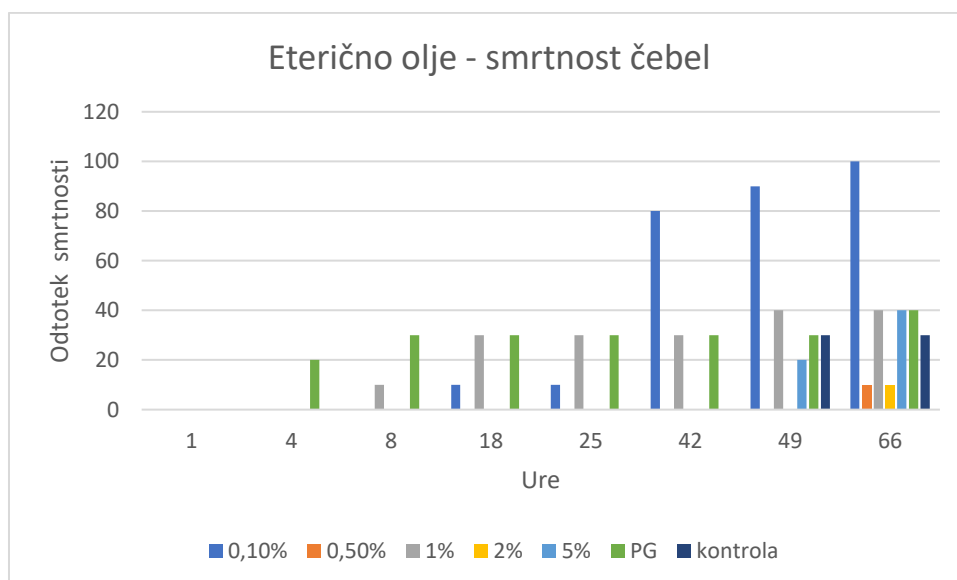
Grafikon 6: Smrtnost varoj pri 18 urni izpostavljenosti eteričnim oljem.

Iz Grafikona 6 je razvidno, da po desetih urah že sama eterična olja v hmeljnih kislinah povzročajo smrtnost varoj.



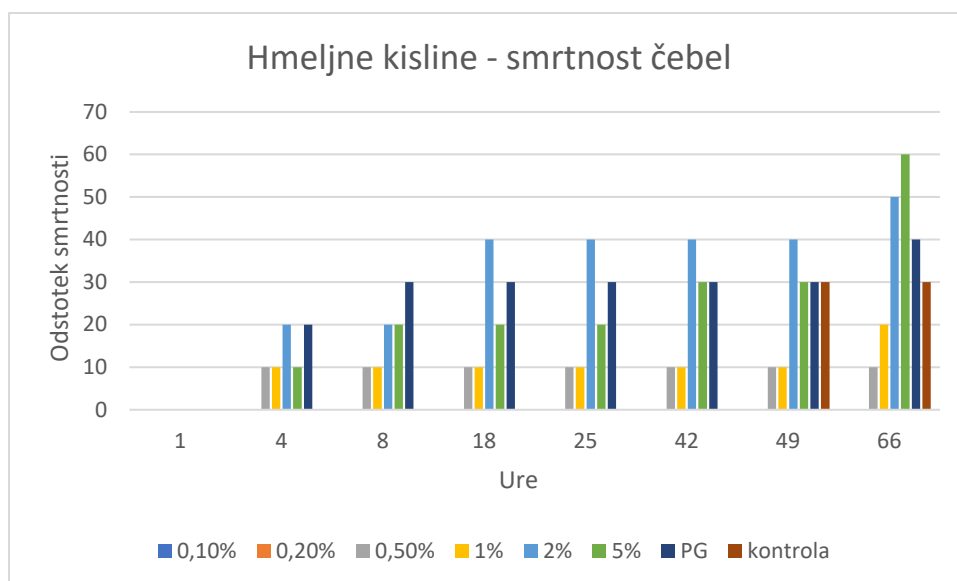
Grafikon 7: Smrtnost varoj po 18 urni izpostavitvi hmeljnim kislinam.

Iz Grafikona 7 je razvidno, da že nizke koncentracije hmeljnih beta-kislin po daljši izpostavljenosti učinkujejo na smrtnost varoj.



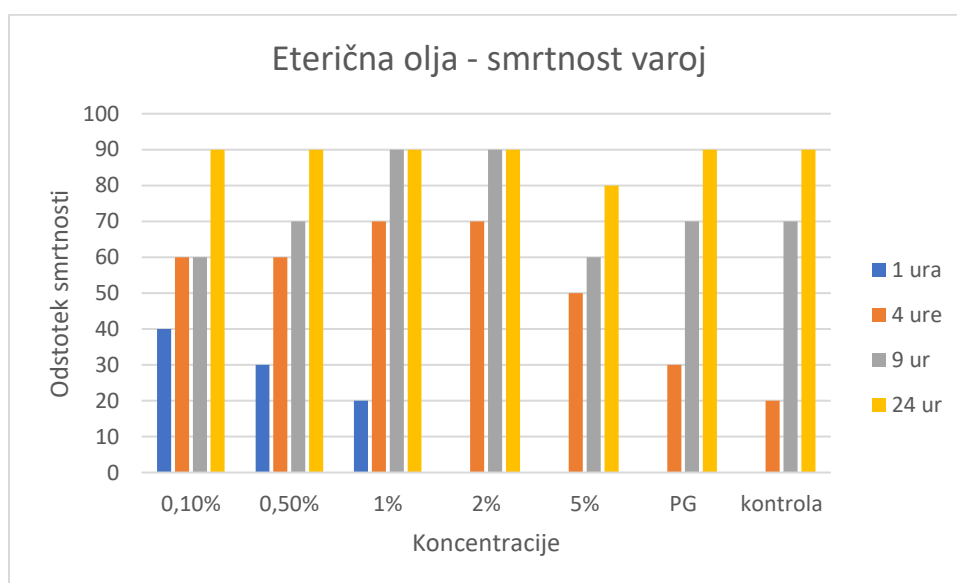
Grafikon 8: Smrtnost čebel po 66 urni izpostavitvi eteričnim oljem.

Iz Grafikona 8 je razvidno, da sama eterična olja, ki delujejo do 1 dan nimajo toksičnih učinkov na čebele. Ima pa toksičen učinek PG tudi, če deluje kratek čas.



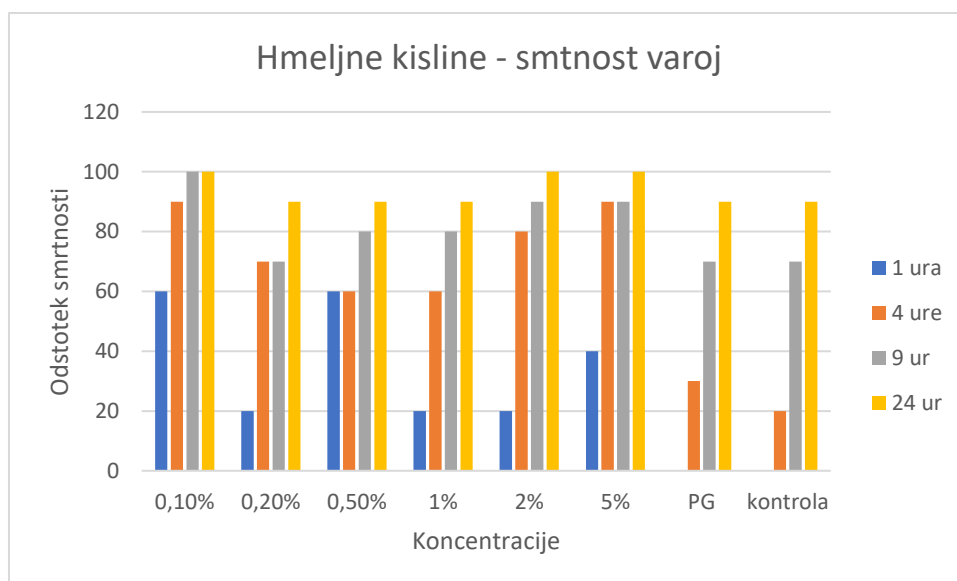
Grafikon 9: Smrtnost čebel po 66 urni izpostavitvi hmeljnim beta-kislinam.

Iz Grafikona 9 je razvidno, da 20 odstotno smrtnost čebel povzroča že 2% koncentracija hmeljnih kislin in PG po štirih urah, potem pa se smrtnost stopnjuje.



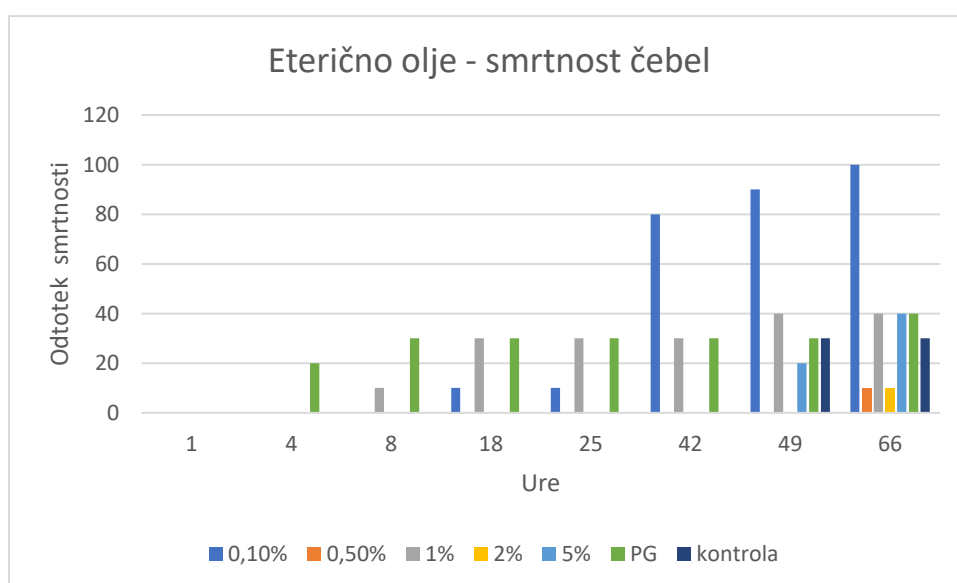
Grafikon 10: Smrtnost varoj po eno urni izpostavitvi eteričnim oljem

Iz Grafikona 10 je razvidno, da tudi eno urna izpostavitvev nizkim koncentracijam eteričnega olja povzroča smrtnost varoj. Je bila pa smrtnost varoj tudi v kontrolni skupini, kar kaže na neizenačeno starost in slabšo vitalnost varoj v poskusu.



