

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Mira M. Stanković

**Određivanje sadržaja proteina i fenola u uzorcima
meda kao indikatora uticaja faktora stresa na
pčelinja društva**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Mira M. Stanković

**Protein and phenol content in honey samples as
indicators of the influence of stress factors on honey
bee colonies**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

Mentori:

dr Maja Natić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja

Članovi komisije:

dr Dragan Manojlović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Natalija Polović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Jevrosima Stevanović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Fakultet veterinarske medicine

Datum odbrane:

_____, u Beogradu.

Zahvalnica:

Određivanje sadržaja proteina i fenola u uzorcima meda kao indikatora uticaja faktora stresa na pčelinja društva

Izvod

Predmet rada ove doktorske disertacije je razvoj analitičkih postupaka za praćenje relativnog sadržaja ukupnih proteina i ukupnih fenola u različitim uzorcima meda radi procene uticaja biotičkog stresa na pčelinja društva usled zaraze parazitima *Varroa destructor* i *Nosema ceranae*.

Pored proizvodnje meda, pčele imaju veoma važnu ulogu u oprašivanju biljaka. Poslednjih godina u svetu dolazi do znatnog smanjenja pčelinjih društava, a jedan od razloga zbog kog dolazi do ove pojave su bolesti pčela. U literaturi je malo podataka o kvalitetu meda koji potiče iz pčelinjih zajednica izloženih biotičkom stresu.

U cilju nalaženja indikatora u medu za procenu stepena zaraženosti pčelinjih društava, prikupljeni su uzorci meda iz košnica zaraženih varoom i nozemom, a zatim analizirani odabranim biohemijskim i fizičkohemijskim metodama. Određena je vrsta i stepen infekcije košnica pčelinjih društava iz kojih su prikupljeni uzorci meda. Polenskom analizom je određena botanička vrsta meda i nije utvrđena direktna veza između prisustva i koncentracije polena u uzorcima meda i stepena zaraženosti košnica. Uzorci meda su okarakterisani fizičkohemijskim metodama. Određeni su specifična optička rotacija, električna provodljivost, sadržaj vlage, slobodna kiselost i sadržaj pojedinačnih šećera. Profil šećera u uzorcima meda određen je visokoeffikasnom jonskom hromatografijom sa elektrohemijskom detekcijom (HPAEC-PAD). Analiza glavnih komponenata (PCA) je upotrebljena za utvrđivanje razlika između medova koji potiču iz košnica različitog stepena zaraženosti na osnovu dobijenih fizičkohemijskih parametara. Rezultati analize glavnih komponenata su pokazali da sa porastom infekcije košnica u uzorcima meda raste sadržaj vode dok slobodna kiselost, apsolutna vrednost specifične optičke rotacije i električna provodljivost opadaju. Veći sadržaj fruktoze, melbioze i meleziotoze izmeren je u uzorcima meda iz košnica višeg stepena infekcije u odnosu na uzorke meda koji potiču iz košnica manje zaraženosti. Sadržaj glukoze i izomaltoze bio je veći u uzorcima meda koji potiču od pčelinjih društava manje zaraženosti u odnosu na uzorke meda iz košnica veće zaraženosti.

U cilju ispitivanja varijacije sadržaja biljnih i pčelinjih proteina u medu primenjene su elektroforetska analiza i određivanje aktivnosti enzima. Pomoću natrijum dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeze (SDS PAGE) nije utvrđena značajna razlika u proteinskom profilu analiziranih uzoraka. Stoga je primenjena spektrofotometrijska metoda određivanja aktivnosti specifičnih enzima, katalaze i dijastaze, kao biljnog odnosno pčelinjeg marker enzima. Rezultati korelacione analize su pokazali da je stepen zaraze košnica u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću katalaze i može biti potencijalno koristan indikator za skrining meda poreklom iz košnica zaraženih varoom i nozemom. Pored toga, nije utvrđena promena u aktivnosti dijastaze u uzorcima meda čije je poreklo od društava koja su zaražena.

Fluorescentna spektroskopija u kombinaciji sa naprednim statističkim metodama multivarijaciona rezolucija krivih – naizmenični najmanji kvadrati (MCR-ALS) i paralelna faktorska analiza (PARAFAC) je korišćena za određivanje relativnog sadržaja proteina i fenola u uzorcima meda.

Korišćenjem MCR-ALS metode, dobijene su komponente emisijonih spektara uzoraka meda koje odgovaraju proteinskim i fenolnim fluoroforima. Određena je površina proteinskih i fenolnih komponenti i izračunat njihov odnos koji se pokazao kao pogodan parametar za procenu nivoa infekcije društava. Pokazano je da se odnos proteinske i fenolne komponente u uzorcima meda smanjuje sa porastom nivoa infekcije u odgovarajućim košnicama, bilo da su zaražene varoom ili nozemom. Novi pristup baziran na fluorescentnoj spektroskopiji u kombinaciji sa statističkim metodama za istovremenu procenu sadržaja ukupnih proteina, ukupnih fenola i njihovog odnosa je upoređen sa spektrofotometrijskim metodama koje se veoma često koriste za određivanje ukupnih proteina (*Bradford*) i ukupnih fenola (*Folin–Ciocalteu*), a imaju brojne nedostatke. Rezultati dobijeni primenom paralelne faktorske analize na podatke dobijene fluorescencijom su pokazali da dobijena PARAFAC komponenta PFC1, koja potiče od fenolnih fluorofora, može biti indikator za procenu nivoa zaraze pčelinjih društava krpeljom *V. destructor*, kao vrstom biotičkog stresa.

Pokazano je da se fluorescentna spektroskopija može koristiti za brzo i pouzdano ispitivanje varijabilnosti uzoraka meda. Spektrofluorimetrijska procena relativnog sadržaja fenola i proteina je tehnika i može imati prednost u odnosu na postojeće metode koje se koriste za kvantifikaciju proteina i fenola u medu, jer se radi bez postupka pripreme uzorka. Ova metoda omogućava istovremeno određivanje proteina i fenola, jer su jasno razdvojeni emisijoni maksimumi njihovih fluorofora.

Na kraju, treba istaći značaj i doprinos rezultata ove disertacije dobijenih korišćenjem analitičke metodologije i hemometrijskog pristupa koji su primenjeni na uzorcima meda radi procene stepena zaraženosti pčelinjih društava. Važno je napomenuti da standardni postupak pripreme uzorka koji se koristi za određivanje stepena zaraženosti pčelinjih društava zahteva uzorkovanje živih pčela. Analitički postupak koji je primenjen u okviru ove disertacije je neinvazivan i može biti osnova za razvijanje metoda za brzu i jednostavnu procenu stepena zaraženosti pčelinjih društava, koji isključuje sam postupak uzorkovanja pčela.

Ključne reči: medonosna pčela (*Apis mellifera*); med; *Varroa destructor*; *Nosema ceranae*; fluorescentna spektroskopija; fenoli; proteini

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Analitička hemija

Protein and phenol content in honey samples as indicators of the influence of stress factors on honey bee colonies

Abstract

The subject of this doctoral dissertation is the development of analytical procedures for monitoring the relative content of total proteins and total phenols in different honey samples to assess the impact of biotic stress on honey bee colonies due infected with parasites *Varroa destructor* and *Nosema ceranae*.

In addition to honey production, bees have very important role in pollinating plants. In recent years, there has been a significant decrease in bee colonies in the world and one of the reasons why this phenomenon occurs is bee diseases. In the literature, the data are not abundant on the honey quality change related to bee colonies exposure to biotic stress.

In order to find markers in honey to assess the degree of infection of bee colonies, honey samples were collected from hives infected with parasites *V. destructor* and *N. ceranae* parasites and analyzed by selected biochemical and physicochemical methods. The type and degree of infection of bee colonies related to the analyzed honey samples were determined. Pollen analysis has proved the botanical type of honey samples and it was observed that the presence and concentration of pollen in honey samples were not correlated with the infestation of hives. Honey samples were characterized by physicochemical methods. Specific optical rotation, electrical conductivity, moisture content, free acidity, and sugar content were determined to obtain additional characteristics of honey samples. Sugar profile in honey samples was determined by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Principal component analysis (PCA) was used to determine differences between honey samples originating from the hives with different infection levels. The obtained results showed that in hives with the increase of infection, in honey samples the water content increased, while the free acidity, the absolute value of the specific optical rotation, and the electrical conductivity decreased. The higher content of fructose, melibiosis and melezitose was observed in honey samples from the hives with a higher degree of infection in comparison with honey samples from the hives with the lower infection degree. Glucose and isomaltose content was higher in honey samples originating from the bee colonies less infected compared to honey samples from the hives with the higher infection.

In order to investigate variations in the content of plant and bee protein markers in honey, biochemical methods such as electrophoretic analysis and determination of enzyme activity were applied. Using sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE), no significant difference was found in the protein profile of the analyzed honey samples. Therefore, the spectrophotometric method was applied for determination of the activity of specific enzymes, catalase and diastase, as plant and bee marker enzymes, respectively. The results of correlation analysis showed that the colonies' infestation level was positively correlated with the activity of catalase which can be a useful indicator for screening of honey originating from beehives infested by *V. destructor* and *N. ceranae*. On the other hand, no change in diastase activity was found in honey samples obtained from infected societies.

Fluorescence spectroscopy in combination with advanced statistical methods Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Squares (MCR-ALS) and Parallel Factor Analysis (PARAFAC) was used to determine the relative protein and phenol content in honey samples. Using the MCR-ALS method, components of the emission spectra of honey samples, corresponding to protein and phenolic

fluorophores, were obtained. The areas of protein and phenolic components were determined and their ratio was calculated, which proved to be a reliable marker for assessment of the infection level in honey bee societies. It has been shown that the ratio of protein and phenolic components in honey samples decreases with increasing levels of infection in the corresponding hives, for both *V. destructor* or *N. ceranae* parasites. This new method, based on fluorescence spectroscopy combined with statistical methods for the simultaneous assessment of the content of total proteins, total phenols and their ratio, was compared with spectrophotometric methods frequently used for the determination of total proteins (*Bradford*) and total phenols (*Folin–Ciocalteu*) which have numerous disadvantages. Also, the results obtained by applying Parallel Factor Analysis on the fluorescence data showed that the obtained PARAFAC component PFC1, which originates from phenolic fluorophores, may be an indicator for the assessment of the infection level in bee colonies, as a type of biotic stress.

Based on the obtained results, fluorescence spectroscopy could be used for a rapid and reliable examination of the honey samples' variability. Spectrofluorimetric assessment of the relative content of phenols and proteins may have an advantage over the existing methods used for the quantification of proteins and phenols in honey, because it is done without a sample preparation procedure. This method enables the simultaneous determination of proteins and phenols, because the maxima of their fluorophores in the emission spectra are clearly separated.

Finally, one should highlight the importance and contribution of the results of this dissertation, obtained using the analytical methodology and the chemometric approach, which were applied on the honey samples in order to assess the degree of bee colonies' infection. It is important to point out that the standard sample preparation procedure used to determine the degree of bee colonies' infection requires live bees sampling. The analytical procedure applied in this dissertation is non-invasive and may be a basis for developing methods for a quick and simple assessment of the degree of bee colonies' infection, which excludes the procedure of bees sampling.

Keywords: honey bee (*Apis mellifera*); honey; *Varroa destructor*; *Nosema ceranae*; fluorescence spectroscopy; phenols; proteins

Scientific field: Chemistry

Field of Academic Expertise: Analytical Chemistry

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	3
2.1. Sindrom nestajanja pčelinjih društava - Colony Collapse Disorder (CCD)	3
2.2. Gubici pčelinjih društava u Srbiji.....	5
2.3. Varoza.....	5
2.4. Nozemoza	7
2.5. Proizvodnja meda u pčelinjim društvima koja su izložena parazitima <i>V. destructor</i> i <i>N. ceranae</i>	8
2.6. Med.....	9
2.6.1. Definicija, nastajanje i vrste meda.....	9
2.6.2. Hemijski sastav meda	10
2.6.2.1. Ugljeni hidrati u medu.....	11
2.6.2.2. Voda u medu.....	12
2.6.2.3. Aminokiseline, proteini i enzimi u medu	13
2.6.2.4. Fenolna jedinjenja.....	15
2.6.2.5. Organske kiseline	16
2.6.2.6. Minerali	16
2.7. Pojam fluorofore i glavne fluorofore u medu	16
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1. Procena zaraženosti pčelinjih društava krpeljom <i>Varroa destructor</i>	20
3.2. Mikroskopska detekcija spora <i>N. ceranae</i> i kvantifikacija stepena infekcije.....	20
3.3. Uzorci meda.....	21
3.4. Reagensi i hemikalije	23
3.5. Utvrđivanje botaničke vrste polenskom (melizopalinološkom) analizom	24
3.6. Fizičko-hemijske karakteristike meda	24
3.6.1. Određivanje električne provodljivosti	24
3.6.2. Određivanje sadržaja vode.....	25
3.6.3. Slobodna kiselost meda	25
3.6.4. Određivanje specifične optičke rotacije.....	25
3.6.5. Određivanje šećera u medu.....	26
3.7. Određivanje koncentracije ukupnih proteina Bradford-ovom metodom.....	26

3.9. Određivanje aktivnosti katalaze u uzorcima meda	28
3.10. Određivanje aktivnosti dijastaze u uzorcima meda	29
3.11. Određivanje ukupnih fenola (TPC)	31
3.12. Fluorescentna spektroskopija	31
3.13. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	33
3.14. Statistička obrada podataka	34
3.14.1. Paralelna faktorska analiza (PARAFAC)	34
3.14.2. Multivarijaciona rezolucija krivih – naizmenični najmanji kvadrati (MCR-ALS)	35
3.14.3. Analiza glavnih komponenata (PCA)	35
3.14.4. Korelaciona analiza	36
4. REZULTATI I DISKUSIJA	37
4.1. Procena varijabilnosti ukupnog sadržaja proteina i fenola u medu korišćenjem <i>front-face</i> fluorescentne spektroskopije u kombinaciji sa MCR-ALS analizom	37
4.2. Praćenje godišnje varijacije proteina i fenola u medu korišćenjem fluorescentne spektroskopije	44
4.3. Procena infekcije pčelinjih zajednica nozemom i varoom korišćenjem fluorescentne spektroskopije u kombinaciji sa diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom uzoraka meda	47
4.4. Procena nivoa zaraze pčelinjih društava primenom spektroskopskih i biohemijskih analiza uzoraka meda	51
4.5. Ispitivanje veze između fizičkohemijskih parametara u uzorcima meda i procene stepena infekcije košnica korišćenjem Analize glavnih komponenata (PCA)	58
5. ZAKLJUČAK	62
6. LITERATURA	64
7. PRILOG	80
8. BIOGRAFIJA AUTORA	87
9. IZJAVA O AUTORSTVU	89
10. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA	90
11. IZJAVA O KORIŠĆENJU	91

1. UVOD

Medonosna pčela (*Apis mellifera* L.) je tokom istorije privlačila pažnju čoveka kako svojim dragocenim proizvodima (med, vosak, matični mleč, propolis, polen), tako i svojom nezamenljivom ulogom u oprašivanju biljaka i održavanju stabilnosti prinosa useva koji su deo lanca ishrane čovečanstva. Pčele su socijalni insekti, prilagođeni životu u zajednici koja se odlikuje velikom dinamikom, gde svaki član ima tačno određene uloge.