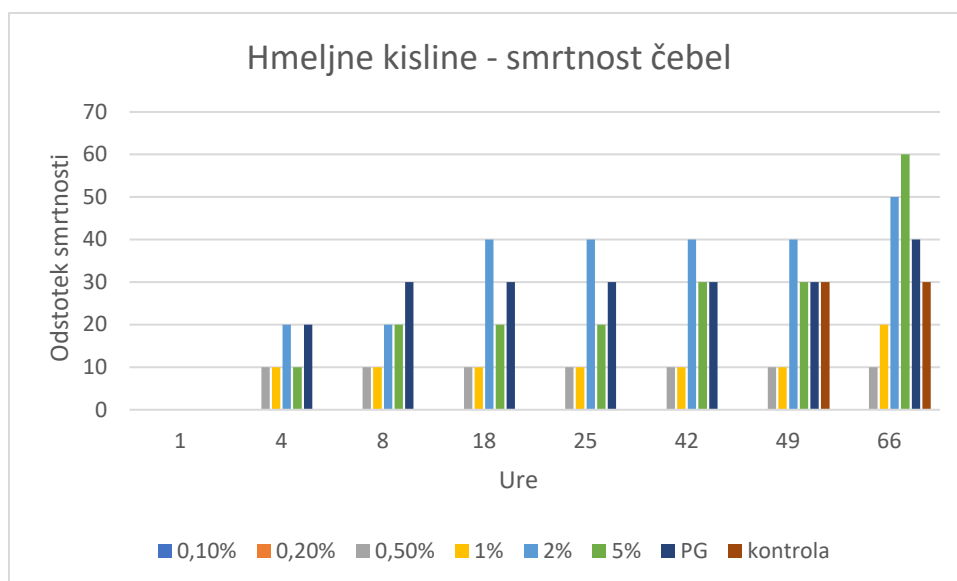
Grafikon 11: Smrtost varoj po eno urni izpostavitvi hmeljnim beta-kislinam.

Iz Grafikona 11 vidimo, da hmeljne kisline tudi v nizkih koncentracijah že v kratkem času učinkuje na smrtosti varoj. Pri PG in kontroli so varoje umirale kasneje in v manjšem odstotku.



Grafikon 12: Smrtost čebel po eno urni izpostavitvi eteričnim oljem

Vidimo, da eterična olja po 25 urah ne deluje toksično. Bolj toksično je topilo PG. Izjema je 1% koncentracija, kar pa pripisujemo drugim učinkom.



Grafikon 13: Smrtnost čebel po eno urni izpostavitvi hmeljnim beta-kislinam.

Iz Grafikona je razvidno, da že nizke koncentracije v kratkem času učinkujejo toksično na čebele.

Zaključki DS2.1 – DS2.3

V raziskavi smo ugotovili, da hmeljne beta-kisline že v kratkem času pri nizkih koncentracijah učinkujejo na smrtnost varoj. Učinek delovanja je nepoznan, saj smrtnost varoj povzročajo že sama eterična olja in topilo PG.

Hmeljne beta-kisline same (brez eteričnih olj) delujejo toksično tudi na čebele, zlasti še pri daljšem času delovanja. Toksično deluje tudi topilo PG. Poudariti je treba, da so eterična olja bistveno manj toksična na čebele, kar bi veljalo raziskati in morda za zatiranje varoj uporabljati samo eterična olja hmelja.

Hmeljne beta-kisline imajo potencial za razvoj zdravila za zatiranje varoj, čeprav je smrtnost čebel previsoka, saj ta že pri nizkih koncentracijah doseže 10% in več. Ob pomanjkanju substanc/zdravil za zatiranje varoj pa bo smiselno nadaljevati raziskavo in poiskati načine uporabe, kjer bi bilo zmanjšano tveganje za čebele.

DS2.4 Test »oralne« toksičnosti hmeljevih ekstraktov za čebelo

V sklopu DS 2.4. smo izvedli 3 poskuse: v 1. poskusu smo čebele krmili po volji (*ad libitum*) ter spremljali preživetje čebel, v 2. poskusu smo čebele enkratno nakrmili s sladkorno raztopino, vsebujočo hmeljne beta-kisline (HBA) različnih koncentraciji, ter prav tako preverjali dolgoživost ter poškodbe prebavnega trakta in v 3. poskusu smo različne koncentracije nanесли topikalno na oprsje čebel ter spremljali preživetje.

Čebele znane starosti smo za vse poskuse pridobili tako, da smo sate s polegajočo zalego prestavili v inkubator ($T=34^{\circ}\text{C}$ in $\text{RH}=60\%$), ter pustili čez noč, da se zalega poleže. Naslednji dan smo čebele uporabili v poskusu. Kletke za poskus smo naredili iz plastičnih kozarcev višine 11 cm, premera 8 cm z cca 80 manjših lukenj (premer cca. 2 mm), ki zagotavljajo zračenje. Kozarec je bil z odprtino položen na pokrov petrijevke. V dnu kozarca je luknja premera 12 mm, skozi katero vstavimo 10 ml injekcijsko brizgo, iz katere čebele odvijajo hrano. Tekom poskusa smo imeli kletke s čebelami v inkubatorju na 28°C in 60 % relativne vlage.

Poskus 1

Material in metode

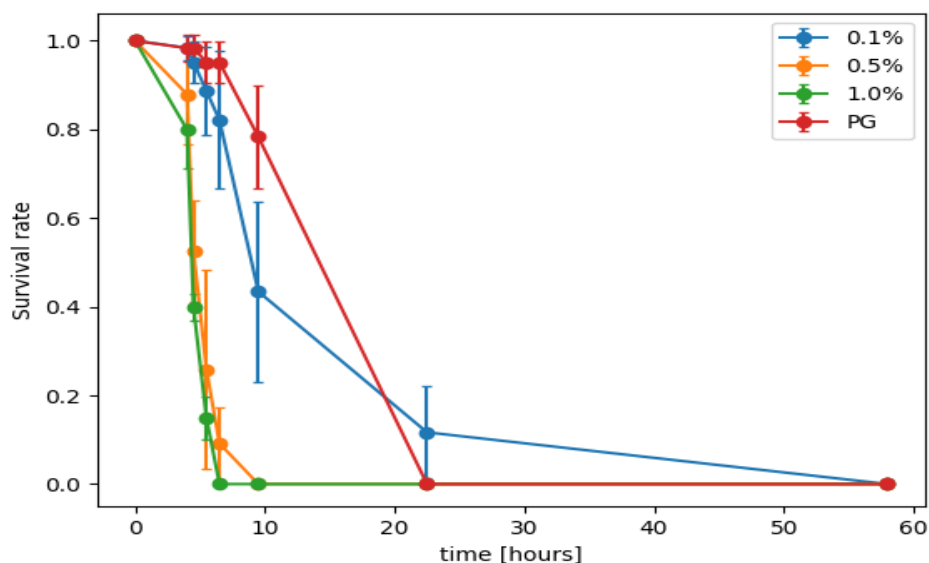
Tretji dan po izleganju smo čebele razvrstili v kletke. Pripravili smo 3 različne koncentracije beta-kislin (HBA), razredčene v propilen glikolu in sladkorni raztopini (sladkor:voda = 1:1, w:w) v naslednjih koncentracijah: 0,1, 0,5 in 1 % raztopina. Za kontrolo smo uporabili propilen glikol v sladkorni raztopini. Pripravili smo tri ponovitve po 15 čebel. Čebele so prejemale hrano po volji (*ad libitum*). Smrtnost čebel smo spremljali po urah. Poskus smo še enkrat ponovili v septembru 2018. Na začetku poskusa so bile delavke stare 1 do 2 dni. Pripravili smo 6 skupin, kjer smo čebele izpostavili različnim koncentracijam HBA, propilen glikolu in za kontrolo sladkorni raztopini (Preglednica 1). Čebele so hrano prejemale *ad libitum* (po želji). Pripravili smo po 4 ponovitve in v vsako kletko vstavili po 15 čebel.

Preglednica 1: Opis posamezne skupine preskušanja

Skupina	Tretiranje	Št. čebel
A	0,1 % HBA	60
B	0,5 % HBA	60
C	1 % HBA	60
D	2 % HBA	60
E	Propilen glikol	60
F	Sladkorna raztopina	60

Rezultati

Prve mrtve čebele smo opazili 2,5 ure po začetku poskusa v skupini z 1% HBA v sladkorni raztopini ter v skupini z 0,5 % HBA. Po 6,5 urah smo bile mrtve vse čebele v skupini 1% HBA. Po 10 urah so odmrle vse čebele iz skupine z 0,5% HBA, do jutra pa so odmrle tudi vse čebele v kontrolni skupini s propilen glikolom v sladkorni raztopini. Čebele v prvi skupini z najnižjo koncentracijo so odmrle čez 48 ur od začetka poskusa. V septembru so po dobrih 17 urah bile v skupini A in B mrtve skoraj vse čebele, medtem ko so v skupini z C in D pomrle vse čebele v vseh ponovitvah. V skupini s propilen glikolom (E) je ostalo živih nekaj čebel in skoraj vse v kontrolni skupini (F). (Slika 3)



Slika 3: Preživetje čebel, ki so imele v sladkorni raztopini različne odstotke HBA (0.1, 0.5, 1.0 %) oziroma propilen glikolga (PG). Sladkorna raztopina je bila na voljo *ad libitum*.

Poskus 2

Material in metode

Najprej smo opravili preliminarni poskus individualnega hranjenja čebel z HBA, dodatno raztopljene v sladkorni raztopini (Preglednica 2). Individualno (per os) smo z mikropipeto nahranili vsaj po 10 čebel, nato smo jih vstavili v kletke in jim pripravili epruveto z vodo in hrano. Vse kletke smo vstavili v inkubator na 28 °C in 60 % relativno vlago. V inkubator smo namestili snemalno napravo in lučko ter snemali kletko z individualno tretiranimi čebelami (I. skupina, 1% HBA v sladkorni raztopini).

Preglednica 2: Opis posameznega tretiranja

Skupina	Tretiranje
I.	1 % HBA v sladkorni raztopini
II.	Propilen glikol v sladkorni raztopini
III.	Kontrola - sladkorna raztopina

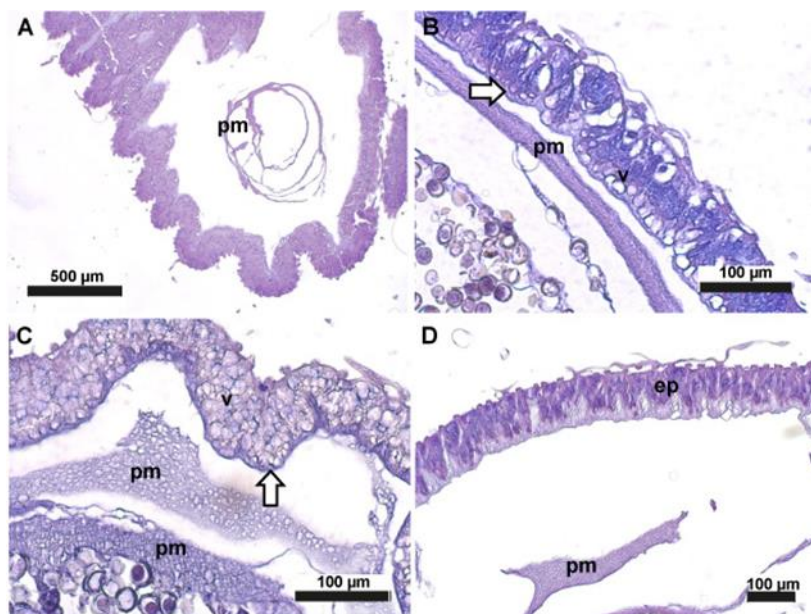
Preglednica 3: Opis posameznega tretiranja

Skupina	Tretiranje
I.	0,05% HBA v sladkorni raztopini
II.	0,25% HBA v sladkorni raztopini
III.	50% PG v kontrolni skupini
IV	Sladkorna raztopina

Rezultati

Na podlagi preliminarnih rezultatov smo določili koncentracije, ki smo jih kasneje uporabili v poskusu in so prikazane v tabeli 3. Vsako uro smo vzorčili po tri čebele. Naredili smo sekcijo srednjega črevesa (ventrikla) in ga pripravili za histološke analize. Za 24 ur smo tkivo shranili v 10% formalin, nato za 1 uro v 70%, 80%, 90% in 100% alkohol, nato 100% izopropanol za 1 uro, 100% izopropanol za 12 ur, ponovno za 1 uro in nato v inkubator z razmerjem izopropanol : parafinski vosek (1:1) za 24 ur, sledilo je trikratno hranjenje tkiva v 100% parafinskem vosku. Na koncu smo tkiva zalili s čistim parafinskim voskom v bloke. Posamezne bloke smo narezali na mikrotom na 7 µm tanke rezine in jih pripravili za barvanje s H&E.