Poslednjih decenija, širom sveta zabeleženo je znatno smanjenje broja pčelinjih društava. Ovaj fenomen je nazvan sindrom nestajanja pčelinjih društava (*Colony Collapse Disorder, CCD*), a predstavlja pojavu da jaka pčelinja društva neobjašnjivo i iznenada oslabe, i najčešće uginu bez ikakvih vidljivih znakova bolesti. Pravi razlog ovog sindroma i dalje se ne zna. Stoga, uporedo sa kontrolom kvaliteta meda i istraživanjima koja se odnose na pronalaženje hemijskih markera u medu, odnosno fitohemikalija koje su specifične za određene vrste meda kako bi se omogućila i olakšala sistematska karakterizacija i klasifikacija meda, naučnici širom sveta se bave ispitivanjem uzroka nestanka pčela.

Mnogobrojna istraživanja kao razlog iznenadnog nestanka pčela navode različite faktore stresa. To su različite bolesti pčela, njihova izloženost pesticidima kojima se tretiraju poljoprivredne kulture, nepovoljne vremenske prilike, pogrešni postupci pčelara, ali i usled uticaja elektromagnetnog zračenja mobilnih telefona i WI-FI odašiljača, koji se takođe smatraju izvorima stresa (Neumann i Carreck, 2010).

Posebna pažnja naučne javnosti je usmerena na uticaj parazita, pčelinjeg krpelja *Varroa destructor* i mikrosporidija *Nosema ceranae*, na pčelinja društva. Istraživanja su pokazala da prisustvo pčelinjeg krpelja *V. destructor* izaziva smanjenje sadržaja proteina u abdomenu i limfi pčele (Amdam i sar., 2004; Bowen-Walker i Gunn, 2001; Ramsey i sar., 2019), dok zaraženost mikrosporidijama *N. ceranae* dovodi do poremećaja u metabolizmu proteina pčela, smanjenja količine proteina u hipofaringalnim žlezdama pčela, zatim dovodi do smanjenja rasta pčela i gubitka pčelinjih društava (Goblirsch, 2018; Holt i sar., 2013; Suwannapong i sar., 2011).

Pregledom odgovarajuće literature može se primetiti da ne postoje opsežnije studije koje bi pružile informacije o kvalitetu meda koji potiče od pčelinjih društava izloženih biotičkom stresu, kao ni studije koje ispituju postojanje veze između zaraze pčelinjih kolonija i hemijskog sastava, odnosno fizičko-hemijskih karakteristika meda. Stoga, predmet našeg interesovanja je bila analiza meda iz zaraženih košnica, odnosno da li se mogu dobiti nove informacije o stresu pčelinje zajednice parazitima *V. destructor* i *N. ceranae*. U okviru eksperimentalnog dela disertacije određeni su fizičko-hemijski parametri primenom standardnih analitičkih metoda, a u cilju utvrđivanja karakteristika uzoraka meda koji potiču iz zaraženih košnica. Uzorci meda su prikupljeni iz različitih pčelinjaka, pri čemu je prvo određena vrsta i stepen infekcije pčelinjih društava. Zatim je polenskom analizom određena botanička vrsta meda. Onda su određene specifična optička rotacija, električna provodljivost, sadržaj vlage, slobodna kiselost i sadržaj šećera primenom metoda koje su preporučene od strane Međunarodne komisije za med (*International Honey Commission, IHC*). Koncentracija ukupnih fenola određena je *Folin-Ciocalteu* metodom (Singleton i Rosi, 1965), dok je koncentracija ukupnih proteina određena metodom po Bradford-u (Bradford, 1976). Fluorescentna spektroskopija je poznata analitička metoda koja se više decenija koristi u analitici, kako makromolekula, tako i

malih molekula, u kombinaciji sa različitim statističkim metodama. U ovoj doktorskoj disertaciji je korišćena kao brza, osetljiva i jednostavna metoda za određivanje relativnog sadržaja glavnih fluorescirajućih komponenti (fluorofora) u medu, proteina i fenola. Pošto su proteini u medu biljnog i pčelinjeg porekla, 2/3 ukupnih proteina meda je pčelinjeg porekla, a 1/3 ukupnih proteina potiče od polena (Nazarian i sar., 2010), dodatno su ispitane varijacije sadržaja biljnih proteina i pčelinjih proteina, primenom različitih biohemijskih metoda kao što su određivanje aktivnosti enzima i elektroforetska analiza.

Cilj ove disertacije bio je razvoj analitičkih postupaka za određivanje parametara koji bi se mogli posmatrati kao potencijalni indikatori zaraženosti pčelinjim krpeljom *V. destructor* i mikrosporidijama *N. ceranae*.

Da bi se ostvarili ciljevi ove disertacije, definisani su sledeći zadaci:

- prikupljanje kontrolnih uzoraka meda iz košnica čija su društva bila nezaražena, kao i uzoraka meda iz košnica različitog stepena zaraze varoom i nozemom
- utvrđivanje botaničkog porekla meda pomoću melizopalinološke analize
- razvoj i primena metode zasnovane na fluorescentnoj spektroskopiji za određivanje relativnog sadržaja proteina i fenola u uzorcima meda
- određivanje ukupnih fenola (*Folin Ciocalteu*) i ukupnih proteina (*Bradford*) spektrofotometrijskim metodama u uzorcima meda
- poredjenje rezultata relativnog sadržaja proteina i fenola dobijenih fluorescentnom spektroskopijom sa rezultatima spektrofotometrijskih metoda
- razdvajanje proteina u medu pomoću SDS PAGE elektroforeze, kao i određivanje aktivnosti enzima katalaze i diastaze
- praćenje promene u entalpiji uzoraka meda primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC)
- određivanje fizičko-hemijskih parametara (specifična optička rotacija, električna provodljivost, sadržaj vlage, slobodna kiselost i sadržaj šećera) u uzorcima meda

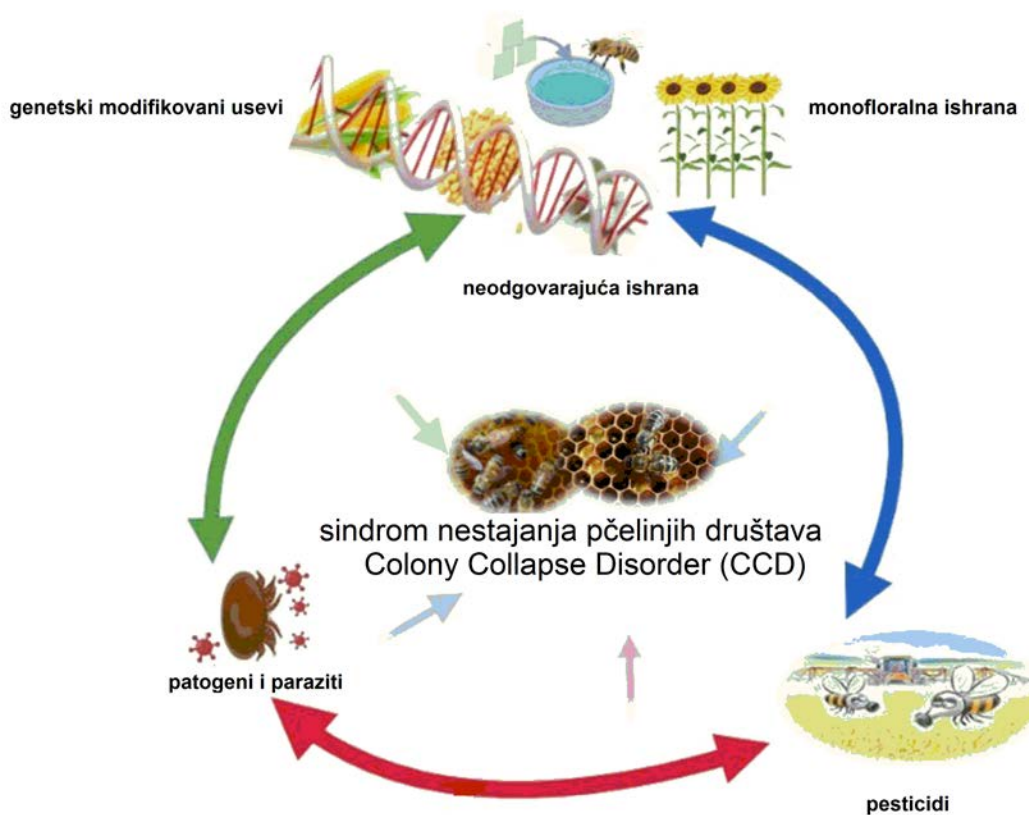
2. OPŠTI DEO

2.1. Sindrom nestajanja pčelinjih društava - Colony Collapse Disorder (CCD)

Stari Egipćani su oko 2600. godine pre nove ere pripitomili medonosnu pčelu, *Apis mellifera* (Roffet-Salque i sar., 2015). Od tada, pčele su korišćene kao izvor jedinstvenih, prirodnih proizvoda meda, voska, propolisa i matičnog mleča. Međutim, pčele imaju značajniju ekološku ulogu vezanu za oprašivanje brojnih poljoprivrednih i divljih biljnih vrsta. Otprilike 84% useva koji se uzgajaju u Evropi zavisi od oprašivanja insekata (Potts i sar., 2010). Jedini izuzetak su žitarice, koje se oprašuju vetrom. Od svih insekata, pčele obezbeđuju oko 80% oprašivanja cvetnih biljaka, a igraju najvažniju ulogu u oprašivanju povrća i voća, ukrasnog i medicinskog bilja i mnogih drugih biljnih vrsta (Gill i sar., 2012; Neov i sar., 2019).

Poslednjih decenija dolazi do nestajanja pčelinjih društava, takozvanog kolapsa kolonija (*Colony Collapse Disorder*, CCD), zimskih gubitaka i slabljenja pčelinjih društava u mnogim pčelinjacima širom sveta. To predstavlja veoma ozbiljne probleme za pčelare i ima negativan uticaj na oprašivanje. Zbog značaja pčela u ljudskoj ishrani, smanjenje broja pčelinjih kolonija širom sveta dovodi do sve veće zabrinutosti među pčelarima, u naučnoj i široj javnosti.

Tipična karakteristika sindroma nestajanja pčelinjih društava je potpuno odsustvo ili prisustvo malog broja odraslih pčela u košnici, uz prisustvo živog legla (jaja, larve i lutke) i žive pčelinje matice. Zajednička karakteristika je da pčele radilice napuštaju košnicu i ne vraćaju se (vanEngelsdorp i sar., 2009, 2010), dok u samoj košnici i u njoj blizini nije moguće pronaći mrtve pčele (Goulson i sar., 2015). Pored toga, nema naznaka invazije na košnicu drugih insekata, kao što su ose ili stršljeni. Vizuelni pregled legla pokazuje da su košnice obično infestirane ektoparazitskim krpeljom *Varroa destructor* koji ujedno i predstavlja glavni uzrok globalnih gubitaka kolonija (Le Conte i sar., 2010). Ostale štetočine koje se nalaze u svim pčelinjim društvima su intracelularni, crevni paraziti (mikrosporidije), uglavnom *Nosema ceranae*, i drugi predstavnici istog roda (Fries i sar., 2006). Tokom dugogodišnjeg istraživanja pojavio se veliki broj hipoteza o tome šta može biti uzrok CCD-a i donet je zaključak da uzrok nije samo jedan nego sinergijsko delovanje više faktora. Nekoliko studija je bilo fokusirano na procenu veze između zdravlja pčelinjih društava i efekata višestrukih stresora, kako biotičkih (paraziti i patogeni) tako i abiotičkih (izloženost pesticidima, nedostatak kvalitetne hrane u prirodi, loša pčelarska praksa, nepovoljni vremenski uslovi kao i nepravilan smeštaj pčelinjaka) (Goulson i sar., 2015; Smith i sar., 2013; Dainat, 2012a; DeGrandi-Hoffman i Chen, 2015). Zajedničko delovanje ovih faktora prikazano je na **Slici 1**.



Slika 1. Zajedničko delovanje različitih faktora koji dovode do sindroma nestajanja pčelinjih društava (*Colony Collapse Disorder*, CCD) (preuzeto i modifikovano, El-Seedi i sar., 2022).

Imunološki odgovor pčela je kompleksan i zasniva se na pojedinačnom i delovanju celokupnog pčelinjeg društva. Kombinovani individualni i društveni odbrambeni mehanizmi pčela su neophodni da bi se suprotstavili svakoj pretnji koja bi mogla da ugrozi opstanak pčelinje zajednice. Na individualnom nivou, medonosne pčele imaju nekoliko linija urođene imunološke odbrane od stranih patogena. Prva linija odbrane su fizičke i hemijske barijere čija uloga je sprečavanje prijanjanja ili ulaska patogena u telo (Evans i Spivak, 2010). Ako patogen probije fizičke i hemijske barijere, medonosne pčele mogu da se zaštite od infekcije ćelijskim i humoralnim imunim odgovorom koji predstavljaju drugu liniju odbrane (Wilson-Rich i sar., 2008; Laughton i sar., 2011).

Kolektivna odbrana od parazita i patogena proizilazi iz međusobne saradnje pojedinaca u pčelinjim kolonijama i pretstavlja „socijalni imunitet“ (Cremer i sar., 2007; Evans i Spivak, 2010). Mnogi pojedinci obavljaju male zadatke koji kolektivno imaju uticaj na celo pčelinje društvo prilikom smanjenja širenja parazita i patogena. Odrasle pčele koje su opterećene patogenima umiru van košnice i tako doprinose i socijalnom imunitetu (Evans i Spivak, 2010). Radilice uklanjaju odrasle pčele koje uginu u koloniji. Termoregulatorno ponašanje takođe je vrsta socijalnog imuniteta, posebno kada pčele radilice stvaraju „društvenu groznicu“ protiv patogena koji su osetljivi na toplotu kao što su gljive *Ascosphaera apis* (Simone-Finstrom i Tarpy, 2014). Pored grupnog ponašanja unutar košnice, pčele sakupljaju biljne smole (propolis) i koriste ih za stvaranje vode i hermetički nepropusni antimikrobni i antivirusni omotač oko košnice (Bankova i sar., 2002; Bilikova i sar., 2013; Simone i sar., 2009; Simone-Finstrom i sar., 2010).