Analizirali smo posnetek individualno hranjenih čebele iz preliminarne poskusa. Ugotovili smo, da so čebele že takoj kazale prizadetost, saj so bile v kletki zelo nemirne ali povsem neaktivne. Čez cca. 30 min so se pokazali znaki odmiranja in po dobrih dveh urah je v agoniji pomrlo vseh 10 čebel. V kasnejšem poskusu smo opravili histološki pregled rezin srednjega črevesa pri tretiranih delavkah. Rabdrij pri tretiranih delavkah je večinoma ohranjen in tanek. V skupini z nižjo koncentracijo HBA smo opazili eno ali več peritrofičnih membran v lumnu črevesa. V skupini z 0,25 % HBA je opazna tanjša peritrofična membrana in več vakuol v citoplazmi, tudi v bazalnih celicah. V skupini s propilen glikolom je bilo v lumnu opaziti debelejšje plasti membrani podobnim strukturam, ki je ločevala homogeno vsebino v lumnu. V celicah se je prav tako pojavljalo večje število vakuol. Rezultati kažejo, da je prišlo do različnih poškodb po zaužitju HBA v koncentracijah 0,25 % HBA in 50 % PG v primerjavi z najnižjo preiskovano koncentracijo (0,05 % HBA) in kontrolno, netretirano skupino čebel.



Slika 4: Srednje črevo pri 3 dni starih delavkah, tretiranih z različnimi koncentracijami HBA in propilen glikolom *per os*, H&E. **A** – 0.05 % HBA, 40x povečava; **B** – 0.25% HBA, 200x povečava; **C** – **Propilen glikol**, 200x povečava; **D** – **Sladkorna raztopina**, 100x povečava. **pm** – peritrofična membrana, **v** – vakuole, **puščica** – rabdorium, **ep** – epitelne celice.

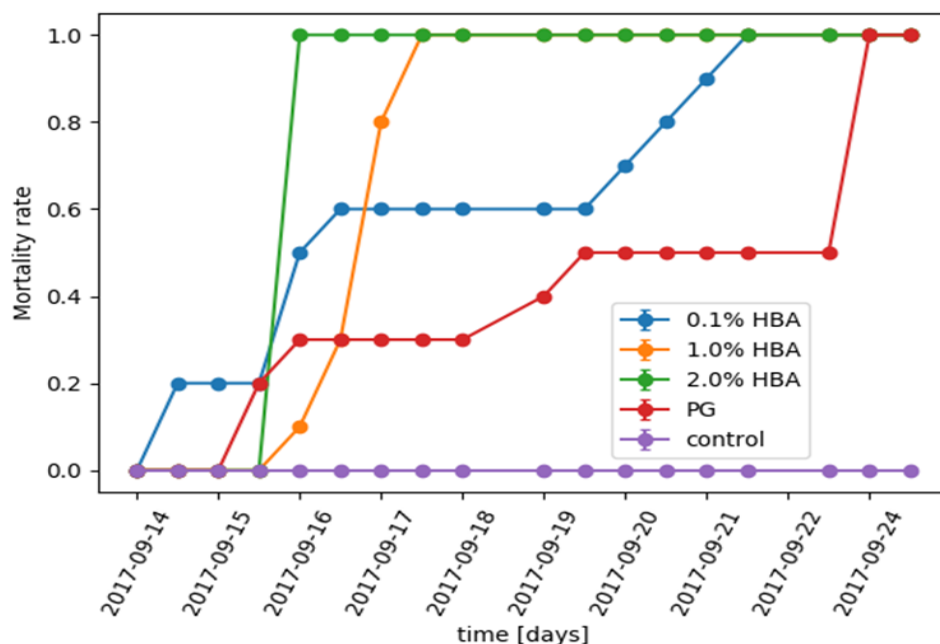
Poskus 3

Metode

V tem poskusu smo preizkušane raztopine (0,1, 1 in 2 % PG) s pipeto nanесли na zgornjo stran oprsja čebel. Tretirane čebele smo nato dali v kletke, te pa v inkubator. Smrtnost smo spremljali 10 dni.

Rezultati

V poskusu s topikalno aplikacijo na torakalni predel telesa čebel smo ugotovili večjo toksičnost pri 2 % koncentraciji HBA. Propilen glikol je imel manjši vpliv na odmiranje.



Slika 5. Odmiranje čebel po topikalni aplikaciji.

Zaključek DS2.4

Zaključek sklopa DS2.4 je presenetljiv: opazili smo toksičnost HBA (in PG!) za čebele. Prepričani smo, da učinek HBA na varoje ni sistemski, saj ob tem propadajo tudi čebele.

DS2.5 Vpliv hmeljevih ekstraktov na čistilno vedenje čebel

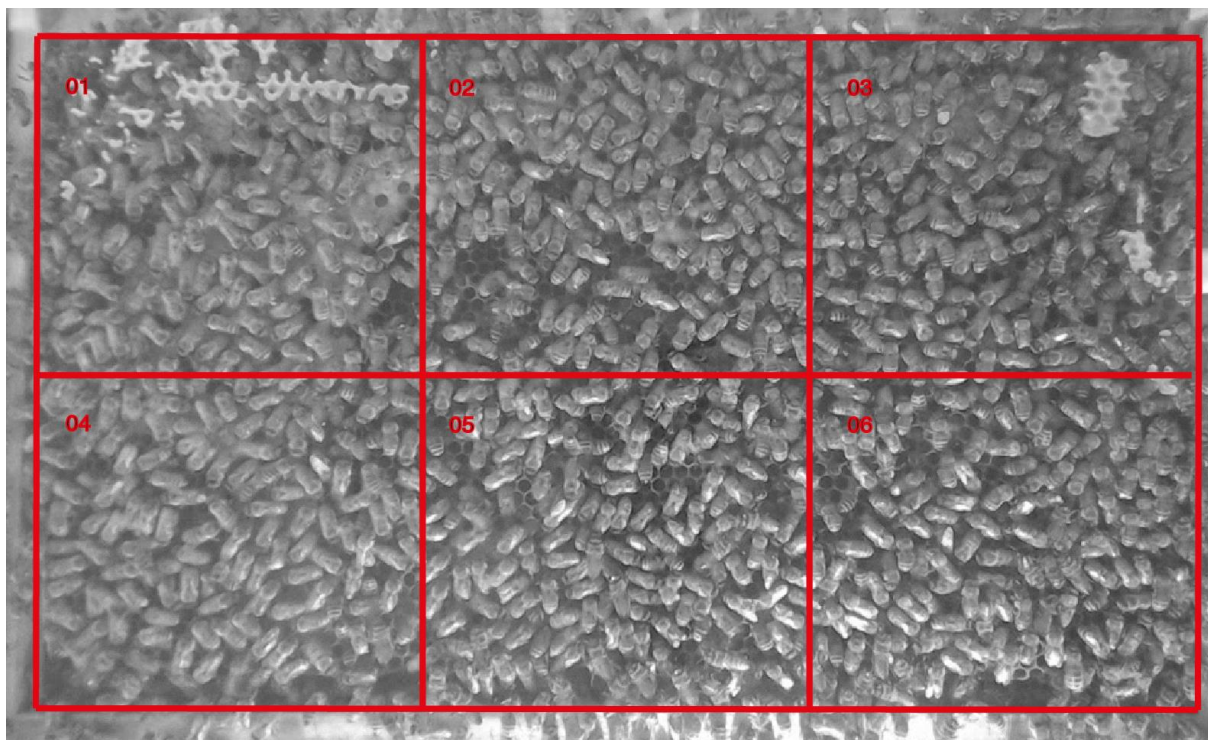
Preverjali smo, ali hmeljeve beta-kisline (HBA) povzročajo spremembo vedenja čebel v panju, odnosno če spodbujajo čistilno vedenje kot enega od možnih mehanizmov delovanja. Za ta namen smo izdelali dva opazovalna panja s štirimi sati, v katera smo namestili dve izenačeni družini s sestrskimi maticami. Po zaključku paše smo pričeli s krmljenjem z sladkorno raztopino v razmerju 1:1.

Metode

Eksperiment smo izvedli v letih 2017 in 2018 v začetku meseca avgusta. Skupaj smo opravili 24 snemalnih dni. Eksperimentalni čas smo razdelili v tri obdobja: pred vstavljanjem HBA (pre), obdobje med tretiranjem (med) ter obdobje po odstranitvi HBA, ko smo izvajali kontrolo učinkovitosti (kontrola) s preverjenim akaricidom (Checkmite). Obdobji pred in med tretiranjem smo spremljali s kamero.

V vsakem panju smo za snemanje izbrali drugi sat od spodaj, ki je izkazoval dovolj veliko pokritost s čebelami. Kameri smo postavili na stativ in točkovno osvetlili izbran sat. HBA smo v koncentratu (40%) nanесли na improviziran celulozni nosilec. Spremljali smo odpad varoj v vseh časovnih obdobjih.

Posnet sat smo razdelili na mrežo 2x3 in spremljali vedenje v zgornjem levem kvadrantu (Slika 6). Tu smo beležili vse komunikacijske plese. Čistilne plese (allo-grooming) smo zabeležili in preračunali v gostoto dogodkov na uro.



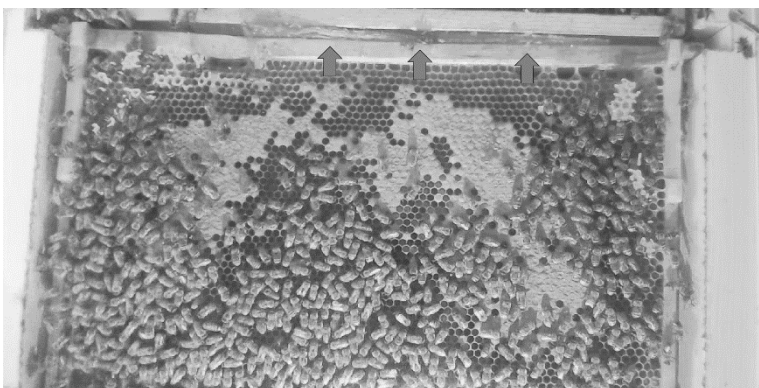
Slika 6. Slika s posnetka opazovanega sata v panju 2, razdeljenega na 6 enakih kvadrantov. Vedenje smo beležili v kvadrantu 01.

Vstavitve HBA se je pokazala kot moteča. To se jasno vidi na sliki 7 (spodaj), kjer se čebele po vstavitvi trakov (puščice) odmaknejo od nosilca. To lahko smatramo kot možno kontraindikacijo.