2.2. Gubici pčelinjih društava u Srbiji

Smanjenje broja pčela, kao i njihovih zajednica uočeno je poslednjih godina u celom svetu. Poznato je da od 1980. godine do sada broj pčelinjih društava u Evropi smanjen za 25%, a u Sjedinjenim Američkim Državama za 50–60% (Smith i sar., 2013). Pirk i saradnici su istraživali zdravstveno stanje pčela u Africi i utvrdili da gubici kolonija velikih razmera nisu prijavljeni (Pirk i sar., 2016). Chantawannakul i saradnici su ispitivali uticaj štetočina, parazita i patogena na različite vrste medonosnih pčela u Aziji pri čemu su potvrdili njihovo dejstvo na opadanje broja pčelinjih društava (Chantawannakul i sar., 2016). Istovremeno, uprkos sporadičnom lokalnom izumiranju, broj pčelinjih društava u svetu se povećao za oko 45% u poslednjih 60 godina (Aizen i Harder, 2009; Sumner i Boriss, 2006). Iako su ovi podaci pozitivni, treba imati na umu da obično pčelari nadoknađuju gubitak jedne košnice tako što je podele na dve, što često rezultira „slabljenjem“ dva nova pčelinja društva.

U Srbiji i zemljama okruženja takođe se sa velikom pažnjom prati nestajanje pčelinjih kolonija. Monitoring zimskih gubitaka pčelinjih zajednica koji sprovodi međunarodno udruženje *International Honeybee Research Association* (COLOSS) u 36 zemalja pokazao je da se prosečna vrednost gubitaka gajenih pčelinjih društava u prethodnih pet sezona kretala u opsegu od 16,4% do 20,9%, pri čemu je u Srbiji taj opseg bio od 7,4% do 31,4% (Brodschneider i sar., 2018; Gray i sar., 2019, 2020). Rezultati ankete sprovedene u Srbiji tokom prethodne tri sezone pokazali su sledeće: udeo izgubljenih pčelinjih zajednica u Srbiji u sezoni 2016/2017 iznosio je u proseku 24,1%, što je bilo iznad prosečne vrednosti gubitaka (20,9%) u 30 zemalja koje su te sezone učestvovala u anketi (Brodschneider i sar., 2018). Značajno je reći da je veoma sličan procenat gubitaka te godine utvrđen i u susednim zemljama koje su učestvovala u anketi, 23,4% u Austriji, 23,1% u Hrvatskoj i 22,5% u Makedoniji (Brodschneider i sar. 2018), čiji su gubici takođe bili veći od proseka, ali daleko manji od gubitaka u Nemačkoj u kojoj su te godine zabeležena najveća uginuća (čak 44,5%). U sezoni 2017/2018 prosek gubitaka u Srbiji bio je svega 7,4%, što je znatno manje kako u odnosu na gubitke u Srbiji prethodne godine, tako i odnosu na prosečnu vrednost gubitaka (16,4%) u 36 zemalja obuhvaćenih anketom te sezone (Gray i sar., 2019), ali i u odnosu na gubitke u Hrvatskoj (13,7%) i Makedoniji (13,2%). U sezoni 2018/2019 Srbija je sa 23,9% gubitaka bila na prvom mestu po broju gubitaka, a sličan procenat zabeležen je i u susednoj Hrvatskoj (20,4%), što je zabrinjavajuće jer je prosek za svih 35 analiziranih zemalja bio 16,7% (Gray i sar., 2020).

2.3. Varoza

Pčelinji krpelj *Varroa destructor* je obligatni parazit medonosne pčele (**Slika 2**) i predstavlja najveći problem savremenog pčelarstva (McMenamin i Genersch, 2015). Usled nedostatka efikasnog načina kontrole ovog parazita, infestirana pčelinja društva uginu za 2 do 3 godine. Zbog gotovo globalne distribucije (Boncristiani i sar., 2021), *Varroa* predstavlja vodeći uzrok slabljenja i gubitaka pčelinjih zajednica (Stanimirović i sar., 2019). Parazitirajući na pčelama, *Varroa* izaziva ozbiljne zdravstvene probleme kod pčela i to direktno, jer se hrani primarno njihovim masnim tkivom (Ramsey i sar., 2019), koje predstavlja glavni imunogeni organ gde je ekspresija gena za imunitet najviša, čime ih iscrpljuje i remeti njihove metaboličke procese, pre svega metabolizam proteina

(Alaux i sar., 2011), ali i indirektno, jer je vektor i/ili aktivator brojnih pčelinjih virusa koji deluju imunosupresivno, dovode do skraćenja životnog veka pčela i konačno, do kolapsa pčelinjih zajednica (Di Prisco i sar., 2016; Francis i sar., 2013; Zhao i sar., 2019). Najštetnije dejstvo na pčele imaju pčelinji krpelj i virus bolesti deformisanih krila (*Deformed Wing Virus*, DWV) zajedno jer su najčešći uzrok pčelinjih gubitaka na globalnom nivou u poslednjih 50 godina (Di Prisco i sar., 2016; Stanimirović i sar., 2019; Zhao i sar., 2019).

Metode koje se najčešće koriste za merenje stepena infestacije pčelinjih društava grinjama *Varroa* su metoda rolovanja sa prah šećerom (*sugar shake*) koja se može primeniti i sa sojinim brašnom (Ogihara i sar., 2020), zatim metoda ispiranja alkoholom, kao i metoda zasnovana na prisustvu mrežastih donjih ploča u košnicama koje su opremljene lepljivim umetcima.

Zbog velike rasprostranjenosti varoe među pčelinjim kolonijama, velika pažnja je poklonjena uvođenju odgovarajućih metoda za njihovo suzbijanje. Supstance koje se koriste za kontrolu grinja obično se klasifikuju u dve grupe: sintetički i prirodni akaricidi (Rosenkraz i sar., 2010). Sintetički akaricidi kao npr. kumafos (organofosfat), tau-fluvalinat, flumetrin (piretroid) i amitraz (formamidin) su u širokoj upotrebi poslednjih decenija, ali sa promenljivom efikasnošću. Na žalost, delimično se ovi preparati zadržavaju unutar košnice i mogu da ispolje negativne efekte na pčele i leglo (Mullin i sar., 2010) kao i da kontaminiraju pčelinje proizvode (Wallner, 1999) sa potencijalnim zdravstvenim rizikom za potrošače (Radaković i sar., 2013; Stanimirović i sar., 2005). Važno je i naglasiti da nijedna metoda suzbijanja varoa krpelja, koja je korišćena i ispitivana do sada, ne može ispuniti sve potrebne kriterijume: da bude bezbedna po pčele, da ima visoku efikasnost protiv varoe i da bude jednostavna za primenu. Zbog toga se sve više radi na uvođenju formulacija prirodnog porekla koje su prilično efikasne, bez neželjenih efekata na razvoj i produktivnost društava. Takvi preparati su na bazi organskih kiselina (oksalna, mravlja, mlečna), eteričnih ulja (timol, mentol, kamfor, eukaliptol itd.) (Jovanović i sar., 2021; Stanimirović i sar., 2017) i litijum soli (Stanimirović i sar., 2021) a glavna prednost ovih prirodnih jedinjenja jeste smanjen rizik od zagađenja pčelinjih proizvoda (Bogdanov, 2006; Floris i sar., 2004).



Slika 2. *Varroa destructor* na pčeli (<https://images.squarespace-cdn.com>).

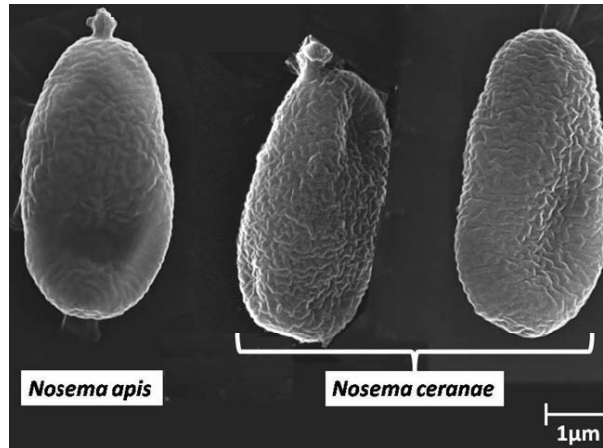
2.4. Nozemoza

Veoma često kao uzrok gubitaka pčelinjih društava navode se mikrosporidije iz roda *Nosema* (Slika 3) i to vrste: *N. ceranae*, najčešće prisutna i globalno rasprostranjena i *N. apis* koja preovladava nad *N. ceranae* samo u regionima sa hladnom klimom. U Srbiji i zemljama u okruženju u pčelinjim društvima dominira vrsta *N. ceranae* (Stevanović i sar., 2011; 2013, 2016; Tarić i sar., 2019). Proučavanje karakteristika nozemoze u Srbiji u periodu 2008-2012 (Stevanović i sar., 2013) pokazala su da je revalencija *N. ceranae* je kontinuirano visoka (73-98%); najviša prevalencija je u martu, od 94 do 98%, niža, ali opet značajna, prevalencija zabeležena je u oktobru (67-87%) i junu (73-91%). Sezonalnost u pojavljivanju *N. ceranae* u Srbiji utvrđena je u prvo u radu Stevanović i sar. (2013), da bi kasnije Vejnović i sar. (2018) utvrdili da sličnu godišnju dinamiku infekcije sa *N. ceranae* ima još jedan protozoarni endoparazit medonosne pčele, *Lotmaria passim*. Najveći stepen opterećenosti parazitima *N. ceranae* i *L. passim* pčele su imale zimi, a najmanje sredinom leta (Vejnović i sar., 2018). Simeunović i saradnici su otkrili da *N. ceranae* može biti uzrok za smanjenje reproduktivnog kapaciteta pčela i proizvodnje meda kao i da mlađe matice imaju veći kapacitet da kompenzuju gubitke radilica (izazvane infekcijom *N. ceranae*) (Simeunović i sar., 2014).

Molekularno-genetička istraživanja, potvrdila su negativan uticaj *N. ceranae* infekcije na zdravlje i životni vek pčela i to putem uticaja na njihove gene značajne za metabolizam, ishranu, hormonsku regulaciju, imunitet, energetske homeostazu i bihevioralno sazrevanje (Holt i sar., 2013; Lourenço i sar., 2021; Mayack i sar., 2015; Paris i sar., 2018) što posledično izaziva metaboličke poremećaje, energetske, hormonalne, nutritivne i oksidativne stres i imunosupresiju (Martín-Hernández i sar., 2018; Stanimirović i sar., 2019). Imunosupresivni efekat na pčele, *N. ceranae* ostvaruje preko različitih mehanizama, a najčešće preko uticaja na ekspresiju gena domaćina i to gena koji kodiraju sintezu antimikrobnih peptida (abecina, apidecina, defenzina i himenoptecina) i vitellogenina što su dokazala mnogobrojna istraživanja (Arismendi i sar., 2020; Badaoui i sar., 2017; Glavinić i sar., 2017, 2021a, 2021b).

Za dijagnostičke svrhe i određivanje nivoa infekcije mikrosporidijom *N. ceranae* koriste se različite metode kao što su mikroskopska metoda, molekularno-biološka metoda PCR i enzimski imunosorbentni test (ELISA). Nova metoda koju su prijavili Snow i saradnici zasniva se na obeležavanju spora fluorescentnom bojom, a zatim se metodom koja je bazirana na fluorescentnoj mikroskopiji/spektroskopiji, pomoću mobilnog telefona novih generacija (*smartphone*), detektuju i kvantifikuju spore na terenu tj. u pčelinjacima (Snow i sar., 2019). Ovakav pristup je poznat u naučnoj literaturi pod nazivom *lab on a chip* koja podrazumeva da se u minijaturni uređaj integriše jedan čip za jednu ili više analiza, koje se obično rade u laboratoriji.

Za terapiju nozemoze ne postoji idealan preparat. Ranije se koristio fumagilin, antibiotik dobijen od gljivice *Aspergillus fumigatus*, ali je po otkriću mogućnosti da dospe u pčelinje proizvode i genotoksično deluje na njihove konzumente (Stanimirović i sar., 2007; Stevanović i sar., 2008) ukinuta njegova upotreba u svim zemljama osim SAD, Kanade i Argentine, dok u Evropi nema registrovanih formulacija. Zbog toga je ispitivan potencijal brojnih preparata prirodnog porekla, ali većina nikad nije dobila primenu u praksi. Od novijih preparata, anti-nozemozni efekat dokazan je za porfirine (Ptaszyńska i sar., 2018), ekstrakte pečuraka *Agaricus blazei* (Glavinić i sar., 2021a) i *A. bisporus* (Glavinić i sar., 2021b) i vitaminsko-proteinski suplementi pod komercijalnim nazivima BEEWELL (Glavinić i sar., 2017) i B+ (Jovanović i sar., 2021).



Slika 3. Spore *N. apis* i *N. ceranae* uočene pod skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM) (preuzeto i modificirano, Ptaszyńska i sar. 2012).

2.5. Proizvodnja meda u pčelinjim društvima koja su izložena parazitima *V. destructor* i *N. ceranae*

Naučnici širom sveta izučavaju uticaj nozeme i varoe na pčelinja društva i proizvodnju meda u uslovima zaraze. U istočnoj Kanadi, *Emsen* i saradnici su uradili istraživanje vezano za količinu proizvodnje meda koji potiče iz društava sa nižim i visokim vrednostima varoe pri čemu je utvrđeno da sa porastom varoe u košnicama opada količina proizvodnje meda (*Emsen* i sar., 2013). U Džordžiji, *SAD*, *Dynes* i saradnici su ispitivali prenos varoe i produktivnost između različitih konfiguracija pčelinjaka (promenom rastojanja i vizuelnog izgleda pčelinjaka). Pratili su društva dve godine i utvrdili da je postavljanje kolonija na udaljenosti od 10m u krug dalo značajno veću proizvodnju meda, manju prisutnost varoe i smanjenu zimsku smrtnost u odnosu na košnice međusobnog rastojanja od 1m smeštene u linearne nizove (*Dynes* i sar., 2019). *Masaquiza* i saradnici su tražili vezu između infestacije varoom, higijenskog ponašanja pčela (uklanjanje uginulog ili zaraženog legla) i proizvodnje meda na različitim nadmorskim visinama Ekvadora, tačnije planinskog venca Andi. Došli su do zaključaka da je prinos meda u direktnoj vezi sa higijenskim ponašanjem. Takođe, stopa infestacije varoom i proizvodnja meda nisu u vezi sa nadmorskom visinom, dok higijensko ponašanje pčela pokazuje obrnut odnos sa nadmorskom visinom (*Masaquiza* i sar., 2021).

Štetan efekat nozeme na prinos meda u pčelinjim kolonijama je utvrđen u nekoliko ranijih studija (*Farrar*, 1947; *Fries* i sar., 1984; *L'arrivee*, 1966). Pčelinja društva opterećena nozemom su u korelaciji sa zimskim gubitkom kolonija, prolećnim opadanjem kolonija i smanjenim prinosom meda (*Farrar*, 1942; *Fries*, 1993). Zbog naglog opadanja broja pčelinjih društava a samim tim i smanjenja proizvodnje meda u Koreji, *Hong* i saradnici uradili su analize i utvrdili da je razlog čak 95% prisutnost spora nozeme u košnicama (*Hong* i sar., 2011). Slična istraživanja sprovedena u Španiji su pokazala da dolazi do značajnog smanjenja veličine društva i proizvodnje meda u košnicama koje su bile visoko opterećene patogenima (*Botías* i sar., 2013).