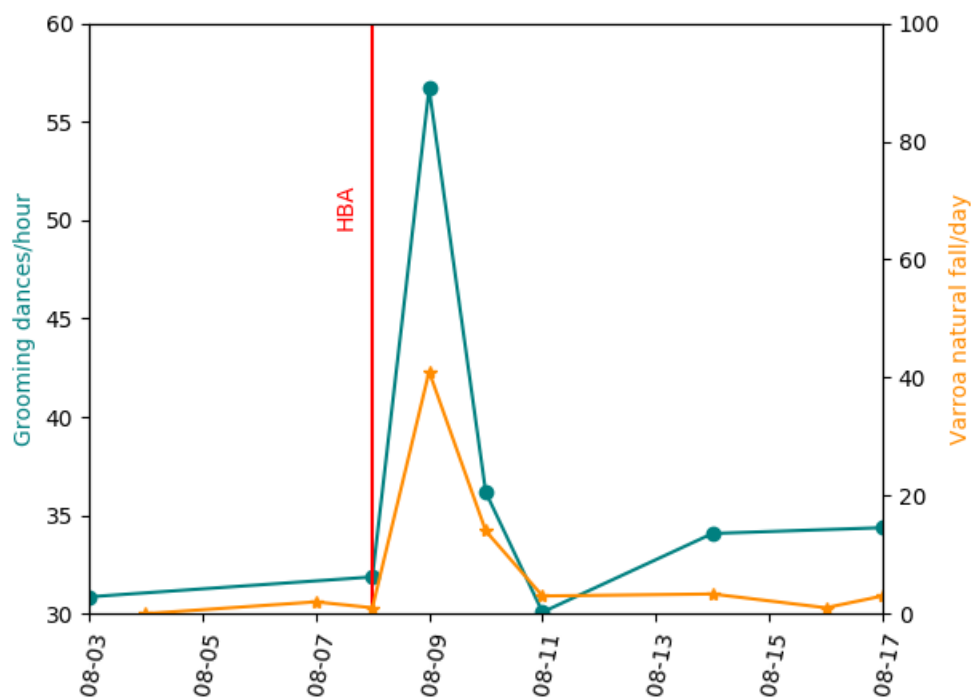
Rezultati

Naši rezultati kažejo, da je vstavitve HBA sprožila plese, ki spodbujajo čistilno vedenje. Na dan vstavitve HBA se je število čistilnih plesov skoraj podvojilo in strmo upadlo dan kasneje. Naravni odpad varoje je tesno koreliral z intenziviranjem čistilnega vedenja (Slika 8). V kontrolnem panju nismo opazili niti intenziviranja plesov niti odpada varoje.

Naravnega odpada varoj pred vstavitvijo HBA v testnem panju nismo beležili. Po vstavitvi se je situacija spremenila, maksimalni odpad je bil 41 varoj/dan, ki je zlagoma upadal in se ustalil pri treh varojah na dan. Po sedmih dneh smo trak s HBA odstranili in za štiri tedne vstavili Checkmite, ki je sprožil odpad v povprečju 1.75/dan. V kontrolnem panju je bil odpad v času poskusa med 0 in varoje na dan.



Slika 7. Distribucija osebkov čebelje družine na satu pred (zgoraj) in po (spodaj) vstavitvi nosilca s HBA (puščice). HBA moti čebele v družini, kar je možna kontraindikacija.



Slika 8: Prikaz odpada varoje v korelaciji s številom čistilnih plesov pred in po vstavitvi traku s HBA.

DS2.6 Pilotni poskus delovanja z izvedbo testiranja na družinah

Uporabljena metoda dela

Za izvedbo poskusa učinkovitosti hmeljevega ekstrakta na čebeljih družinah smo v test vključili 37 čebeljih družin kranjske čebele *Apis mellifera carnica* v prevoznem čebelnjaku. Lokacija je bila na nadmorski višini 500 m, na gozdni jasi in v oddaljenosti 500 m od drugih čebeljih družin da smo zmanjšali možnost reinvazij čebel od drugih sosednjih čebeljih družin. Lokacija, prevozna enota in čebelje družine v testu so razvidne s fotografije (Slika 9.)



Slika 9: Lokacija in čebelje družine, ki so bile vključene v test.

Test smo izvajali v letih 2017 do 2019. V testiranje smo v prvem letu vključili 28 čebeljih družin v letu 2018 in 2019 pa po 24. Vse čebelje družine so bile predhodno in v času izvajanja poskusa oskrbovane enako. Čebelje družine so bile nameščene v 22 satnih AŽ panjih, starost čebeljih matic v čebeljih družinah so bile od 2 do 3 leti. Čebelje družine smo pred vključitvijo v test ocenili na podlagi živalnosti, obsega zalege in obsega zaloge medu.

Testne vložke za pregled odpada varoj smo v čebelje družine nameščali v mesecu juniju. Vložki so bili namensko izdelani za 11-satni AŽ panj in je pokrival celotno dno čebeljega panja. Narejen je bil iz lesenega okvirja, nerjaveče mrežice na vrhu in plastičnega vložka, na katerem se je zbiral čebelji drobir v katerem so bile tudi odmrle varoje. Vstavljen testni vložek je viden na sliki 10.



Slika 10: Vstavljen testni vložek v testni čebelji družini.

Leto 2017

V letu 2017 smo pričeli s preizkusom učinkovitosti hmeljevega pripravka na čebeljih družinah. Da bi ugotovili napadenost čebeljih družin z varojami, smo najprej dva tedna spremljali naraven odpad varoj. V test je bilo vključenih 28 čebeljih družin v 11-satnih AŽ panjih. Testni vložki so bili v čebelje družine vstavljeni dne 26. 6. Odmrle varoe smo pregledovali v dnevih 3. 7. in 10. 7. Ta dan (10. 7.) smo v določene čebelje družine že vstavili 2 oz. 4 trakove 16 % hmeljevega pripravka. V 1/3 čebeljih družin nismo vstavljali trakov in smo jih uporabili za kontrolo. Trakove smo vstavljali pokončno med čebelje sate v plodišču čebelje družine. Način vstavljanja trakov s hmeljevim pripravkom v čebelje družine je prikazan na sliki (Slika 11).



Slika 12: Način vstavljanja trakov s hmeljevim pripravkom v čebelje družine.

Dva tedna po vstavitvi trakov v čebelje družine smo spremljali odpad varoj v družinah s stavljenim hmeljevim pripravkom in v družinah brez. Odpad smo pregledovali vizualno in zapisali število odpadlih varoj na teden.

Po dveh tednih (24. 7.) smo trakove zamenjali z novim. V družine, ki v tem času niso imele vstavljenega hmeljevega pripravka smo vstavili zdravilo ApiLife Var. Odpad varoj smo pregledovali po enem in dveh tednih. Dne 8. 8. smo vse družine tretirali še s sredstvom Varidol in naravni odpad ugotavljali dne 16. 8. in 25. 8.

Iz razlik med ugotovljenim odpadom varoj pred vstavitvijo HE po njem in po vstavitvi zdravila smo ugotavljali učinkovitost HE.

Leto 2018

Zaradi, v letu 2017 ugotovljene manjše učinkovitost 16 % hmeljevega pripravka (HP) smo v letu 2018 v testu uporabili 18 in 20 % HP. Pred vstavitvijo le teh v družine smo preverjali naraven odpad v obdobju od 18. 6. do 2. 7. in ugotovili, da je v povprečju s čebel odpadlo 0,72 varoj/dan. Dne 2. 7. smo vse čebelje družine naključno razdelili v 3 skupine in v prvi dve vstavili 18 oz. 20 % hmeljev ekstrakt (HE). Hmeljev ekstrakt smo v iste čebelje družine ponovno vstavljali dne 13. 7. Odpad varoj smo ugotavljali: 9. 7., 13. 7 in 21. 7. Dne 21. 7. smo v vse družine vstavili še zdravilo Tymovar in odpad varoj ugotavljali: 26. 7., 2. 8., 16. 8., in 24. 8. Dne 29. 8. smo v družine dodali tudi zdravilo Varidol in odpad varoj ugotavljali 31. 8. Slika testnega vložka po vstavitvi zdravila Tymovar je prikazana v nadaljevanju (Slika 13).



Slika 13: Fotografija testnega vložka na katerem so odpadle/mrtve varoje.

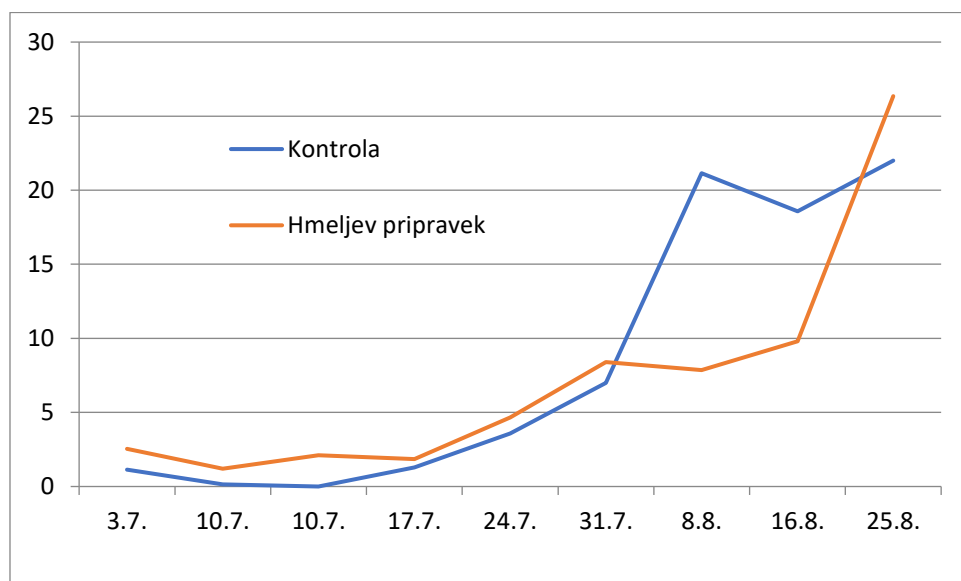
Leto 2019

V letu 2019 smo namesto celuloznih trakov za nosilce HE uporabili vileda krpe, ki smo jih narezali na primerno velike trakove. Naravni odpad smo spremljali v obdobju od 1. – 12. 7. Dne 12.7. 2018 smo vse čebelje družine naključno razdelili v 3 skupine in v njih vstavili trakove na katere smo nanесли različne sestavine. V prvo skupino čebeljih družin smo vstavili trakove na katerih je bil 20 % hmeljev ekstrakt (HE). V drugo skupino smo vstavili trakove na katere smo nanесли (le olje brez HE). Tretja skupina čebel je bila kontrola zato smo vanje vstavili prazne trakove. Trakove smo dne 17. 7. zamenjali z enakimi nanosi. Odpad varoj smo ugotavljali: 17. 7. in 26. 7. Dne 26.7. smo v vse družine vstavili zdravilo PolyVar in odpad varoj ugotavljali: 31. 7., 8. 8. in 17. 8.

Rezultati

2017

Odpad varoj smo ugotavljali od dne 3. 7. do 25. 8. v tedenskem intervalu. Odpad varoj po posameznih dnevih in obeh skupinah čebeljih družin je prikazan na spodnjem grafu (Graf 1).



Graf 1: Odpada varoj v čebeljih družinah v povezavi s preverjanjem učinkovitosti hmeljevega pripravka za zatiranje varoj

Povečan odpad varoj se je pojavil, ko smo v družine vstavili zdravilo ApiLife Var in kasneje še Varidol. 16 % hmeljev ekstrakt se ni izkazal za učinkovitega saj je bil odpad varoj v času vstavljenega HE skoraj enak kot v kontrolnih panjih, v katerih ni bilo stavljenega HE.

2018

Med poskusom smo izgubili tri čebelje družine. Pri dveh sta se izgubili čebelji matici, ena družina je prelegla. Dobljene podatke pri teh družinah v obdelavi nismo upoštevali.