Iz dostupne literature, jasno je da se veliki broj istraživanja odnosi na stradanje pčelinjih društava. Neprestano se traga za novim jednostavnim i neinvazivnim metodama za monitoring bolesti pčela. Takođe, ispituje se efikasnost novih preparata za suzbijanje zaraza pčela, kao i njihov uticaj na razvoj i produktivnost pčelinjeg društva i pojave rezidua preparata u pčelinjim proizvodima. Deo istraživanja je usmeren na praćenje prisustva pesticida u medu. Mnoga istraživanja su usmerena i na proveru prinosa meda u pčelinjim društvima koja su izložena različitim stresorima.

Međutim, pregled odgovarajuće literature jasno ukazuje da ne postoje opsežnije studije koje bi dale uvid u kvalitet meda koji potiče od društava opterećenih zarazom, kao ni studije koje ispituju postojanje veze između zaraze pčelinje kolonije i hemijskog sastava, odnosno fizičko-hemijskih karakteristika meda.

2.6. Med

2.6.1. Definicija, nastajanje i vrste meda

*“Med je prirodna, slatka supstanca koju proizvode medonosne pčele (*Apis mellifera*) preradom nektara biljaka, ili iz sokova sa živih delova biljaka, ili sakupljanjem ekskreta insekata koji se hrane sišući sokove sa živih delova biljaka, koji pčele sakupljaju, prerađuju i dodaju sopstvene specifične supstance, dehidriraju i odlažu u ćeliju saća do sazrevanja.”* Ovako je definisan med u “Pravilniku o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela” (2015). Med je definisan na sličan način i u Codex Alimentarius-u kao i u evropskoj regulativi (*Council Directive 2001/110/EC*). Iz ove definicije proizilazi da je med kao namirnica i biljnog i životinjskog porekla.

Proces proizvodnje meda započinju medonosne pčele radilice sakupljanjem nektara i medljike sa biljaka i odnošenjem u svoja pčelinja društva. Ove sokove (nektar i medljiku) pčele u košnicu donose u mednoj voljci, pri čemu ga obogaćuju sekretom iz svog tela (enzimima), predaju tzv. kućnim pčelama koje primljeni nektar počinju da pretvaraju u med. U pčelinjem društvu, med nastaje od nektara u složenom procesu. U ovom procesu, dolazi do gubitka znatne količine vode iz nektara i dodavanja enzima (invertaza, diastaza, amilaza, i dr.) koji potiču iz pljuvačnih žlezda pčela, pri čemu se saharoza razgrađuje do glukoze i fruktoze. Posle procesa zgušnjavanja, pčele prenose i skladište nektar u druge ćelije saća. U njima se završava sazrevanje i nastaje zreo med koji pčele zapečaćuju voštanim poklopcićima. Med je spreman za vađenje iz košnice kada je većina ćelija saća zatvoreno. Na **Slici 4** prikazani su različiti uzorci meda koji su analizirani u toku izrade doktorske disertacije.

Svaka vrsta medonosne biljke ima specifičan nektar, što dovodi do razlika među medovima. Prema različitim kriterijumima, med se može razvrstati na: sortni (monofloralni) med, cvetni (livadski-polifloralni) med, medljikovac (šumski) i „pekarski“ med (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015).

Sortni (monofloralni) med nastaje od određene biljne vrste čiji je doprinos u nerastvorljivom delu sa najmanje 45% polenovih zrna i daje karakterističan ukus i miris izvorne biljke (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015). Sa druge strane, cvetni (livadski-polifloralni) med nastaje od nektara cvetova različitih vrsta livadskih biljaka. Medljikovac (tamni šumski med) pčele proizvode od mediljke, slatkog soka iz zalistaka i četina bora kao i drugih četinara, zatim iz lista hrasta, ili lučenjem biljnih vaši (*Hemiptera*).

Pekarski med je med koji je zbog neadekvatnog kao i predugog čuvanja ili izlaganja previsokoj temperaturi izgubio najvrednija svojstva meda, pa se koristi u industriji (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015).



Slika 4. Različiti uzorci meda.

2.6.2. Hemijski sastav meda

Med je po hemijskom sastavu veoma složena smeša koja sadrži više od 200 sastojaka (Aliferis i sar., 2010; Cajka i sar. 2007; Kaškoniené i sar., 2010a). Neki od ovih sastojaka u medu potiču iz pčela, neki od medonosnih biljaka, a neki sazrevanjem meda u saću (Burlando i Cornara, 2013).

Med se najvećim delom sastoji od ugljenih hidrata (70-80%, w/w) i vode (10-20%,w/w). Pored šećera, med sadrži fenolna jedinjenja (flavonoidi i fenolne kiseline), slobodne aminokiseline, proteine (uključujući i enzime), minerale, organske kiseline, hormone, vitamine, pigmente, lipide, sterole i fosfolipide. Od ovih jedinjenja potiču organoleptička i nutritivna svojstva meda, iako su prisutni sa manje od 1% (Pita-Calvo i Vázquez, 2018; Singhal i sar., 1997). Vrsta nektara utiče na hemijski sastav meda (Doner, 1977; Pita-Calvo i Vázquez, 2017).

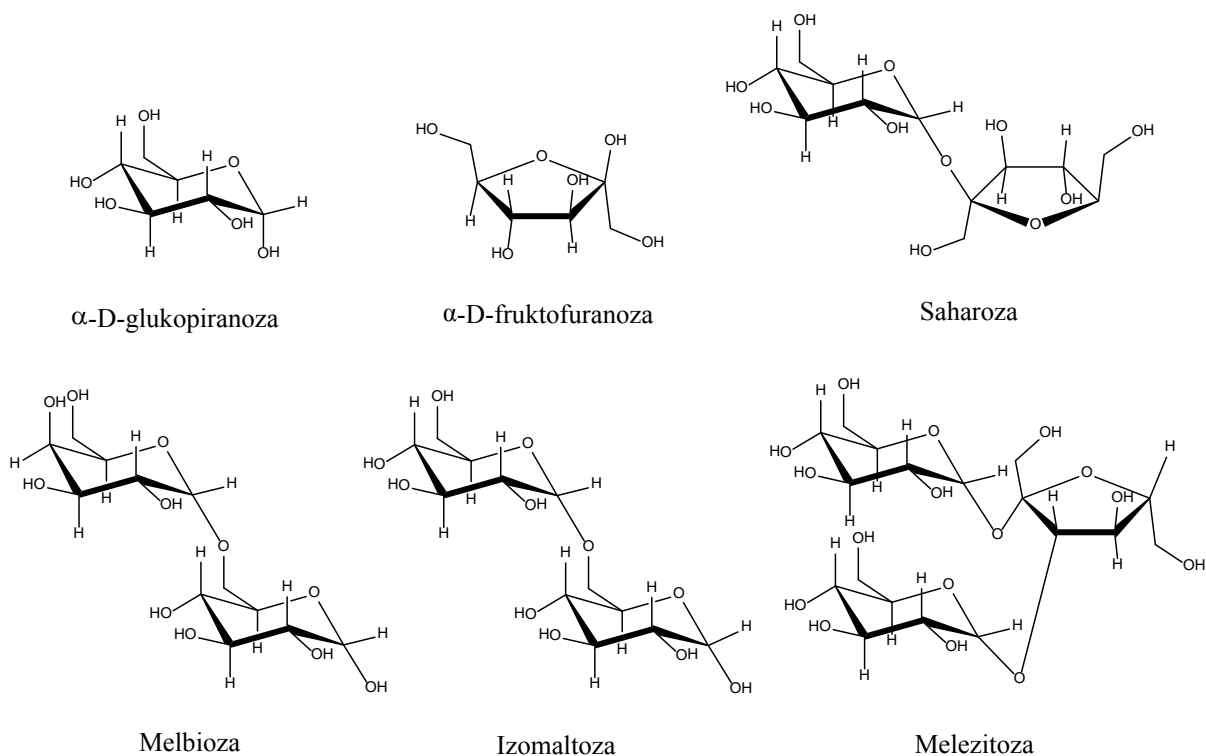
Tabela 1. Hemijski sastav meda (%) (Santos-Buelga i González-Paramás, 2017).

	Hemijski sastav meda (%)	
	prosek	opseg
Voda	17,90	13,21-26,50
Fruktoza	39,44	37,07-42,65
Glukoza	28,15	18,20-32,10
Saharoza	3,19	0,36-16,57
Drugi šećeri	8,50	0,10-16,00
Minerali	0,36	0,11-0,72
Aminokiseline, proteini	1,13	0,22-2,93
Vitamini, enzimi	<0,10	
Organske kiseline	0,50	0,20-0,80
Fenolna jedinjenja	0,10	0,02-0,20

2.6.2.1. Ugljeni hidrati u medu

Glavni sastojak meda su ugljeni hidrati sa udelom od 70-80%, tako da je med po hemijskom sastavu presićeni rastvor šećera. Oko 85-95% ukupnog sadržaja šećera u medu predstavljaju monosaharidi (fruktoza i glukoza), dok su manje zastupljeni disaharidi, trisaharidi (Pita-Calvo i Vázquez, 2017). Hemijske strukture pojedinih šećera su prikazane na **Slici 5**.

Zbog prisustva prostih šećera u velikoj koncentraciji med se lako resorbuje u organizmu. Na međusobne odnose pojedinih šećera u medu utiče odnos šećera u cvetnom nektaru, kao i prisustvo i aktivnost enzima invertaze koji katalizuje hidrolizu saharoze na fruktozu i glukožu. Postoje razlike u sastavu šećera između medljikovca i drugih vrsta meda. Medljikovac sadrži više oligosaharida, uglavnom trisaharida, melezitaze i rafinoze (Wang i Qing, 2011).



Slika 5. Primeri hemijskih struktura pojedinih šećera u medu

Metodama kao što su gasna hromatografija (GC) i tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) moguće je identifikovati ugljene hidrate u različitim uzorcima meda (Alghamdi i sar., 2020).

Za utvrđivanje autentičnosti meda koristan pristup u pogledu načina proizvodnje može se postići ukoliko se definiše šećerni profil meda. Falsifikovanje meda se postiže dodatkom različitih vrsta skrobnih sirupa, najčešće visokofruktoznog i glukoznog sirupa dobijenih hidrolizom krompirovog, kukuruznog ili pirinčanog skroba. Šećerni sirup sadrži znatno više saharoze, maltoze i maltotrioze od prirodnog meda. Stoga su ovi šećeri, kao i odnosi fruktoza/glukoza, saharoza/turanoza, maltoza/turanoza i maltoza/izomaltoza pogodni indikatori za otkrivanje lažnog meda (Vasić, 2019).

Propisano je da najmanja količina glukoze i fruktoze iznosi 60 g/100g u cvetnom medu, a u medljikovcu 45 g/100 g meda, dok je maksimalna količina saharoze za sve vrste cvetnih medova 5 g/100 g meda (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015).

2.6.2.2. Voda u medu

Osim ugljenih hidrata, najzastupljeniji sastojak meda je voda koja je prisutna sa manje od 20%. Takva vlažnost garantuje da je med dobrog kvaliteta i da se može dugo čuvati. Veći sadržaj vode je utvrđen u nekim vrstama monofloralnog meda, na primer med od vreska, med od suncokreta i med od trešnjinog drveta (Persano Oddo i Piro, 2004b). Sadržaj vode zavisi od mnogih faktora među

kojima su: botaničko poreklo meda, temperatura i vlažnost vazduha u košnici, klimatski uslovi prilikom proizvodnje meda, kao i uslovi prilikom ceđenja i skladištenja meda.

Sadržaj vode je važan parametar stabilnosti i trajnosti meda, jer ako je povećan može dovesti do nepoželjne fermentacije (da Silva i sar., 2016).

2.6.2.3. Aminokiseline, proteini i enzimi u medu

Aminokiseline u medu

Med sadrži slobodne aminokiseline, pored vezanih u obliku proteina. Sadržaj slobodnih aminokiselina u medu čini oko 1%. Ove aminokiseline su pretežno iz polena, dok manji deo dospeva u med iz pčela u toku njihove prerade nektara. U medu je utvrđeno prisustvo 26 aminokiselina, esencijalnih i neesencijalnih (Hermosin i sar., 2003; Pérez i sar., 2007).

Prolin kao jedan od indikatora zrelosti meda, je najprisutnija aminokiselina i zastupljena je sa 50-85% svih slobodnih aminokiselina prisutnih u medu (Hermosin i sar., 2003; Truzzi, 2014). U med dospeva iz pčela u toku prerade nektara. Iako sadržaj prolina nije zakonski obavezan indikator kvaliteta, neke laboratorije ga koriste u kontroli meda pri čemu autentični med mora sadržati više od 180 mg/kg (Bogdanov, 2011). Manja količina prolina prirodno je zastupljena u nekim vrstama meda, kao što je bagremov.

Sadržaj slobodnih aminokiselina u medu može se odrediti pomoću tečne hromatografije visokih performansi (HPLC) i gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) (Széles i sar. 2008). Predloženo je da se aminokiselinski profil meda koristi kao parametar za određivanje njegovog geografskog i botaničkog porekla (Anklam, 1998; Davies i Harris, 1982; Gilbert i sar., 1981).

Proteini u medu

Proteini su komponenta koja je zastupljena u medu u količini od 0,2-0,7%. Proteini u medu su životinjskog (2/3 od ukupnih proteina meda je od pčela) i biljnog porekla (1/3 od ukupnih proteina potiče od polena) (Nazarian i sar., 2010). Faktori koji utiču na sadržaj proteina u medu su botaničko i geografsko poreklo, zatim način prerade i starost meda. Metoda koja se koristi za analizu proteina u medu je jednodimenzionalna i dvodimenzionalna elektroforeza (*SDS-PAGE*) (Bocian i sar., 2019), kao i tečna hromatografija kuplovana masenom spektrometrijom (Chua i sar., 2013). Za određivanje ukupnih proteina koriste se spektrofotometrijske metode, Bradford-ova i Lorijeva metoda (Lowry) (White i Rudyj, 1978).