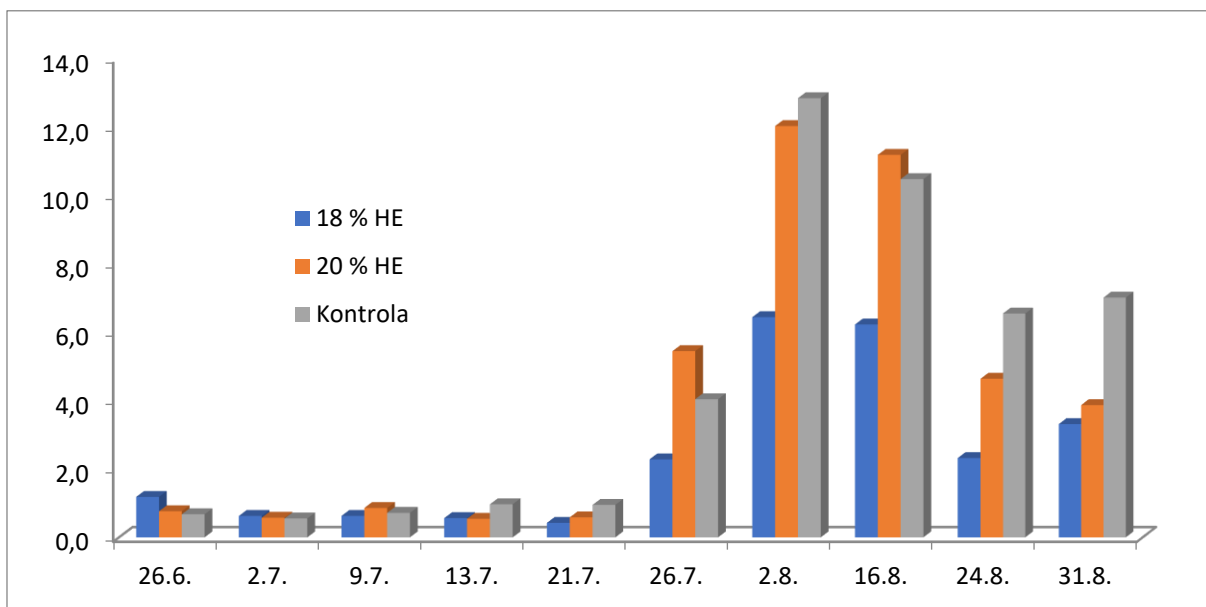
Povprečni podatki o ugotovljenem odpadu varoj so podani v preglednici. Odpad varoj smo spremljali ločeno po treh predhodno določenih skupinah čebeljih družin.

- 7 čebeljih družin v katere smo dodali 18 % hmeljev ekstrakt,
- 6 čebeljih družin v katere smo dodali 20 % hmeljev ekstrakt,
- 7 čebeljih družin, ki so služile kot kontrola.

Naraven odpad varoj je bil v tem letu 0,72 varoj/dan. Povprečen odpad varoj na dan, po posamezni skupini čebeljih družin je razviden s spodnje preglednice (Preglednica 4.) in grafa (Graf 2).

Preglednica 4: Ugotovljen dnevni odpad varoj v posameznem obdobju v treh skupinah čebel

	26.6.	2.7.	9.7.	13.7.	21.7.	26.7.	2.8.	16.8.	24.8.	31.8.
18 % HE	1,2	0,6	0,6	0,6	0,4	2,3	6,4	6,2	2,3	3,3
20 % HE	0,8	0,6	0,9	0,5	0,6	5,4	12,0	11,2	4,6	3,9
Kontrola	0,7	0,6	0,7	1,0	0,9	4,0	12,8	10,5	6,5	7,0



Graf 2: Grafični prikaz dnevnega odpada varoj, v posamezni skupini čebeljih družin, v posameznem obdobju.

Iz poskusa smo ugotovili, da je imel tako 18 % HE kot tudi 20 % HE zelo nizko učinkovitost. Učinkovitost je bila nižja od 25 %. To je razvidno tudi iz grafa, ki lepo prikazuje, da je povečan odpad varoj sledil vstavitvi zdravila Tymovar v čebelje družine. Razloga za manjšo učinkovitost nismo ugotovili ena od možnosti je, da HE, ki je ob vstavitvi v čebelje družine nanosen na celulozni nosilec, za čebele zelo moteč in ga zato pričnejo gristi in odstranjevati iz panja. Trajanje delovanja HE se tako

močno zmanjša kar ima lahko za posledico nižjo učinkovitost. Ostanki celuloznega traku na testnem vložku, so razvidni s spodnje fotografije (Slika 14).



Slika 14: Ostanki celuloznih trakov na testnem vložku čebelnega panja po 1 tednu.

2019

V letu 2019 smo imeli v testu z varojami zelo napadene čebelje družine. Ugotovljen naravni odpad je bil 14,8 varoj/dan. Iz poskusa smo po treh tednih izločili eno čebeljo družino, ker je družina prelegla in se mlada matica ni sprašila. Dobljene podatke pri teh družinah v obdelavi nismo upoštevali.

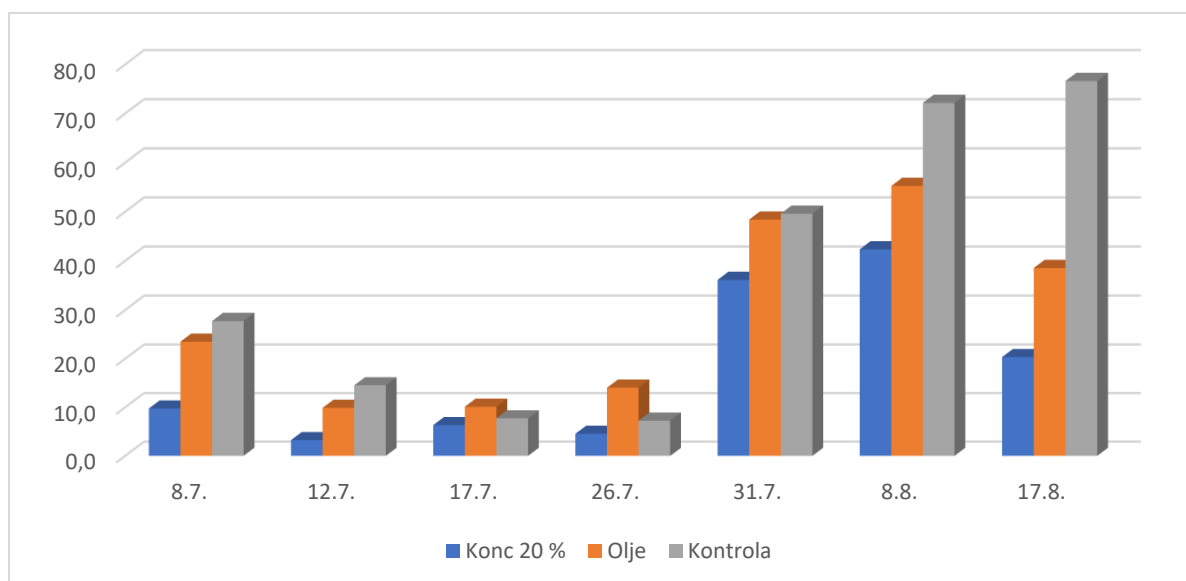
Odpad varoj smo spremljali ločeno po treh predhodno določenih skupinah čebeljih družin.

- 8 čebeljih družin v katere smo dodali 20 % hmeljev ekstrakt,
- 7 čebeljih družin v katere smo dodali le raztopino eteričnega olja,
- 8 čebeljih družin, ki so služile kot kontrola.

Povprečen odpad varoj na dan v letu 2019, po posamezni skupini čebeljih družin je razviden s spodnje preglednice in grafa.

Preglednica 5: Ugotovljen dnevni odpad varoj v posameznem obdobju v treh skupinah čebel.

št.	8.7.	12.7.	17.7.	26.7.	31.7.	8.8.	17.8.
Konc HE 20 %	9,8	3,3	6,3	4,6	36,1	42,3	20,3
Olje, brez HE	23,5	9,9	10,1	14,0	48,4	55,3	38,5
Kontrola	27,8	14,5	7,7	7,3	49,6	72,2	76,6



Graf 3: Grafični prikaz dnevnega odpada varoj, v posamezni skupini čebeljih družin, v posameznem obdobju.

Iz poskusa smo ugotovili, da je imel tako 20 % HE kot tudi olje zelo nizko učinkovitost. Učinkovitost je bila nižja od 25 %. To je razvidno tudi iz grafa, ki lepo prikazuje, da je povečan odpad varoj sledil vstavitvi zdravila PolyVar dne 26. 7. 2019 v čebelje družine. Razloga za manjšo učinkovitost nismo ugotovili.

Analiza medu iz panjev v katerem je bil uporabljen hmeljev pripravek

Metode dela:

Iz panja v katerem se je v času nabiranja medu uporabljal dvakratni odmerek HP smo vzorčili med in ga analizirali. Opravili smo senzorično analizo, električno prevodnost in vsebnost prostih kislin.

Vsebnost vode

Merimo z metodo, ki je harmonizirana s strani mednarodne komisije za med (International honey commission) in je opisana v Harmoniziranih metodah Mednarodne komisije za med (Bogdanov in sod., 1997). Medovi, ki jim določamo vsebnost vode, morajo biti v tekočem agregatnem stanju. Pred merjenjem medove premešamo, nato na prizmo refraktometra s plastično palčko nanese tanko plast medu, na kar smo na skali refraktometra odčitamo vsebnost vode v %. Upoštevamo tudi temperaturno korekcijsko vrednost. Vsako meritev smo opravimo dvakrat in rezultat podali kot povprečno vrednost dveh meritev.

Električna prevodnost

Osnova za določanje električne prevodnosti 20-odstotne (m/m) vodne raztopine medu pri 20 °C s konduktometrom je merjenje specifične električne upornosti, katere obratna vrednost je električna prevodnost. Rezultati so izraženi v milisiemensih na centimeter (mS/cm).

Merimo z metodo, ki je harmonizirana s strani mednarodne komisije za med (International honey commission) in je opisana v Harmoniziranih metodah Mednarodne komisije za med (Bogdanov, 2002). Na osnovi pridobljene meritve o vsebnosti vode v medu, določimo 20 % suho snov medu. Odtehtamo količino medu ekvivalentno 20,0 g brezvodnega medu in jo raztopimo v 100 ml destilirane vode. Prevodnost smo odčitamo tako, da v 20 % raztopino medu potopimo elektrodo konduktometra in odčitamo prevodnost raztopine v mili Siemensih na cm (mS/cm).

Proste kisline

Proste kisline v medu ugotavljamo s titracijo z raztopino NaOH do ekvivalentne točke pH 8,3.

Odtehtamo 10 g vzorca v čašo in ga raztopimo v 75 ml ohlajene vode brez ogljikovega dioksida. Po kalibraciji pH metra potopimo elektrode pH metra v raztopino in zabeležimo začetno vrednost pH. Titriramo z 0,1 M NaOH do pH 8,3. Titracijo zaključimo v roku 2 minut. Vsako meritev opravimo dvakrat in rezultat podamo kot povprečno vrednost dveh meritev.

Senzorične analize

Princip: S človeškimi čutili se ocenijo barva, okus, vonj ter aroma medu.

Med, ki se daje v promet mora zadostiti 6. členu Pravilnika o medu, ki pravi, da mora biti, brez neznanih primesi. Razen medu iz drugega odstavka 3. člena tega pravilnika, med ne sme imeti tujega okusa ali vonja, ne sme začeti fermentirati, njegova stopnja kislosti ne sme biti umetno spremenjena. Pri senzorični analizi s človeškimi čutili preverimo ali ima med za med tipičen vonj, aromo in okus. Vsaj trije preskuševalci medu bodo ugotavljali, ali lahko v medu zaznamo tuj vonj, aromo in okus.