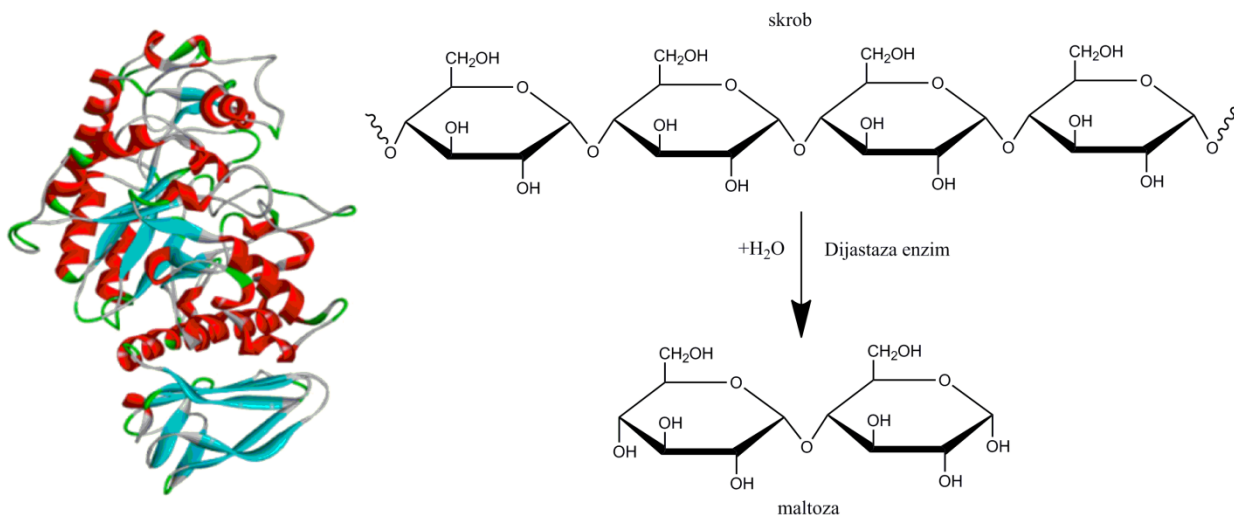
Proteini u medu, koji su pčelinjeg porekla, potiču iz hipofaringalnih žlezda pčele i dospevaju u med prilikom prerade nektara i medljike (Won i sar., 2008; Nazarian i sar., 2010). Sa druge strane manji deo čine proteini biljnog porekla koji potiču od polena (Baroni et al., 2002; Iglesias et al., 2006; Nazarian i sar., 2010). Oko 23% ukupnog sadržaja proteina u medu čini glikoprotein matičnog mleča, Apalbumin 1 (Bilikova i Simuth, 2010).

Enzimi u medu

Iako med sadrži male količine enzima oni su značajan sastojak. Delimično potiču od pčela i u med dospevaju tokom prerade nektara, a neki potiču direktno iz polena i nektara. Aktivnost enzima je indikator kvaliteta meda i može služiti za proveru njegove autentičnosti (Babacan i Rand, 2007). Na aktivnost enzima u medu utiče botaničko poreklo (Persano Oddo i sar., 2004a). Najveći deo enzima u med ekskretuju pčele, a pretpostavlja se da na to najveći uticaj ima različit stepen fiziološkog razvoja hipofaringalnih žlezda pčele tokom sezone. Najznačajniji enzimi u medu su: invertaza (α -glukozidaza), dijastaza (α -amilaza), katalaza i glukozo oksidaza.

Najveća uloga invertaze (α -glukozidaze) je u reakcijama u toku prerade nektara, kao i usled promena koje se dešavaju u sadržaju ugljenih hidrata tokom skladištenja meda. Promene koje se dešavaju u šećerima su hidroliza saharoze na glukozu i fruktozu, kao i transglikozidazne reakcije pri čemu nastaju viši šećeri (Bonvehí, 2000). Aktivnost invertaze je pokazatelj svežine meda i čuvanja u neodgovarajućim temperaturnim uslovima.

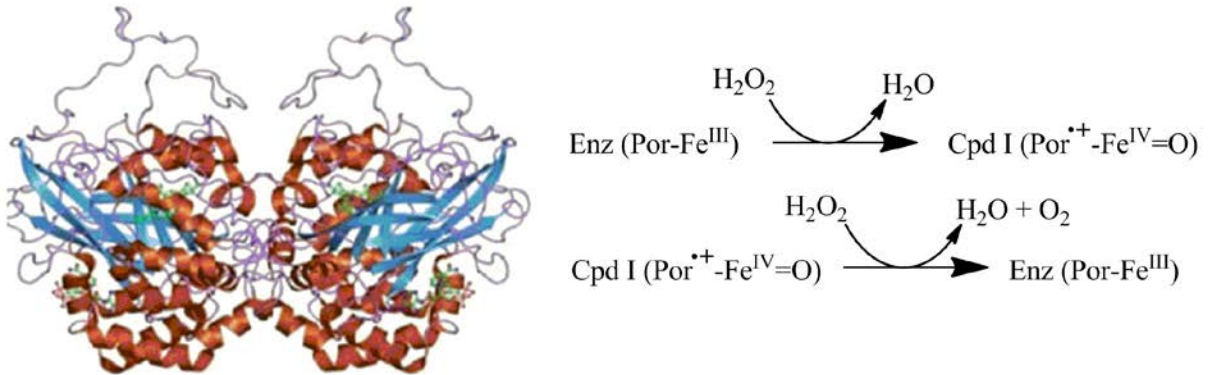
Aktivnost dijastaze (α -amilaza) je jedan od najznačajnijih pokazatelja svežine i kvaliteta meda tokom kontrolnih provera (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015). Dijastaza katalizuje je hidrolizu skroba do maltoze, što je prikazano na **Slici 6**. U neodgovarajućim uslovima skladištenja meda aktivnost dijastaze se smanjuje (Kadir i sar., 2009; Nagai i sar., 2009). Određivanje aktivnosti dijastaze je parametar procene kvaliteta meda, koji propisuje zakonska regulativa naše zemlje, kao i evropska. Vrednost dijastaznog broja (u jedinicama po Gotheu) mora biti najmanje 8 DN, odnosno za med poreklom iz tropskih krajeva 3 DN.



Slika 6. Struktura i reakcija enzima dijastaze (Janeček, 2014).

Katalaza i glukozo oksidaza utiču na antimikrobne osobine meda. Za razliku od glukozo oksidaze koja potiče iz pčela, katalaza potiče iz polena. Glukozo oksidaza katalizuje oksidaciju glukozu u glukonsku kiselinu i tokom ove reakcije nastaje vodonik-peroksid. Katalaza katalizuje razgradnju vodonik-peroksida pri čemu nastaju voda i kiseonik što je prikazano na **Slici 7**. Stoga koncentracija vodonik-peroksida u medu zavisi od odnosa koncentracija enzima glukozo oksidaze i katalaze. Koncentracija katalaze je u obrnutoj srazmeri sa koncentracijom vodonik peroksida, dok

koncentracija glukoze oksidaze je u direktnoj srazmeri sa koncentracijom vodonik-peroksida u medu. (Dustman, 1971; Weston, 2000)



Slika 7. Struktura i reakcija enzima katalaze (Nimse i Pai, 2015).

2.6.2.4. Fenolna jedinjenja

Fenolna jedinjenja su veoma rasprostranjeni sekundarni metaboliti biljaka pri čemu poseduju izraženo antioksidativno, antibakterijsko, antiinflamatorno, antialergijsko i antikancerogeno dejstvo zbog čega su važna za sprečavanje i lečenje različitih bolesti kod ljudi (Khalil i Sulaiman, 2010; Merken i sar., 2000). Fenolna jedinjenja u med dospevaju posredstvom nektara, kao i preko polena i propolisa. Med sadrži znatne količine prostih fenola i polifenola od kojih su najzastupljenije fenolne kiseline i flavonoidi. Botaničko poreklo nektara znatno utiče na sadržaj fenolnih jedinjenja u medu (Gheldof i Engeseth, 2002b).

Fenolne kiseline koje su zastupljene u medu se dele na dve grupe: grupa hidroksi-benzoeve kiseline (galna i elaginska kiselina) i grupa hidroksi-cinaminske kiseline (kofeinska, *p*-kumarinska, ferulinska i sinapinska kiselina) čiji primeri su prikazani u **Tabeli 3**. Pored fenolnih kiselina zastupljeni su i njihovi estri kao i neki drugi estri, npr. metil-4-hidroksibenzoat, metil-vanilat i metil-siringat koji su pronađeni u kestenovom, bagremovom, suncokretovom i medu od uljane repice (Escriche i sar., 2014; Gašić i sar., 2004b). Fenolne kiseline u medu se određuju pomoću tankoslojne, gasne i tečne hromatografije (Gómez-Caravaca i sar., 2006; Yao i sar., 2003).

U medu je ukupan sadržaj flavonoida 2-10% od ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja (Can et al., 2015). Najčešće zastupljeni flavonoidi u medu su pinocembrin, kampferol, apigenin, galangin, kvercetin, mircetin, krisin, luteolin, pinobanksin i hesperitin (**Tabela 3**) (Beretta et al, 2005; Pita-Calvo i Vázquez, 2018). Flavonoidi u medu se određuju pomoću tečne hromatografije kuplovane masenom spektrometrijom (LC-MS) i kapilarnom elektroforezom (Amiot i sar, 1989; Delgado, 1994; Ferreres i sar., 1994a i 1994b).

2.6.2.5. Organske kiseline

Poznato je da blaga kiselost meda (pH 3,5-6,5) potiče od organskih kiselina u medu. Med sadrži oko 0,5% organskih kiselina. Najzastupljenije nearomatične organske kiseline su glukuronska, oksalna, ćilibarna, buterna, sirćetna, fumarna, limunska, vinska, jabučna, mlečna i maleinska kiselina. Veliki broj organskih kiselina se u medu može naći i u obliku estara. Organske kiseline u medu potiču iz nektara i medljike ili mogu nastati kao posledica hemijskih procesa tokom skladištenja meda (da Silva i sar., 2016).

Glukuronska kiselina koja je najzastupljenija u medu nastaje u reakciji oksidacije glukoze koju katalizuje glukozo oksidaza (Mato i sar., 2003 i 2006a; Suarez-Luque i sar., 2002). Ukupna kiselost je bitan indikator kvaliteta meda, jer ima značajnu ulogu u organoleptičkim (boja i ukus), fizičkim i hemijskim (pH-vrednost i električna provodljivost) karakteristikama meda (Bogdanov, 1999). Organske kiseline u medu se određuju pomoću gasne i tečne hromatografije kuplovane masenom spektrometrijom (LC-MS) (Mato, 2006a i 2006b; Wilkins i sar, 1995).

2.6.2.6. Minerali

Nektarski med sadrži 0,1-0,2% minerala, a medljikovac i preko 1%. Neophodno je uzeti u obzir botaničko i geografsko poreklo meda prilikom razmatranja njegovog mineralnog sastava. Pčelinja paša tj.uslovi životne sredine u kojima se odvijala, kao i postupci prerade meda takođe utiču na sastav minerala u medu (Bogdanov, 2007). Kalijum je najzastupljeniji metal u medu, a prisutni su i Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn i Mn (Pohl, 2009).

Posredstvom korena biljke, minerali iz zemljišta dolaze do delova biljke sa kojih pčele sakupljaju nektar pa tako dospevaju i u med. Sadržaj elemenata u medu se koristi kao pokazatelj kvaliteta, biljnog i geografskog porekla, kao i zagađenja područja gde su pčele prikupile nektar (Jovetić i sar., 2017; Kilić i sar., 2017; Pohl, 2009).

Sadržaj minerala u medu utiče na električnu provodljivost rastvora meda koja se koristi kao indikator njegovog botaničkog porekla (Bogdanov, 2004). Teški metali u medu (Cd, Pb, Cr i Ni) pokazuju nivo zagađenja lokaliteta gde su pčele sakupile nektar (Porrini i sar., 2003). Minerali i metali u tragovima u medu se određuju pomoću ICP metode (Induktivno spregnute plazme sa atomskom emisionom spektroskopijom (ili masenom spektrometrijom)) (Gonzalez-Miret i sar., 2005; Nalda i sar., 2005).

2.7. Pojam fluorofore i glavne fluorofore u medu

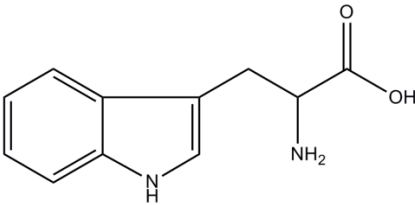
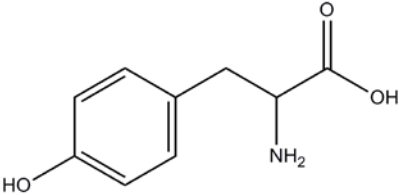
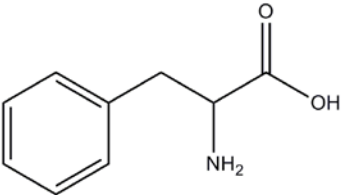
Fluorofore su molekuli ili grupe atoma u molekulu koji fluoresciraju posle pobuđivanja apsorbovanom svetlošću UV-Vis (ultraljubičast i vidljivi opseg, 250-450nm), a potom emituju u UV/VIS/NIR spektralnom regionu (280-700nm). Ukupna fluorescencija uzorka zavisi od koncentracije fluorofore ali i od ostalih apsorbujućih supstanci u uzorku. Intenzitet fluorescencije može da zavisi od raznih faktora kao što su lokalno okruženje fluorofore, temperatura, pH-vrednost, zamućenost, koncentracija i polarnost rastvarača. Fluorescencija može poticati od fluorofora koje se

prirodno nalaze u samom uzorku ili od specifičnih vezujućih molekula koji se dodaju u uzorak pre merenja.

Nosioci fluorofora su aromatična ili heterociklična jedinjenja s konjugovanim dvostrukim vezama, pri čemu sve te supstance poseduju simetrične, krute, planarne molekule. Klasični primeri fluorescirajućih aromatičnih ugljovodonika su benzen, naftalen, antracen, akridin; molekuli planarne strukture su fluorescein, rodamin B ili akridinske boje; heterociklična jedinjenja su oksazin, azin, tiazin i sl.

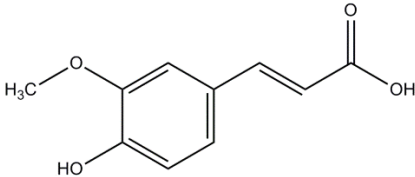
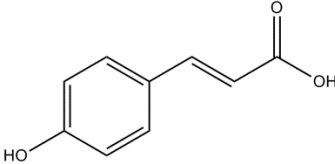
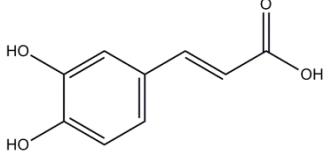
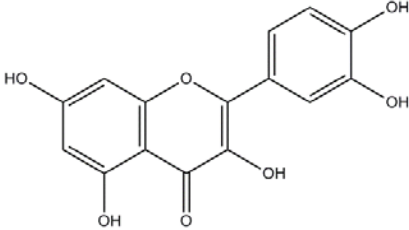
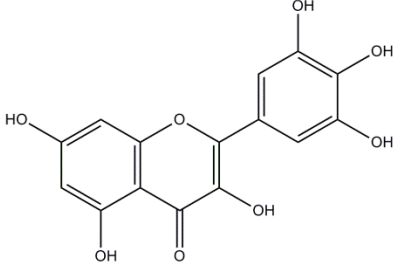
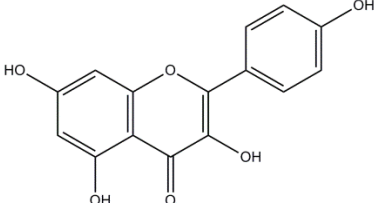
Ranija istraživanja su pokazala da se fluorescencija uspešno može koristiti u analizi uzoraka meda radi provere adulteracije, kao i klasifikacije na osnovu botaničkog i geografskog porekla (Dramićanin i sar., 2018; Hao i sar., 2021; Karoui i sar., 2007; Kasianchuk i sar., 2019). Poznato je da u medu postoje dve dominantne vrste fluorofora, jedna koja potiče od proteina i druga koja potiče od fenola (Lenhardt i sar., 2015). Fluorescencija proteina potiče od tri aminokiseline: triptofana, fenilalanina i tirozina. Fenilalanin pokazuje slabu fluorescenciju, tirozin nešto veću, a fluorescentni signal proteina potiče uglavnom od indolne grupe triptofana koji je fluorofora sa najvećim intenzitetom emisije (Bouseta i sar., 1996) čiji ekscitacioni i emisioni maksimumi su prikazani u **Tabeli 2**. Fluorescentne karakteristike triptofana zavise od njegove lokacije u samom proteinu. Ukoliko se nalazi u okviru hidrofobnog jezgra proteina smanjeni su uticaji rastvarača, dok ako je na površini proteina dolazi do reagovanja na promene u rastvoru.

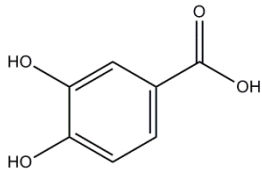
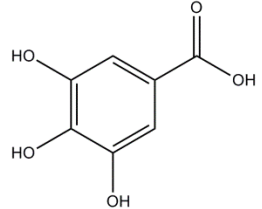
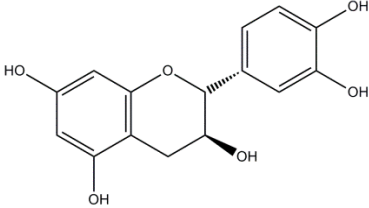
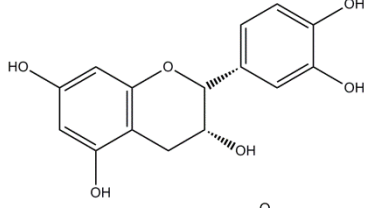
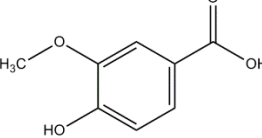
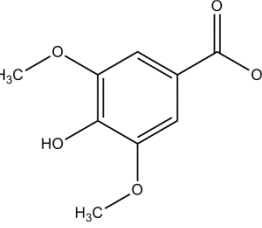
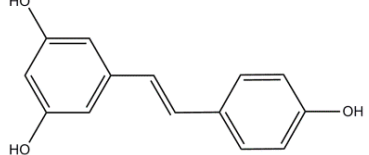
Tabela 2. Vrednosti ekscitacionih i emisionih maksimuma triptofana, tirozina i fenilalanina (Lakowicz, 1999).

Aminokiseline	Strukturne formule	Ekscitacioni maksimum (nm)	Emisioni maksimum (nm)
Triptofan (Trp)		280	350
Tirozin (Tyr)		275	304
Fenilalanin (Phe)		260	282

Kao što je navedeno ranije, druga značajna vrsta fluorofora u medu potiče od fenolnih jedinjenja i prema literaturnim podacima koji su prikazani u **Tabeli 3** (Rodriguez-Delgado i sar., 2001), fenolne komponente u medu imaju maksimum ekscitacije u opsegu između 265 - 335 nm i maksimum emisije od 358 - 426 nm. Fenolna jedinjenja u medu koja fluoresciraju: katehin, epikatehin, resveratrol, kvercetin, kampferol, miricetin, vanilinska, galna, *p*-hidroksibenzoeva, protokatehinska, siringinska i elaginska kiselina, *p*-kumarinska, kofeinska, ferulinska i sinapinska kiselina (Sádecká i Tóthova, 2007; Trautvetter i sar., 2009) .

Tabela 3. Ekscitacioni i emisijski maksimumi fenolnih jedinjenja u medu ((Rodriguez-Delgado i sar. 2001; Trautvetter i sar., 2009).

Fenolna jedinjenja	Strukturne formule	Ekscitacioni maksimum (nm)	Emisijski maksimum (nm)
Ferulinska kiselina		260	422
<i>p</i> -Kumarinska kiselina		260	422
Kofeinska kiselina		262	426
Kvercetin		264	420
Miricetin		268	370
Kampferol		268	422

Protokatehuinska kiselina		270	358
Galna kiselina		278	366
Katehin		278	360
Epikatehin		278	360
Vanilinska kiselina		278	360
Siringinska kiselina		278	360
<i>trans</i> - Rezveratrol		330	374

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Procena zaraženosti pčelinjih društava krpeljom *Varroa destructor*

Za procenu zaraženosti *V. destructor* krpeljom, u ovoj disertaciji korišćena je metoda rolovanja sa prah šećerom (*sugar shake*) prikazana na **Slici 8**. Ova metoda je opisana u literaturi kao brza, jednostavna i da nije štetna za pčele (Dietemann i sar., 2013b; Gregorec i Sampson, 2019; Stanimirović i sar., 2011).

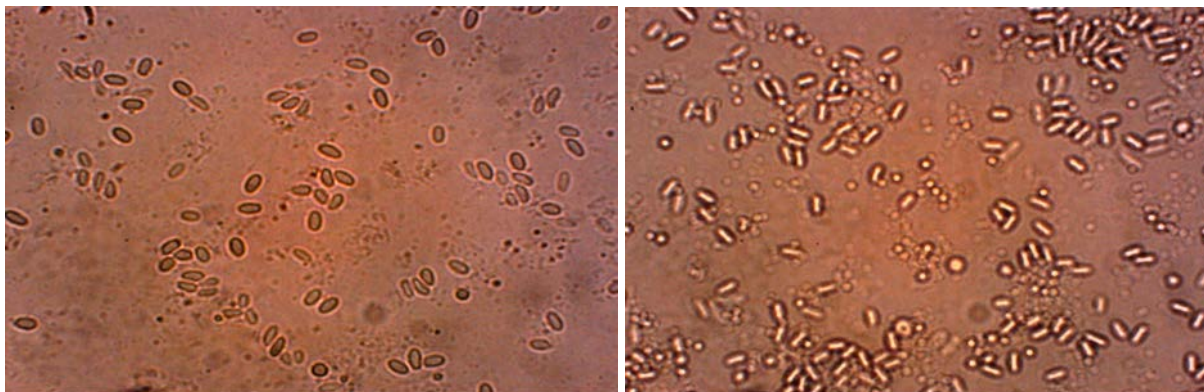
Prikupljeno je 300 pčela radilica po košnici što odgovara približno trećini tegle koja je poklopljena mrežastim poklopcem. Dodato je 10 g šećera u prahu na pčele kroz mrežu. Tegla je zatim snažno promešana, a onda je okrenuta naopako preko belog papira da bi se odvojili krpelji. Prebrojani su krpelji koji su ispali iz tegle, a dobijena vrednost podeljena brojem pčela u uzorku (300) i pomnožena sa 100 da bi se odredio broj krpelja na 100 pčela. U trenutku kada su pčele uzete iz košnice za procenu zaraženosti varoom, uzet je i med za dalje analize.



Slika 8. Metoda rolovanja sa prah šećerom (*sugar shake*) za određivanje zaraženosti pčelinjeg društva krpeljom *V. destructor* (preuzeto i modifikovano, Dietemann i sar., 2013a).

3.2. Mikroskopska detekcija spora *N. ceranae* i kvantifikacija stepena infekcije

Urađen je mikroskopski pregled uzoraka pčela radi detekcije spora nozeme u skladu sa preporukama Svetske organizacije za zdravlje životinja (*World Organization for Animal Health, OIE*, 2017). Iz svake košnice, 30 odraslih pčela izletnica sakupljeno je sa leta košnice, a zatim su pčele zamrznute. Svaka pčela je macerirana sa 2-3 ml vode, a zatim je urađen pregled dobijene suspenzije pod mikroskopom (uvećanje x400). Na **Slici 9** se može videti mikroskopski pregled gde je utvrđeno prisustvo spora roda *N. ceranae*. U trenutku kada su uzete pčele za procenu zaraženosti nozedom, uzet je i med za dalje analize.



Slika 9. Mikroskopski pregledi macerirane pčele sa utvrđenim prisustvom spora *N. ceranae*.

3.3. Uzorci meda

U okviru doktorske disertacije prikupljeno je i analizirano 61 uzorak meda. Osnovni podaci analiziranih uzoraka su prikazani u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Spisak uzoraka meda: botaničko i geografsko poreklo, utvrđena zaraženost društva i godina proizvodnje.

Broj uzoraka	Botaničko poreklo	Geografsko poreklo	Utvrđena zaraženost društva	Godina proizvodnje
17	Lipa (<i>Tilia</i> L.)	Fruška Gora	bez zaraze	2015
5	cvetni (polifloralni)	Beograd*	<i>Nosema ceranae</i>	2016
5	cvetni (polifloralni)	Vrčin	<i>Varroa destructor</i>	2016
8	cvetni (polifloralni)	Beograd*	<i>Nosema ceranae</i>	2018
10	cvetni (polifloralni)	Vinča**	<i>Varroa destructor</i>	2018
16	Bagrem (<i>R.pseudoacacia</i>)	Slankamen	<i>Varroa destructor</i>	2019

* dvorište Univerziteta u Beogradu - Fakulteta veterinarske medicine;

** ogledno dobro „Radmilovac“ Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta.



Slika 10. Pčelinjak oglednog dobra „Radmilovac“ Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta.

Uzorci meda lipe (*Tilia* L.), sakupljeni na Fruškoj gori 2015. godine, dobijeni su od 17 pčelara. Svaki proizvođač je dostavio uzorak meda odmah nakon vađenja iz saća (ceđenja) i mesec dana kasnije, nakon skladištenja u buradima i pakovanja u tegle.

Tokom 2016. godine prikupljeno je pet uzoraka meda iz košnica zaraženih nozemom, iz pčelinjaka u Vrčinu, prigradskog dela Beograda. Procena nivoa infekcije kolonija nozemom je rađena u martu kada su pčelinjaci najmanje izloženi varoi (Csáki i sar., 2015), a prisutna je nozema. Zatim je, takođe tokom 2016. godine, prikupljeno i još pet uzoraka meda iz košnica zaraženih varoom iz pčelinjaka u Borči, takođe prigradskog delu Beograda. Procena stepena infestacije kolonije varoom je rađena u avgustu, jer je to vreme kada se očekuje visok nivo zaraženosti košnica (Beaurepaire i sar., 2017). Svi uzorci meda bili su multifloralni. Uzorci meda uzeti su iz komore pčelinjeg legla i čuvani u staklenim teglama na sobnoj temperaturi u mraku.

Krajem maja 2018. godine prikupljeno je 10 uzoraka meda od pčelinjih društava zaraženih krpeljom *V. destructor*. Procena stepena zaraženosti urađena je „sugarshake“ metodom odmah prilikom uzimanja uzoraka meda. Pčelinjak se nalazi na oglednom dobru „Radmilovac“ (Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta). Identifikacija botaničkog porekla svakog uzorka meda izvršena je melizopalinološkom analizom i utvrđeno je da su svi uzorci bili multifloralni. Pre svih analiza, uzorci meda su čuvani u staklenim teglama na sobnoj temperaturi, u mraku.

Osam uzoraka meda je prikupljeno tokom 2018. godine od društava zaraženih nozemom. U trenutku kada je uzet med za dalje analize, uzete su i pčele za procenu zaraženosti nozemom. Izvršena je mikroskopska detekcija spora *N. ceranae* i kvantifikacija stepena infekcije. Palinološkom analizom je utvrđeno da se radi o multifloralnim uzorcima meda.

Uzorci bagremovog meda (*R. pseudoacacia*) su skupljani tokom leta 2019. godine iz košnice koja je bila tretirana oksalnom kiselinom radi suzbijanja varoe. Za suzbijanje varoe korišćena je

metoda produžene izloženosti pčelinje košnice oksalnoj kiselini (Oliver, 2018). Naime, peškir dimenzija 37,5 cm × 23,5 cm je natopljen rastvorom oksalne kiseline, glicerina i vode (u odnosu 1: 1: 1) i položen preko gornjih šipki između kutija za legla. Ukupna količina oksalne kiseline primenjena na košnicu bila je 18 g. Trajanje lečenja je trajalo 8 nedelja počevši od 7. jula 2019. godine. Prisustvo varoe je vizuelno obavljano u vreme uzimanja uzoraka meda gde tokom perioda ispitivanja varoa nije otkrivena. Od 30. avgusta 2019. pčele su prihranjivane šećernim sirupom (gde je odnos šećera i vode bio 2:1) tri puta nedeljno tokom četiri nedelje. Uzorkovanje je počelo 9. juna a završeno 26. oktobra 2019. godine pri čemu je skupljeno 16 uzoraka iz iste košnice. Uzorci su uzimani jednom nedeljno špricom i gotovo svi su uzeti iz istog dela košnice iz nepokrivenih ćelija saća.

Svi uzorci meda su prikupljeni zajedno sa saćem iz kojih se med prirodno cedio (**Slika 11**), tako da nije došlo do dodatne kontaminacije uzoraka centrifugiranjem. Posle sakupljanja, uzorci meda su do analiza čuvani na sobnoj temperaturi i tamnom mestu. Botaničko poreklo meda je utvrđeno pomoću polenske (melizopalinološke) analize.



Slika 11. Uzorci meda sa saćem iz košnica zaraženih varoom.

3.4. Reagensi i hemikalije

U izradi ove doktorske disertacije za eksperimentalni deo korišćene su sledeće hemikalije: natrijum-hidroksid, natrijum-acetat; natrijum-karbonat; *Folin-Ciocalteu* reagens; kalijum-heksacijanoferat(II); kalijum-permanganat; cink-acetat (*Sigma-Aldrich (Munich, Germany)*); Refractive index standard kit 2 (Toluol $n_{D20} = 1,4969$ /Water $n_{D20} = 1,3330$) (*Merck KGaA, Frankfurter*); hlorovodonična kiselina (*Merck p.a.*); galna kiselina; *Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)*; goveđi serum albumin (BSA); perhlorna kiselina; akrilamid i bisakrilamid; Tris(hidroksimetil)aminometan hydrochloride (Tris HCl); natrijum dodecilsulfat; amonijum-persulfat; n-butanol; glicerol; brom fenol plavo; β -merkoptoetanol; glicin; vodonik-peroksid (*Merck*

p.a. 30%); σ -dianisidin dihidroklorid (*Sigma Aldrich D9154 (Munich, Germany)*); peroksidaza iz rena (liofilizovan prah 250 U/mg) (*Sigma-Aldrich (Munich, Germany)*); oksalna kiselina.