Rezultati

Vzorec medu pridobljen v juliju 2017 iz čebelje družine, v kateri se je uporabljal HP ustreza parametrom kakovosti, ki jih predvideva Pravilnik o medu (Ur. l. RS 4/11, 9/15). Med je imel 16,3 % vode, električna prevodnost je bila, 1,27 mS/cm, pH 4,37, prostih kislin 45,5 meq/kg, diastazno število 51 vsebnost HMF 5,6 mg/kg, fruktoze 35,6 %, glukoze 26,2 %, vsota fruktoze in glukoze 61,8 %, saharoze nismo zaznali. Pri senzorični analizi nismo zaznali za med neznanih okusa in arome, vonj pa je bil zelo intenziven, zato je potrebno preveriti tudi med iztočen iz teh družin v spomladanskem času.

Razprava, zaključki in priporočila naročniku iz DS2.6

V poskusu smo ugotovili, da so za nanos HE vileda krpe bolj primerne od celuloznih trakov. Celulozne trakove čebele grizejo in izvlečejo iz panjev. Vileda krpe so se v tej smeri izkazale za bolj obstojne, saj jih čebele ne morejo gristi tako hitro kot celulozne. Glede učinkovitosti HE smo ugotovili, da 16 % kot tudi 18 in 20 % nimajo dovolj veliko učinkovitost za zatiranje varoj, v pozno poletnem in jesenskem času. Učinkovitost je bila manjša od 25 %. Prednost HE pa je v tem, da se ne nalaga v medu in je zato mogoče z njim zatirati čebele tudi pred točenjem medu.

DS2.7 Izdelava prototipa farmacevtskega pripravka na osnovi ekstrakta beta-kislin in ocena vpliva staranja na stabilnost

Na osnovi rezultatov iz DS2.1 do DS2.6 smo izdelali prototip pripravka in na njem izvedli potrebne teste stabilnosti v laboratorijskem okolju. Pri pripravi smo se zgledovali po v ZDA komercialno dostopnem in registriranem pripravku HopGuard®.

Metode dela

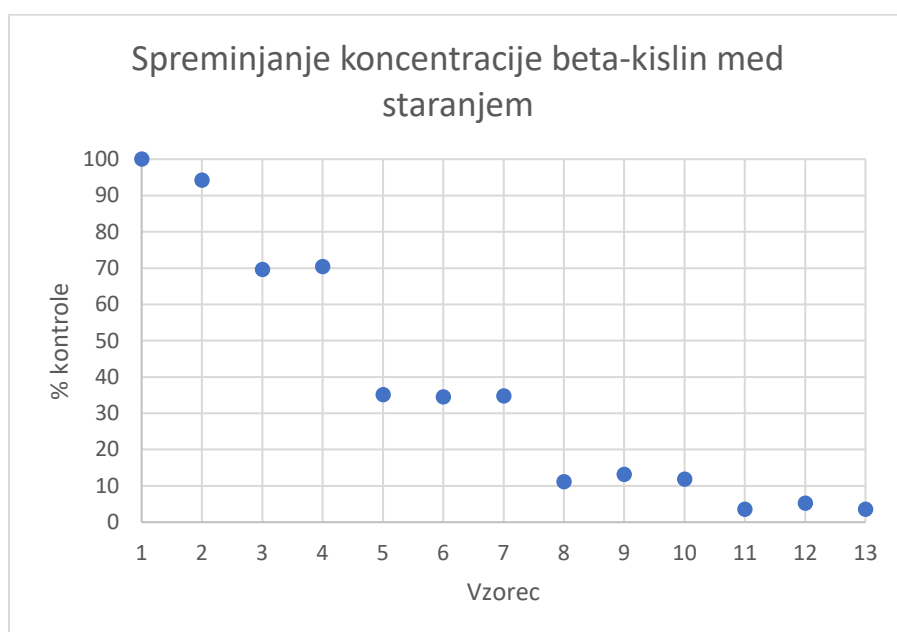
Pripravilo smo 40% (m/m) raztopino beta-ekstrakta, ki smo ga razredčili z živilskim propilen glikolom in ga nanесли na celulozne filter papirje, kot nosilce iz naravnega materiala. Nosilce z nanešenim ekstraktom smo dali v komore s kontrolirano atmosfero (40°C in 70% vlažnost) in jih v njej pustili različno dolg čas 1, 3, 6 in 10 dni. Na ta način smo v najvišji možni meri simulirali pogoje okolja v panju. Po preteku hranjenja smo določili vsebnost preostalih beta-kislin s standardizirano metodo po Analytici-EBC 7.7.

Rezultati

V preglednici 6 spodaj so podani rezultati vsebnosti skupnih beta-kislin v vzorcih, ki so zaradi lažje predstave predstavljeni tudi na grafu 4.

Preglednica 6: Delež beta-kislin glede na kontrolo in njihov padec v %

Vzorec	Čas staranja	Delež beta-kislin glede na kontrolo (%)	Padec beta-kislin (%)
1	0	100	0
2	1	94,2	5,8
3	1	69,6	30,4
4	1	70,4	29,6
5	3	35,1	64,9
6	3	34,5	65,5
7	3	34,7	65,3
8	6	11,1	88,9
9	6	13,2	86,8
10	6	11,8	88,2
11	10	3,6	96,4
12	10	5,2	94,8
13	10	3,6	96,4



Graf 4: Spreminjanje koncentracije beta-kislin med staranjem.

Iz zgoraj prikazanih rezultatov lahko vidimo, da vsebnost beta-kislin s časom zelo intenzivno pada. Že po 3 dneh njihova vsebnost pade za 65 %, po 6 dneh pa že za približno 88%. Po 10 dneh beta-kislin na nosilcih praktično ni več.

Zaključek DS2.7

Z ozirom na poznano oksidacijsko nestabilnost beta-kislin, njihovo hitro padanje ob izpostavitvi kisiku pri povišani temperaturi ni presenečenje. Istočasno pa se je potrebno tudi zavedati, da bi moral pripravek delovati takoj po vstavitvi v panj, kamor bi ga tudi po predvidevanjih morali vstaviti vsaj dvakrat zapored v razmiku 1 tedna. Iz tega zornega kota bi morala biti učinkovitost dosežena hitro po vstavitvi in dejstvo, da po 3 dneh pride do signifikantnega padca beta-kislin ne bi smelo biti ovira pri uporabi.

DS3: Nabor primernih sort hmelja, gojenih v Sloveniji, za uporabo v odvisnosti od aktivnih snovi

Delo v tem sklopu je glede na različna podpodročja razdeljeno v 3 delovne podsklope označene od DS3.1 do DS3.3.

DS3.1 in DS3.2 Določanje količine alfa- in beta-kislin ter količine eteričnega olja v vzorcih hmelja

Iz zbirke vzorcev hmelja pridelanega v letih 2017 in 2018, v kolekcijskem nasadu IHPS, smo odbrali različne genotipe, v katerih smo določili vsebnosti alfa- in beta-kislin in količino ter sestavo eteričnega olja.

Metode dela

V času tehnološke zrelosti konec avgusta oz. v začetku septembra smo v kolekcijskem nasadu IHPS leta 2017 izbrali 22, v letu 2018 pa 31 vzorcev hmelja različnih genotipov. Križanci so bili izbrani na podlagi podatkov, zbranih v preteklih letih ali na osnovi pedigreeja. Iz vsake posamezne rastline smo nabrali povprečni vzorec, kar pomeni enak delež storžkov rastočih na zgornji, srednji in spodnji tretjini rastline. Vse vzorce storžkov smo posušili na 60 °C do vsebnosti vlage okoli 10 %, kar je normalna vlaga zračno suhega hmelja. Takoj po sušenju so bili vzorci v laboratoriju analizirani na vsebnost preostale vlage, alfa- in beta-kislin in vsebnost eteričnega olja.

Vsebnost alfa-in beta-kislin ter ksantohumola smo določali v laboratoriju IHPS po standardizirani metodi Analytica-EBC, 7.7 (EBC, 1998). Tudi vsebnost eteričnega olja smo določali v laboratoriju IHPS po metodi Analytica-EBC, 7.10 (EBC, 2005) z destilacijo z vodno paro. Vsem vzorcem smo določili tudi vlago, da smo lahko rezultate podali na suho snov.

Rezultati

V preglednici 7 spodaj podajamo pregled rezultatov pridobljenih v obeh letih 2017 in 2018.

Preglednica 7: Vsebnosti eteričnega olja in alfa-, beta-kislin v posameznih izbranih genotipih hmelja

genotip	eterično olje [mL/100g]	Kohumulon [%]	n+ad humulon [%]	Kolupulon [%]	n+ad lupulon [%]	alfa-kisline [%]	beta-kisline [%]	co-alfa v alfa [%]	co-beta v beta [%]	alfa/beta	ksantohumulon [%]
226/46	0,91	0,29	3,76	1,34	0,98	4,05	2,32	7,20	57,64	1,74	0,13
181/180	2,21	1,54	17,73	2,38	2,57	19,27	4,95	7,99	48,13	3,89	0,20
249/20	2,35	5,75	21,11	2,54	1,15	26,86	3,69	21,39	68,88	7,29	0,32
206/166	0,21	0,15	1,54	2,11	2,76	1,69	4,86	8,80	43,33	0,35	0,23
276/64	0,61	1,77	23,51	1,62	1,98	25,27	3,60	6,99	45,04	7,02	0,35
249/85	0,99	1,75	23,37	1,56	1,79	25,11	3,35	6,96	46,51	7,50	0,37
276/84	1,35	2,18	28,70	1,41	2,12	30,89	3,54	7,07	39,92	8,73	0,35
236/204	1,11	2,00	26,09	1,24	1,90	28,09	3,14	7,11	39,46	8,94	0,28
185/216	1,35	0,88	17,70	1,98	2,46	18,58	4,44	4,75	44,65	4,18	0,57
181/212	1,66	1,74	22,91	2,07	2,91	24,65	4,98	7,05	41,52	4,95	0,40
288/169	0,45	1,66	7,39	2,59	0,92	9,05	3,50	18,3	73,88	2,58	0,24
209/181	0,94	1,25	3,70	0,90	0,65	4,95	1,55	25,29	58,11	3,19	0,22
226/59	0,62	0,56	1,51	1,23	1,43	2,07	2,65	26,97	46,23	0,78	0,16
226/66	0,33	0,12	0,30	1,35	1,18	0,41	2,53	28,28	53,40	0,16	0,11

71/224	0,85	2,80	5,21	4,02	2,48	8,01	6,50	34,93	61,86	1,23	0,41
222/165	0,56	1,07	4,03	0,94	1,30	5,10	2,24	20,99	41,98	2,28	0,34
177/14	2,10	1,94	8,67	1,79	2,25	10,61	4,04	18,3	44,32	2,62	0,31
74/142	0,44	1,39	4,05	3,05	3,75	5,44	6,80	25,48	44,81	0,80	0,32
236/149	1,07	2,06	6,91	2,07	2,44	8,97	4,51	22,95	45,85	1,99	0,47
70/61	0,86	1,53	2,63	5,48	2,95	4,16	8,43	36,72	65,05	0,49	0,51
50/84	1,48	2,92	10,68	3,36	3,57	13,59	6,93	21,45	48,43	1,96	0,34
226/121	0,41	0,13	0,38	1,51	1,76	0,51	3,26	24,61	46,2	0,16	0,12
177/175	1,90	1,92	8,15	1,76	2,40	10,07	4,15	19,10	42,34	2,42	0,62
286/110	1,18	2,36	6,18	1,90	1,67	8,53	3,57	27,64	53,24	2,39	0,48
90/220	1,84	2,70	6,85	2,54	2,29	9,55	4,83	28,31	52,52	1,98	0,31
276/10	2,00	2,34	8,41	2,67	2,66	10,75	5,33	21,78	50,09	2,02	0,49
108/157	1,94	3,24	11,77	4,54	6,60	15,01	11,14	21,56	40,77	1,35	0,52
270/127	1,12	1,92	4,91	2,93	2,99	6,82	5,92	28,09	49,42	1,15	0,53
276/69	2,51	2,45	12,77	1,40	2,19	15,22	3,59	16,12	38,93	4,25	0,37
173/4	2,52	3,18	9,97	3,52	2,50	13,15	6,02	24,17	58,52	2,18	0,41
167/107	2,15	2,65	11,92	2,58	2,85	14,57	5,43	18,20	47,47	2,69	0,55

Iz Preglednice 7 je razvidno, da se vsebnosti beta-kislin gibljejo med 1,55 in 11,14 %. V 9 primerih so te vsebnosti višje od 5 %. Še posebej izstopata genotipa 108/157 (Dana x 21426) in 70/61 (Aurora x 63012), ki vsebujeta kar 11,14 oziroma 8,43 % beta-kislin. Pri prvem smo vsebnost 7,56 % določili že pred leti medtem ko je drugi dosegel vrednost kar 10,57 in 9,78 v dveh zaporednih letih; s to raziskavo smo njuno vlogo dodatno potrdili. Za oba je značilno, da imata nizko razmerje alfa/beta-kislin, še posebej to velja za slednjega, kjer je to razmerje komaj 0,49 (0,50 v preteklih letih), kar pomeni, da je njegova vrednost predvsem v količini beta-kislin. Pri križancu 70/61 je tudi količina eteričnega olja samo 0,86 ml/100g (0,88 ml/100 g v preteklem letu) in vsebnost alfa-kislin samo 4,16 % (5,25 in 5,01 % v preteklih letih). Ima pa ta križanec presenetljivo visoko vsebnost ksantohumola (0,51 %), leta 2010 je dosegel tudi 0,60 %. Glede na izmerjene parametre ta genotip verjetno ni pivovarsko perspektiven. Pri genotipu 108/157 je zanimivo, da ima poleg visoke vsebnosti beta-kislin tudi visoko vsebnost alfa-kislin (15,01 %; v preteklih letih od 11,24 – 13,60 %) in eteričnega olja (1,94 ml/100g; v preteklih letih od 2,31 – 2,79 ml/100g). S temi karakteristikami bi lahko bil zanimiv tudi za pivovarsko industrijo.

Vsebnost beta-kislin med 6 in 7 % imajo trije genotipi, in sicer 71/224 (Merkur x SH2), 50/84 (279/104 x 01J 9/5) in 173/4 (25/266 x 305/28). Med njimi je zanimiv predvsem 173/4, ki ima poleg visoke vsebnosti beta-kislin tudi relativno visoko vsebnost alfa-kislin (13,15 %; v preteklih letih od 11,70 – 16,10) in predvsem eteričnega olja (2,52 ml/100g; v preteklih letih celo od 3,55 – 4,05 ml/100g), medtem ko je za genotip 71/224 značilno, da ima primerljivo vsebnost alfa-kislin (8,01%; v preteklih letih ta niha od 5,90 – 13,49 %) in nizko vsebnost eteričnega olja (0,85 ml/100g; v preteklih letih 1,06 ml/100g).

Med genotipi so tudi posamezni, ki imajo zelo nizko vsebnost eteričnega olja in imajo z vidika pomembnosti k prispevku hmeljne arome v pivovarski uporabi nizko verjetnost uporabe. Takšni genotipi so 206/166 (0,21 ml/100g; 35/182 x 24/265), 276/64 (0,61 ml/100g; Styrian Eagle x 25/234), 288/169 (0,45 ml/100g; 66/2 x 284/113), 226/66 (0,33 ml/100g in v letu 2011 0,82 ml/100g; Savinjski golding x 272/93), 222/165 (0,56 ml/100g; Nugget x 55/252) in 226/121 (0,41 ml/100g oz. ml/100g v 2011; Savinjski golding x 272/93) (Preglednica 7). Za genotipa 206/166 in 226/59 je zelo zanimivo, da

sta imela tudi zelo nizke vsebnosti alfa-kislin (1,69 in 0,51 %). Tudi vsebnosti ksantohumola pri njiju so bile komaj 0,23 in 0,12 %.

Genotipi, kjer je bilo razmerje alfa/beta-kisline najnižje (226/59, 226/66, 226/121), torej v prid beta-kislinam, žal niso perspektivni za gojenje z namenom pridelave beta-kislin, ker je pri njih tudi absolutna vsebnost beta-kislin razmeroma nizka. Navedeni križanci spadajo v isto družino križanja, in sicer so vsi potomci Savinjskega goldinga in moške rastline 272/93. Savinjski golding je poznan po fini aromi in nizkem deležu tako alfa- kot beta-kislin, omenjeno lastnost je sorta v tem primeru križanja zelo dobro prenesla na potomce.

Rdeče so obarvani genotipi, ki so glede na absolutno vsebnost beta-kislin ali relativno nizko razmerje alfa/beta potencialno zanimivi za gojenje z namenom pridelave hmelja s poudarkom na beta-kislinah.

ZAKLJUČEK DS3.1 – 3.2

Z vidika pridelave hmelja z namenom pridobivanja beta-kislin in s tem diverzifikacije uporabe hmelja tudi v druge panoge kot je pivovarska, je smiselno poiskati primerne genotipe, ki bi bili najustreznejši. V opisani raziskavi smo ugotovili, da je v kolekciji IHPS kar nekaj potencialnih kandidatov, ki bi lahko bili primerni, kot so 108/57, 74/142, 236/149. Vsekakor pa je analiza pokazala veliko heterogenost izbranih križancev hmelja, saj so njihove vrednosti določenih parametrov v velikem razponu med minimalno in maksimalno določeno vrednostjo.

Iz takšnih križancev hmelja bi lahko pridelali ekstrakt obogaten z beta-kislinami, ki bi v nadaljevanju lahko služil za izdelavo pripravkov za zatiranje varoje pri čebelah, saj bi kot tak predstavljal ekološko varianto, brez škodljivih posledic. Preliminarni rezultati poskusov (DeGrandi-Hoffman in sod., 2012) kažejo na potencial, ki ga podpira tudi interes čebelarjev.

DS3.3 Določanje količine alfa- in beta-kislin in vsebine ter sestave eteričnega olja v ekstraktih hmelja

Na tržišču smo uspeli pridobiti 9 različnih ekstraktov hmelja. Od tega pet najpogostejših na tržišču, pridobljenih z ekstrakcijo s superkritičnim CO₂, enega pridobljenega z etanolno ekstrakcijo in še nadaljnje tri, ki so prečiščene variante CO₂ ekstraktov. Dvema izmed njih so odvzete alfa-kisline in sta obogatena z beta-kislinami, enemu pa so odvzete beta-kisline in je obogaten z alfa-kislinami. (Preglednica 7)

Metode dela

Vsem vzorcem smo s standardizirano analizo metodologijo z uporabo metode po Analytici-EBC, 7.7 s HPLC določili vsebnost posameznih in skupnih alfa- in beta-kislin ter razmerij med njimi. V nadaljevanju smo v ekstraktih po metodi Analytica-EBC 7.10, s parno destilacijo določili tudi vsebnost eteričnega olja.

Iz primerjave rezultatov v Preglednici 8 lahko razberemo, da klasični ekstrakti, pridobljeni s CO₂, različnih proizvajalcev vsebujejo primerljive količine beta-kislin okoli 25%. Ravno tako je za vse te ekstrakte značilna primerljiva vsebnost eteričnega olja med 4 in 8 ml/100g. V deležu beta-kislin je odstopal etanolni ekstrakt hmelja, ki je imel med klasičnimi ekstrakti najmanjšo vsebnost beta-kislin komaj 7,5%. Z ozirom na predvidevanja smo bili presenečeni nad nizko vsebnostjo beta-kislin v 9 vzorcu, ki je sicer očiščen alfa-kislin, vendar očitno ne na račun povečanja vsebnosti beta-kislin, temveč večje redčitve s topilom. Poleg tega pa ta ekstrakt vsebuje tudi veliko količino eteričnega olja. Za naš namen, kjer želimo najti ekstrakt s čim višjo vsebnostjo beta-kislin, se je kot popolnoma neprimeren pokazal vzorec 8 (α -ekstrakt), ki je vseboval beta-kisline samo v sledovih pod 0,5%.

Preglednica 8: Vsebnost alfa- in beta-kislin ter eteričnih olj v posameznih vzorcih ekstraktov

ekstrakt način ekstrakcije	1 CO ₂	2 CO ₂	3 CO ₂	4 CO ₂	5 CO ₂	6 EtOH	7 BHA	8 α -ext.	9 beta- bio
Kohumulon (%)	12,80	13,03	11,03	13,85	16,78	12,58	<0,5	8,34	<0,5
n+adhumulon (%)	36,12	29,38	31,47	30,62	39,38	16,49	<0,5	11,87	<0,5
Kolupulon (%)	11,63	14,16	13,92	13,42	8,32	4,32	20,97	<0,5	13,89
n+adlupulon (%)	13,49	11,85	13,63	10,97	6,22	3,20	17,94	<0,5	10,26
Alfa-kisline (%)	48,93	42,49	42,37	44,47	56,16	29,07	<0,5	20,21	<0,5
beta-kisline (%)	25,12	26,01	27,45	24,38	14,54	7,52	38,90	<0,5	24,15
Kohumulon v alfa- kislinah (%)	26,2	30,7	26,0	31,1	29,9	43,3	/	41,3	/
Kolupulon v beta- kislinah (%)	51,0	50,1	40,2	56,8	57,2	42,6	53,9	/	57,5
alfa/beta	1,95	1,63	1,54	1,82	3,86	3,87	/	/	/
Vsebnost eteričnega olja v hmelju (ml/100g)	4,5	3,8	8,3	6,2	7,6	6,9	<0,3	<0,3	16,3

Zaključek DS3.3

Optimalen ekstrakt za naš namen se je pokazal ekstrakt 7 (BHA), ki je vseboval kar 38,9% beta-kislin. Pri njemu so bile tudi alfa-kisline in eterično olje vsebovano samo v sledovih. Takšen ekstrakt bi lahko bil primerno izhodišče za uporabo pri zatiranju varoje in nam je kot tak služil tudi kot izhodna snov za pripravo razredčenih vzorcev za testiranja v drugih delovnih sklopih.

DS4: Proučitev možnosti izdelovanja pripravkov na osnovi hmelja v Sloveniji

V času izvajanja projekta smo uspeli navezati stike s podjetjem Škrli d.o.o., ki ima v lasti opremo za ekstrakcijo rastlinskih tkiv s superkritično ekstrakcijo. V svojem obratu so tudi že poskusno izvedli ekstrakcijo dveh različnih slovenskih standardnih hmeljnih sort (Celeia in Aurora), pod različnimi pogoji ekstrakcije (tlak, temperatura), ki bistveno vplivajo na fizikalne lastnosti topila. Na ta način smo pridobili 6 različnih ekstraktov, v katerih smo določili vsebnost alfa- in beta-kislin z uporabo metode po Analytica-EBC, 7.7. V nadaljevanju smo v ekstraktih po metodi Analytica-EBC 7.10, s parno destilacijo določili tudi vsebnost eteričnega olja. Pridobljene rezultate podajamo v preglednici 9 spodaj.