3.5. Utvrđivanje botaničke vrste polenskom (melizopalinološkom) analizom

Pčele tokom prikupljanja nektara, takođe mogu da prenesu polen, kao i druge mikroskopske čestice sa medonosnih biljaka u med. Melizopalinološkom analizom se na osnovu mikroskopskih tragova u medu (polen, spore mikroorganizama, voštane cevčice, čađ, čestice humusa) registruje jedinstveni otisak prsta (*fingerprint*) prirodne sredine iz koje je med sakupljen i na taj način, u kombinaciji sa drugim analizama, prilično precizno određuje geografsko i botaničko poreklo meda (Anklam, 1998). Prisustvo različitih polena u medu nije indikator autentičnosti meda jer polen može biti dodat naknadno u gotov med. Ova metoda zasniva se na utvrđivanju vrste polenovih zrna pod mikroskopom. Ograničenje polenske analize je dugo trajanje i zahteva stručnjaka koji je osposobljen za razlikovanje polenovih zrna i upućen da pčele mogu pokupiti i polen sa nemedonosnih biljaka, što sa druge strane može se koristiti kao pokazatelj geografskog porekla meda.

Polenska analiza je urađena po metodi autora Loveaux (1978) i von der Ohe (2004). Kvalitativna i kvantitativna melizopalinološka analiza izvršena je na sledeći način: 10 g uzorka je razblaženo u dH₂O, centrifugirano i rezultujući talog je premešten u mikroskopski dijapozitiv (kvarcna pločica). Nakon montiranja glicerinskim želeom, dijapozitivi su analizirani pomoću svetlosnog mikroskopa pri uvećanju $\times 400$. Procenat određenog polena kao koncentracije polena, izražen je u broju polenovih zrna na 10 g meda (PZ / 10 g), i određuje se nakon prebrojavanja polenovih zrna na približno 2,5% površine kvarcne pločice.

3.6. Fizičkohemijske karakteristike meda

Fizičkohemijski parametri, koji se određuju u okviru analiza kvaliteta i autentičnosti meda su: električna provodljivost, sadržaj vlage, specifična optička rotacija, slobodna i ukupna kiselost tj. pH vrednost (Bogdanov, 2011).

3.6.1. Određivanje električne provodljivosti

Električna provodljivost rastvora meda u destilovanoj vodi je određena metodom preporučenom od Međunarodne komisije za med (IHC) i definiše se kao provodljivost 20% vodenog rastvora suve supstance meda na 20 °C. Električna provodljivost se meri pomoću konduktometrijske ćelije merenjem električnog otpora, a rezultat se izražava u milisimensima po centimetru (mS/cm) (Bogdanov, 2011).

U destilovanoj vodi se rastvori količina uzorka koja odgovara 20,0 g anhidrovanog meda i dobijeni rastvor se kvantitativno prenese u volumetrijski sud od 100 ml i dopuni do oznake destilovanom vodom. Alikvot od 40 ml rastvora uzorka se prenese u čašu i termostatira na 20 °C, a zatim se električna provodljivost meri konduktometrom (Jenway Conductivity Meter 4310, UK) koji je prethodno proveren standardnim rastvorom (Reagecon 1413 \pm 1% μScm^{-1} na 25 °C), i izražava se u mScm^{-1} .

3.6.2. Određivanje sadržaja vode

Sadržaj vode u medu je određen prema metodi Međunarodne komisije za med (Bogdanov, 2011). Određuje se preko indeksa refrakcije korišćenjem Abbe-ovog refraktomera (Atago® 1T Abbe refraktometrom, Tokio, Japan) u odnosu na referentni standard (Refractive index standard kit 2 (Toluol nD20 = 1,4969/Water nD20 = 1,3330) Merck KGaA, Frankfurter), na 20,0 °C. Dobijene vrednosti indeksa refrakcije su korelisane sa vrednostima za vodu iz Chataway tablice da bi se dobile konačne vrednosti sadržaja vode.

3.6.3. Slobodna kiselost meda

Slobodna kiselost je određena prema metodi Međunarodne komisije za med (IHC). U 75 ml destilovane vode rastvoreno je 10 g uzorka meda, a zatim je dobijeni rastvor titrovao sa 0,1M standardnim rastvorom NaOH do pH 8,6 korišćenjem pH-metra (WTW 154 Inolab). Slobodna kiselost je izračunata prema formuli:

$$\text{Slobodna kiselost}((\text{meq})(\text{kg})) = \text{ml } 0,1\text{M NaOH} \times 10 \quad (1)$$

Slobodna kiselost se izražava u meq kiseline/kg meda.

3.6.4. Određivanje specifične optičke rotacije

Ugljeni hidrati su optički aktivne supstance koje skreću ravan polarizovane svetlosti. Na ovoj osobini se zasniva metoda merenja specifične optičke rotacije ugljenih hidrata u medu. Specifičan ugao rotacije se dobija merenjem ugla rotacije analiziranog vodenog rastvora meda (Bogdanov, 2011), a ukupna optička rotacija zavisi od koncentracija prisutnih šećera. Optička rotacija fruktoze je negativna, dok glukoze je pozitivna.

Specifična optička rotacija (SR), $[\alpha]^{20\text{ }^\circ\text{C}}$ je ugao rotacije polarizovane svetlosti meren na talasnoj dužini natrijumove D linije ($\lambda = 589,3 \text{ nm}$) na 20 °C, u vodenom rastvoru 1 dm dubine, koji sadrži 1 g/mL supstance. Specifična optička rotacija se računa pomoću formule:

$$[\alpha]^{20\text{ }^\circ\text{C}} = \frac{\alpha \times 100}{l \times p} \quad (2)$$

gde je:

α – očitana vrednost specifične ugaone rotacije

l – dužina polarimetrijske cevi, izražena u decimetrima

p – masa, izražena kao masa suve supstance.

Količina od 12 g uzorka meda (odgovara 10 g suve materije) se rastvori u destilovanoj vodi i prenese u volumetrijski sud od 100 ml. Zatim se doda 10 ml Carrez I reagensa, a potom Carrez II reagensa (Bogdanov, 2011), dopuni se do oznake i ostavi 24 sata. Nakon toga, rastvor se filtrira i termostatira na 20 °C. Polarimetrijska cev dužine 2 dm se napuni termostatiranim rastvorom i očita se

ugao rotacije (α) na polarimetru. Specifična optička rotacija se računa pomoću gore navedene formule.

Rastvor po Carrez-u I je napravljen tako što se 150 g kalijum-heksacijanoferata ($K_4(Fe(CN)_6) \times 3H_2O$) dobro rastvori i dopuni ultrarčistom vodom do 1000 ml, u volumetrijskom sudu od 1000 ml.

Rastvor po Carrez-u II je napravljen tako što se 230 g cink acetata ($Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$) prvo dobro rastvori i dopuni ultrarčistom vodom do 1000 ml, u volumetrijskom sudu od 1000 ml.

3.6.5. Određivanje šećera u medu

Za identifikaciju i kvantifikaciju šećera u medu primenjena je visoko-efikasna jonska hromatografija sa pulsno-amperimetrijskom detekcijom (HPAEC/PAD) firme Dionex (model ICS 3000). Analitička kolona CarboPac PA100, hidroksidselektivna anjon-izmenjivačka kolona (4×250 mm, od polietaretarketona, PEEK), je korišćena za razdvajanje šećera. Stacionarnu fazu su činile granule prečnika $9 \mu m$ koje se sastoje od koopolimera etilvinilbenzena i divinilbenzena (masenog udela 55%), dok je jonoizmenjivački sloj derivatizovan alkanol-kvarternim amonijum-grupama. Korišćena je pretkolona (CarboPac PA100 Guard kolona 4×50 mm) za dodatno uklanjanje nečistoća iz uzorka meda. Podešen je protok od $0,7$ mL/min, a za eluiranje su korišćene tri mobilne faze (600 mM NaOH (A), 500 mM CH_3COONa (B) i ultračista H_2O (C)) sa gradijentnim programom. Za analizu šećera u uzorcima meda korišćen je elektrohemijski (pulsnoamperometrijski) detektor: elektrohemijska ćelija sa podesivim potencijalom, Ag/AgCl referentna elektroda i Au radna elektroda. Kontrola instrumenta, akvizicija i analiza podataka su rađeni korišćenjem softverskog paketa *Chromeleon* (verzija 6,80).

Za svaki uzorak, količina od oko $0,2$ g homogenizovanog meda je rastvorena u ultračistoj vodi u koncentraciji $0,25$ g/L. Zatim je dobijeni rastvor propušten kroz špric-filter (13 mm, membrana od PTFE, $0,45 \mu m$) i prenet u vialu za autosempler.

3.7. Određivanje koncentracije ukupnih proteina Bradford-ovom metodom

Bradford-ova metoda je zasnovana na specifičnoj interakciji proteina sa bojom *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB) u kiselj sredini koja daje obojeni proizvod čija je koncentracija ("jačina" boje) proporcionalna koncentraciji proteina (Bradford, 1976). Elektrostatičke i hidrofobne interakcije su odgovorne za vezivanje molekula boje i proteina, pri čemu dolazi do promene boje iz smeđe u plavu. Ovu promenu prati promena apsorpcionog maksimuma boje sa 465 nm na 595 nm, što se meri pomoću spektrofotometra.

Bradford-ov reagens je napravljen rastvaranjem 100 mg *Coomassie Brilliant Blue* u 50 ml 95% etanola, 100 ml H_3PO_4 i vode do ukupne zapremine od 200 ml. Zatim je 100 ml ovako dobijenog rastvora razblaženo vodom do ukupne zapremine od 500 ml.

Uzorci meda (5 g) su rastvoreni u destilovanoj vodi (10 ml), a u $5 \mu L$ ovog rastvora meda dodato je $200 \mu L$ Bradfordov-og reagensa. Posle 5 min inkubacije, apsorbcija je izmerena na spektrofotometru (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan) na talasnoj dužini od 595 nm, a ukupan sadržaj proteina je određen korišćenjem standardne prave dobijene za goveđi serum albumin ($0,1-1,0$ mg/ml)

i izražen u g/kg meda. Slepa proba je pripremljena mešanjem 5, odnosno 20 μ L dejonizovane vode sa 200 μ L reagensa. Sva merenja su rađena u triplikatu, uključujući slepe probe i standardne rastvore.

3.8. Natrijum dodecilsulfat poliakrilamid gel elektroforeza (SDS PAGE)

SDS elektroforeza je korišćena za utvrđivanje profila i ispitivanje varijacija sadržaja biljnih i pčelinjih proteina u medu.

Elektroforeza je analitička metoda koja se zasniva na kretanju jona u električnom polju. Pomoću pufera se postiže pokretljivost, dok nosač može biti tečnost (slobodna elektroforeza) ili neki čvrsti nosač (zonska elektroforeza). Kod SDS PAGE elektroforeze koristi se anjonski detergent za denaturaciju proteina natrijum dodecilsulfat. Denaturisani polipeptidi imaju uniformno negativno naelektrisanje, koje je posledica vezivanja SDS-a i kreću se ka pozitivnoj elektrodi. Brzina kretanja molekula kroz gel zavisi od njihove veličine, tako da manji molekuli se kreću brže i za isto vreme putuju dalje od većih molekula. Kao rezultat elektroforeze se dobija elektroforegram koji čine proteini razdvojeni na trake po opadajućoj masi (veličini molekula), od mesta aplikovanja uzorka do kraja gela (Vujčić, 2002). Za dobro elektroforetsko razdvajanje proteina važni parametri su otpor, napon, jačina struje, koncentracija pufera, temperatura, vreme trajanja elektroforeze.

Elektroforeza je rađena na vertikalnom sistemu za elektroforezu Biostep Gel Electrophoresis Tank Vertical GV202 (Burkhartsdorf, Nemačka).

Neophodni rastvori za pripremu gelova, uzoraka i SDS PAGE elektroforeze su:

- monomerni rastvor akrilamida AA (smeša akrilamida i bisakrilamida u kojoj je zbirna koncentracija ovih supstanci 30%, a 2,7% ukupne mase čini bisakrilamid);
- pufer za razdvajajući gel (1,5 M Tris(hidroksimetil)aminometan hydrochloride (Tris HCl) pH 8,8);
- pufer za koncentrujući gel (0,5 M Tris HCl pH 6,8);
- rastvor detergenta (10% m/V natrijum dodecilsulfat);
- inicijator polimerizacije (10% m/V amonijum-persulfat);
- rastvor za nadslojavanje (n-butanol zasićen vodom);
- pufer za pripremu uzoraka 5x koncentrovan (0,25 M Tris HCl pH 6,8; 50% (v/v) glicerol; 10% (m/V) natrijum dodecilsulfat; 0,1% (m/V) brom fenol plavo; 25% (v/v) β -merkaptoetanol);
- pufer za elektroforezu (0,025 M Tris HCl pH 8,3, 0,192M glicin, 0,1% natrijum dodecilsulfat).
- rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (50% metanol, 10% etanska kiselina)
- rastvor boje (0,1% *Coomassie Brilliant Blue*, 50% metanol, 10% etanska kiselina)
- rastvor za obezbojavanje (5% metanol, 7% etanska kiselina)

Za razdvajanje proteina u medu je korišćen 10% gel za razdvajanje i 4% gel za koncentrovanje koji su pripremani od navedenih komponenti što je prikazano u **Tabeli 5**.

Tabela 5. Sastav SDS poliakrilamidnih gelova pripremanih za vertikalnu elektroforezu.

Komponente	10% gel za razdvajanje	4% gel za koncentrovanje
Monomerni rastvor akrilamida	4,8 mL	0,8 mL
Tris(hidroksimetil)aminometan HCl pH 8,8	3 mL	-
Tris(hidroksimetil)aminometan HCl pH 6,8	-	1,5 mL
Voda	4 mL	3,6 mL
Tetrametiletilendiamin	6 μ L	3 μ L
Natrijum dodecilsulfat	120 μ L	60 μ L
Amonijum-persulfat	60 μ L	30 μ L

Između staklenih ploča fiksiranih u nosaču sa distancerima nalivani su rastvori za gelove za razdvajanje. Gelovi su nakon nalivanja nadslojeni zasićenim rastvorom butanola. Po završetku polimerizacije, gelovi su ispirani dejonizovanom vodom, osušeni i nadslojeni rastvorom gelova za koncentrovanje uz uranjanje “češlja” i na taj način su pripremljeni bunari za nanošenje uzoraka. Staklene ploče između kojih se nalazi polimerizovan gel se postavljaju u kadu za elektroforezu i naliva se pufer za elektroforezu u za to predviđene odeljke kade. Uzorci meda su prvo zagrejani na 60 °C, a onda je odvojeno po 40 μ L svakog uzorka kome je zatim dodato 40 μ L vode i 20 μ L pufera za obradu uzoraka 5x koncentrovanog (pufer za uzorke) uz mešanje. Tako pripremljeni uzorci (40 μ L rastvora) su naneti u bunare mikrišpicem. Početna jačina struje je iznosila 25 mA, a posle ulaska uzoraka u gel za razdvajanje je povećana na 30 mA. Kada je elektroforeza završena, ploče se razdvajaju, gelovi se ispiraju dejonizovanom vodom i boje da bi se detektovale proteinske trake.