Preglednica 9: Vsebnost alfa- in beta-kislin ter eteričnih olj v posameznih vzorcih ekstraktov

ekstrakt način ekstrakcije	AU300 bar/40°C/ 87bar	AU150 bar/40°/8 7bar	CEL150 bar/30°/8 7bar	AU300 bar/40°/5 2bar	AU150 bar/40°C/ 52bar	AU150 bar/300b ar/52bar
Kohumulon (%)	5,84	18,98	6,17	9,98	18,56	4,24
n+adhumulon (%)	23,20	61,02	22,33	36,79	49,27	11,91
Kolupulon (%)	2,29	17,68	17,80	2,00	21,52	12,01
n+adlupulon (%)	2,01	17,18	15,62	1,08	19,01	8,45

Alfa-kisline (%)	29,04	79,99	28,50	46,77	67,84	16,15
beta-kisline (%)	4,29	34,86	33,42	3,08	40,53	20,45
Kohumulon v alfa-kislinah (%)	20,11	23,72	21,65	21,33	27,37	26,26
Kolupulon v beta-kislinah (%)	53,29	50,72	53,26	64,86	53,09	58,70
alfa/beta	6,76	2,29	0,85	15,19	1,53	0,79
ksantohumol	0,29	0,08	0,09	0,08	0,00	0,00
Vsebnost eteričnega olja v ekstraktu (ml/100g)	/	0,07	1,11	/	2,19	10,93

Zaključek DS4

Iz podatkov v preglednici 8 lahko razberemo, da je sestava ekstraktov zelo različna, glede na ekstrakcijske pogoje, kar smo sicer tudi pričakovali. Oprema v podjetju Škrlić d.o.o. je tako fleksibilna, da omogoča pridobivanje različnih ekstraktov, v odvisnosti od zasnove tehnološkega postopka. Istočasno je njihova kapaciteta dovolj velika, da bi lahko zadostila pridobivanju ekstrakta za slovenske razmere, v kolikor bi se tudi v praksi pokazala takšna potreba. Na ta način bi lahko imeli poleg pridelave hmelja, njegovega peletiranja in kasneje tudi ekstrakcije zaprt krog od surovine do končnega izdelka v slovenskem merilu. Poleg te možnosti obstaja seveda tudi možnost povezave s podjetjema Steiner ali Barth Hass v Nemčiji, ki tudi imata vso potrebno infrastrukturo, saj je pri njih predelava hmelja v ekstrakte že rutinsko vpeljana.

5. Bibliografija povezana z delom in rezultati projekta

Med izvajanjem projekta smo bili ves čas v stiku z zainteresirano javnostjo kateri smo posredovali naša dognanja v pisnih in ustnih oblikah. V nadaljevanju podajamo seznam bibliografije, ki je nastal v zvezi z delom na projektu.

1.01 Izvirni znanstveni članek

1. KOŠIR, Iztok Jože, ČERENAK, Andreja, OCVIRK, Miha. Primerjava različnih genotipov hmelja glede na vsebnost beta-kislin = Comparison of different hop genotypes with respect to beta-acids content. *Hmeljarski bilten*, ISSN 0350-0756. [Tiskana izd.], 2018, 25, str. 26-35, ilustr. [COBISS.SI-ID 760204]
2. MOŠKRIČ, Ajda, BUBNIČ, Jernej, SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, PREŠERN, Janez. Potential positive effects of hop beta acids on parasitic mite *Varroa destructor* control in honey bee colonies. *Journal of hygienic engineering and design*, ISSN 1857-8489, 2018, vol. 24, str. 21-28. <http://www.jhed.mk/filemanager/JHED%20Vol.%2024/02.%20FQ&S/02.%20Full%20paper%20-%20Ajda%20Mo%C5%A1kri%C4%8D.pdf>. [COBISS.SI-ID 5582952]

1.04 Strokovni članek

3. KOŠIR, Iztok Jože. Uporaba hmeljevih proizvodov za zatiranje varojev v čebelarstvu. *Hmeljar*, ISSN 1318-6183, 2018, letn. 80, št. 1-12, str. 42, ilustr. [COBISS.SI-ID 763276]

4. KOZMUS, Peter. Raziskava o učinkovitosti hmeljevih pripravkov za ekološko zatiranje varoj. *Slovenski čebelar : glasilo čebelarских organizacij Slovenije*, ISSN 0350-4697, jul.-avg. 2018, letn. 120, št. 7/8, str. 215-216, ilustr. [COBISS.SI-ID 1024461903]

5. RATIZNOJNIK, Mateja, PISLAK, Metka. Jesensko zatiranje varoj pri čebelah. *Slovenski čebelar : glasilo čebelarских organizacij Slovenije*, ISSN 0350-4697, okt. 2018, letn. 120, št. 10, str. 277-278, ilustr. [COBISS.SI-ID 4683130]

1.09 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci

6. LEŠNIK, Vida, RATIZNOJNIK, Mateja, JENČIČ, Vlasta. Spremljanje napadenosti čebeljih družin z varojami (*Varroa destructor*) v Sloveniji. V: LILEK, Nataša (ur.), et al. *ApiSlovenija : [zbornik]*, 42. dnevi čebelarstva, Celje 2019. Lukovica: Čebelarська zveza Slovenije. 2019, str. 5-10, ilustr. [COBISS.SI-ID 4780922]

7. JENČIČ, Vlasta, PISLAK, Metka. Zatiranje varoj v ekološkem čebelarstvu. V: AUGUŠTIN, Vladimir (ur.), ZUPANČIČ, Mitja. *ApiSlovenija : [zbornik]*, 41. dnevi čebelarstva, Celje 2018. Lukovica: Čebelarська zveza Slovenije. 2018, str. 31-36. [COBISS.SI-ID 4514426]

1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

8. JENČIČ, Vlasta, PISLAK, Metka, ŽVOKELJ, Lucija, VREČEK ŠULGAJ, Jerica, BUBNIČ, Jernej, SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, KOZMOS, Peter, OCVIRK, Miha, PREŠERN, Janez, KOŠIR, Iztok Jože. Uporaba hmeljnih kislin za ekološko zatiranje varoj = Use of hop acids for organic varroa control. V: MAJDIČ, Gregor (ur.). *[7th Slovenian Veterinary Congress = 7. Slovenski veterinarski kongres : Portorož, Slovenia, 3 - 6 April 2019]*, 7. slovenski veterinarski kongres, Portorož, 3 - 6 April, 2019, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, Vol. 56, suppl. 23, 2019). Ljubljana: Veterinarska fakulteta. 2019, str. 105. [COBISS.SI-ID 4798074]

9. SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, BUBNIČ, Jernej, JENČIČ, Vlasta, KOZMUS, Peter, MOŠKRIČ, Ajda, OCVIRK, Miha, PISLAK, Metka, PREŠERN, Janez, KOŠIR, Iztok. Hmeljeve beta kisline kot potencialni zaviralci zajedalca čebelje družine, *Varroa destructor* - komplementarni pristop = Hop beta acids as a potential suppressor of bee colony parasite, *Varroa destructor* - a complementary approach. V: MAJDIČ, Gregor (ur.). *[7th Slovenian Veterinary Congress = 7. Slovenski veterinarski kongres : Portorož, Slovenia, 3 - 6 April 2019]*, 7. slovenski veterinarski kongres, Portorož, 3 - 6 April, 2019, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, Vol. 56, suppl. 23, 2019). Ljubljana: Veterinarska fakulteta. 2019, str. 237. [COBISS.SI-ID 4815226]

10. LEŠNIK, Vida, RATIZNOJNIK, Mateja, JENČIČ, Vlasta. Spremljanje napadenosti izbranih čebeljih družin z varojami (*Varroa destructor*) v pomurski in podravski regiji v letih 2017 in 2018 = *Varroa (Varroa destructor) infestation level monitoring of the selected honeybee colonies in Mura and Drava regions in the years 2017 and 2018*. V: MAJDIČ, Gregor (ur.). *[7th Slovenian Veterinary Congress = 7. Slovenski veterinarski kongres : Portorož, Slovenia, 3 - 6 April 2019]*, 7. slovenski veterinarski kongres, Portorož, 3 - 6 April, 2019, (Slovenian veterinary research, ISSN 1580-4003, Vol. 56, suppl. 23, 2019). Ljubljana: Veterinarska fakulteta. 2019, str. 238-239. [COBISS.SI-ID 4815482]

11. SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, BUBNIČ, Jernej, JENČIČ, Vlasta, KANDOLF BOROVŠAK, Andreja, KOŠIR, Iztok Jože, KOZMUS, Peter, OCVIRK, Miha, PISLAK, Metka, PREŠERN, Janez, SRČIČ, Stanko. New frontiers in varroa control - are HBAs an effective treatment against varroosis? : [Proceedings of the 2017 COLOSS Conference]. *Bee world*, ISSN 0005-772X, Jan. 2018, vol. 95, no. 1, str. 30. [COBISS.SI-ID 5482344]

12. MOŠKRIČ, Ajda, BUBNIČ, Jernej, SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, PREŠERN, Janez. Potential positive effects of hop beta acids on parasitic mite *Varroa destructor* control in honey bee colonies. V:

KAKURINOV, Vladimir (ur.). *Book of abstracts : NUTRICON 2018, 13-15 June, 2018, Ohrid, Macedonia : Food quality and safety, health and nutrition*. Skopje: Consulting and training center - Key. 2018, str. 52-53. [COBISS.SI-ID 5540712]

13. MOŠKRIČ, Ajda, BUBNIČ, Jernej, SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, PREŠERN, Janez. The ups and downs of hops (*Humulus lupulus*) beta acids in Varroa control. V: DE GRAAF, D.C. (ur.), PAXTON, Robert J. (ur.). *EurBee 8. 8th Congress of Apidology, 18-20 September 2018, Ghent, Belgium : program & abstract book*, Eurbee8, 8th congress of apidology, 18-20 september 2018, Ghent. Ghent: Ghent University. 2018, str. 230. [COBISS.SI-ID 5575528]

3.15 Prispevek na konferenci brez natisa

14. SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana. *Najnovejši izsledki iz življenja varoj : predavanje za čebelarje, Skaručna, 6. 2. 2019*. [COBISS.SI-ID 5664104]

15. KOŠIR, Iztok Jože, OCVIRK, Miha, ČERENAK, Andreja. Vsebnost beta-kislin v izbranih genotipih hmelja : poster predstavljen na 56. seminarju o hmeljarstvu, 7. februar 2019, Laško. [2019]. [COBISS.SI-ID 761996]

16. SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana. *Najnovejši izsledki iz življenja varoj : predavanje za čebelarje, Ljubljana, 8. 12. 2018*. [COBISS.SI-ID 5625704]

17. KOŠIR, Iztok Jože, OCVIRK, Miha, SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, JENČIČ, Vlasta, KANDOLF BOROVŠAK, Andreja, KOZMUS, Peter, PISLAK, Metka, PREŠERN, Janez, SRČIČ, Stanko, BUBNIČ, Jernej. *Uporaba hmeljnih pripravkov za ekološko zatiranje varoje (Varroa destructor) : poster predstavljen na 55. seminarju o hmeljarstvu z mednarodno udeležbo, 7. februar 2018, Laško*. 2018. [COBISS.SI-ID 915575]