3.9. Određivanje aktivnosti katalaze u uzorcima meda

Aktivnost katalaze u uzorcima meda određena je metodom koju su predložili Huidobro i saradnici (2005). Rastvori neophodni za određivanje aktivnosti katalaze u medu su:

- fosfatni puferi pH 7 (0.015 M i 0.6 M);
- fosfatni pufer pH 6,1 (0.2 M);
- rastvor σ -dianisidina (rastvoreno je 20 mg σ -dianisidine dihydrochloride u 5,7 mL fosfatnog pufera pH 6,1 (0,2 M));
- rastvor peroksidaze iz rena (rastvoreno je 9,5 μ L peroksidaze u 3,4 mL fosfatnog pufera pH 6,1 (0,2 M));
- rastvor 0,1 N KMnO_4 (rastvoreno je 0,7902 g KMnO_4 u 250 mL destilovane vode);
- 105 mM H_2O_2 (rastvoreno je 3,57 g H_2O_2 u 1000 mL destilovane vode iz H_2O_2 (Merck p.a. 30%) prethodno titriran dva puta sa 0,1 N KMnO_4);
- 6N HCl (rastvoreno je 50 ml 37% HCl (Merck p.a.) sa 50 mL destilovane vode).

Uzorci meda (po 7,5 g) su rastvoreni u 4 mL 0,015 M fosfatnog pufera (pH 7), i dijalizovani tokom 22h na 4 °C u istom fosfatnom puferu. Tokom dijalize uzorci su 2-3 puta promućkani da bi se rastvor što bolje homogenizovao, a sam rastvor za dijalizu tj. 0,015 M fosfatni pufer (pH 7) je promenjen posle 10h. Nakon 22h dijalize, rastvori su prebačeni iz dijaliznog creva u volumetrijsku tikvicu od 50 mL i razblaženi do crte sa istim puferom. Ovako pripremljeni uzorci predstavljaju dijalizovane uzorke meda.

Kalibraciona kriva je dobijena pravljenjem različitih koncentracija H₂O₂ i merenjem apsorbancije rastvora na 400 nm. Aktivnost katalaze je određena na osnovu brzine nestajanja H₂O₂, koja je merena spektrofotometrijski u sistemu koji sadrži rastvor σ -dianisidin (200 μ L) i rastvor peroksidaze (100 μ L) u fosfatnom puferu pH 6,1 (6,4 mL) gde je dodat alikvot (200 μ L) dijalizovanog uzorka. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 mL 6N HCl nakon 15 min inkubacije na 37 °C, a apsorbancija merena pomoću spektrofotometra (Shimadzu UV-160 spectrophotometer (Kyoto, Japan)) na 400 nm u kivetama od 1 cm, na sobnoj temperaturi. Aktivnost katalaze uzoraka je izračunata na sledeći način:

$$K_f = k \times \frac{50}{6} \times \frac{1}{7,5} \quad (3)$$

gde je K_f - aktivnost katalaze izražena u (min⁻¹ po gramu meda) ; k – broj ponavljanja;

50 predstavlja ukupnu zapreminu (mL) dijalizovanog uzorka; 6 predstavlja zapreminu (mL) dijalizovanog uzorka koji je dodat reakcionoj smeši; 7,5 predstavlja početnu masu uzorka meda (g) koji su analizirani.

3.10. Određivanje aktivnosti dijastaze u uzorcima meda

Određivanje aktivnosti dijastaze je metoda opisana „Pravilnikom o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela” (2015). U čaši je odmereno 5 g meda koji je rastvoren u približno 7,5-10 mL destilovane vode i 2,5 mL acetatnog pufera (pH 5,3), bez zagrevanja. Dobijena smeša je premeštena u volumetrijski balon od 50 mL u kome se nalazilo 3 ml rastvora natrijum-hlorida (14,5 g NaCl je rastvoreno u destilovanoj vodi u volumetrijskom balonu do 500 ml) i razblažena destilovanom vodom do crte.

Postupak kalibracije rastvorom skroba se koristi da bi se utvrdilo koliko vode treba dodati u reakcionu smešu da bi apsorpcija joda bila od 0,745 do 0,770. Prvo je podešena nula instrumenta, a zatim pipetirano 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24 i 25 mL vode u erlenmajere date zapremine i dodato 10 mL radnog rastvora joda (22,0 g kalijum jodida rastvoreno u 30-40 mL vode u mernoj posudi od 1L, a zatim dodato 8,8 g I₂ i razblaženo vodom do 1000 ml) u svaku tikvicu. U vodeno kupatilo, koje je zagrejano na 40 °C, stavljena je jedna boca sa 10 mL vode, a druga sa 10 mL skroba. Ostavljeni su i voda i skrob da se inkubiraju 15 min. Nakon 15 min, pipetirano je 5 mL rastvora skroba i prebačeno u vodu. Sipan je dati alikvot (skroba i vode) od 1 mL u prvu konusnu tikvicu (15 ml vode i 10 mL radnog rastvora joda) i u tom trenutku je uključena štoperica. Rastvor iz erlenmajera je prebačen u odeljak za kivetu spektrofotometra (GBC UV-Visible Cintra 6, broj dela: 01-0940-00) i pročitana vrednost apsorbancije. Standardni rastvor skroba u reakciji s rastvorom joda daje intenzivno obojenje. Apsorbancija mora biti u opsegu 0,745 - 0,770. Rastvor čija apsorbancija spada u ovaj opseg je ukazivao koliko vode treba dodati uzorku meda. Drugim rečima, količina vode dobijena na ovaj način je standardno razblaženje za svaki pojedini „osnovni“ rastvor meda.

Za samo merenje dijastaze u uzorcima meda, pripremljeni su volumetrijski baloni sa odgovarajućom etiketom za vreme. U svaki balon je dodato 10 mL radnog rastvora joda i unapred određena zapremina vode. U reakciji enzima i standardnog rastvora skroba usled hidrolize nastaje plava boja joda čije se nestajanje meri u vremenu. Broj tikvica i vremenski intervali su promenljivi u skladu sa dobijenim vrednostima apsorbancije; vrednost apsorbancije treba da bude u opsegu od 0,50 - 0,770. U trenutku kada je vrednost apsorbancije oko 0,155 merenje se završava.

U vodeno kupatilo, pored erlenmajera sa 10 mL rastvora skroba, postavljen je i erlenmajer u kom se nalazilo 10 mL rastvora meda. Rastvori su inkubirani 15 min na 40 °C. Posle 15 min otpipetirano je 5 mL rastvora skroba i dodato u rastvor meda. Uključena je štoperica u vreme sipanja i izmereno vreme. Posle 2 min, uzet je alikvot (1 mL) i prebačen u prvi balon i očitana apsorbancija. Urađeno je isto za preostala vremena.

Aktivnost dijastaze je izračunata kao DN (broj dijastaze) pomoću sledeće formule:

$$DN = \frac{60 \text{ min}}{t_x} \times \frac{0,10}{0,10} \times \frac{1,0}{2,0} = \frac{300}{t_x} \quad (4)$$

gde je t_x vreme reakcije u min.

Nakon što je merenje apsorbancije završeno, nacrtan je grafik zavisnosti vrednosti apsorbancije kao funkcije vremena. Kriva regresije je iscrtana u opsegu $A = 0,155$ do $A = 0,456$ da bi se vreme t_x odredilo za $A = 0,235$. Neophodno je imati najmanje tri tačke, u rasponu od 0,155 do 0,456. Vreme potrebno da se dostigne vrednost apsorbancije $A = 0,235$ može se izračunati iz jednačine regresije i grafičke interpretacije:

$$y = a + bx \quad (5)$$

gde su a-odsečak, b-nagib, x-reakciono vreme t_x u min.

$$DN = \frac{300}{t_x} \quad (6)$$

Jedinica dijastaze odgovara aktivnosti enzima u 1 g meda, koji može hidrolizovati 0,01 g skroba za 1 sat, na 40 °C.

3.11. Određivanje ukupnih fenola (TPC)

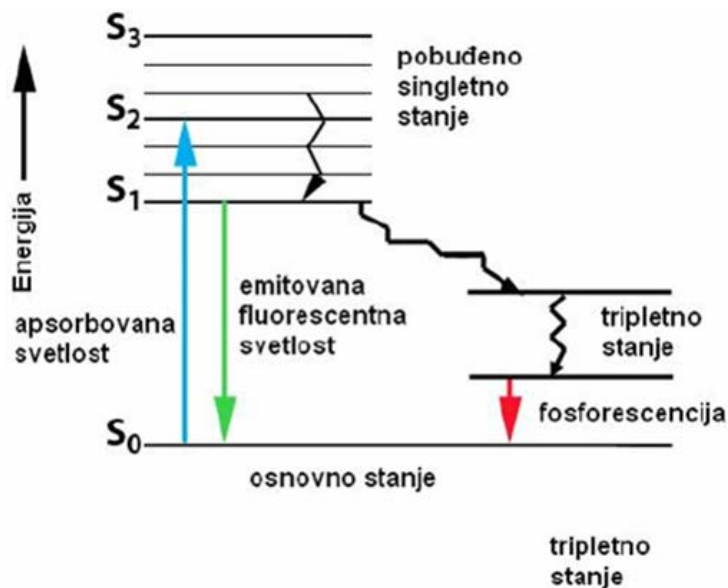
Količina svakog uzorka meda od 5 g je pomešana sa 10 ml destilovane vode, a zatim homogenizovana u ultrazvučnom kupatilu 15 min na sobnoj temperaturi, premeštena u erlenmajer od 50 ml u kome je potom dodata ultračista voda do oznake.

Ukupan sadržaj fenola (*Total Phenolic Content*, TPC) je određen spektrofotometrijski metodom *Folin-Ciocalteu* sa izvesnim modifikacijama (Singleton i Rosi, 1965). Pomešano je 0,3 ml rastvora uzorka, 6 ml dejonizovane vode i 0,5 ml *Folin-Ciocalteu* reagensa, a zatim ostavljeno 6 min da se inkubira na sobnoj temperaturi. Nakon dodavanja 3 ml 20% rastvora natrijum-karbonata, uzorak je držan na 40 °C 30 min pre nego što je apsorbancija bila izmereno na 765 nm pomoću spektrofotometra (Shimadzu UV-160 (Kyoto, Japan)). Kao standard je korišćena galna kiselina, od koje je pripremljena kalibraciona kriva u rasponu između 0 i 250 mg/L. Mešavina vode i *Folin-Ciocalteu* reagensa je korišćena kao slepa proba. Rezultati su izraženi kao mg ekvivalenta galne kiseline (mg GAE) po kg meda.

3.12. Fluorescentna spektroskopija

Fluorescentna spektroskopija (spektrofluorimetrija) je osetljiva i specifična analitička metoda koja analizira fluorescenciju uzorka. Ova metoda meri intenzitet emitovanog zračenja uzorka u funkciji talasne dužine emitovane svetlosti. Nakon apsorpcije upadnog zračenja iz UV-Vis opsega, molekul uzorka dobija određenu energiju tako da pređe iz osnovnog u pobuđeno elektronsko stanje, što je prikazano putem Jablonski dijagrama (**Slika 12**). Posle apsorpcije upadnog zračenja pobuđeni molekul se vraća u svoje osnovno elektronsko stanje, S_0 , emitujući foton u procesu.

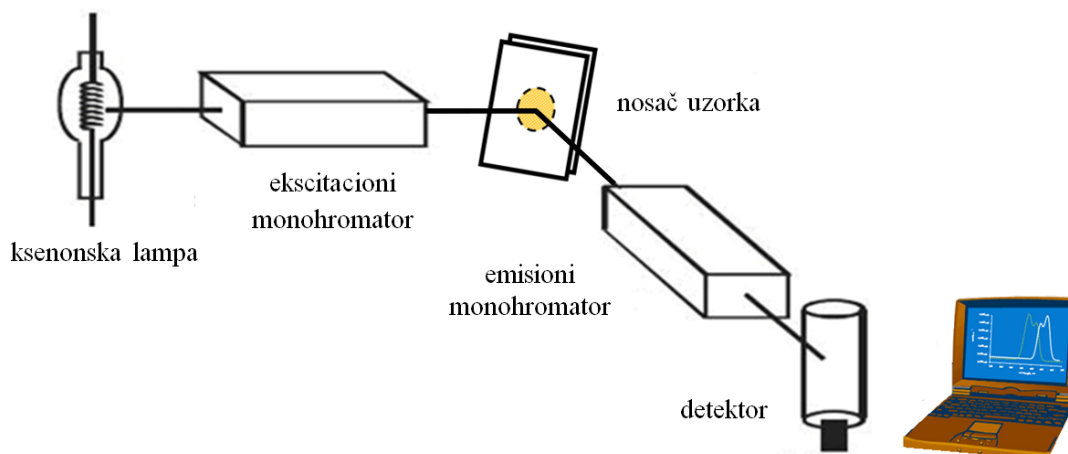
Postoje dve vrste radijacione deaktivacije molekula: fluorescencija i fosforescencija, koje nastaju nakon apsorpcije svetlosti. Razlika između ovih deaktivacija se javlja zbog različitog mehanizma nastajanja i vremena trajanja. Fluorescencija se završava odmah posle prestanka pobuđivanja, a srednji život je reda veličine od 10^{-8} do 10^{-6} s. Fosforescencija se ne završava po uklanjanju izvora pobuđivanja, a vrednosti srednjeg života su od 10^{-3} s do vrednosti nekoliko min, pa i duže.



Slika 12. Jablonski dijagram: S_0 osnovnoelektronsko stanje; S_1 , S_2 , S_3 su pobuđena elektronska stanja, a linije u okviru njih odgovaraju vibracionim nivoima.

Mehanizam fluorescencije se zasniva na principu da se molekul, posle apsorpcije zračenja i odigranog elektronskog prelaza, nalazi u pobuđenom stanju S_1 . Prilikom vraćanja u osnovno elektronsko stanje, S_0 , molekul predaje postepeno apsorbovanu energiju u sudarima sa okolinom i tako prelazi u niža vibraciona stanja, S_1 . Pri elektronskom prelazu sa takvog energetskog stanja u osnovno elektronsko stanje S_0 emituje se energija u vidu fotona $h\nu$. Prelazi koji se dešavaju kod fluorescencije su međusobno konkurentni i koji će od njih biti dominantan zavisi od strukture molekula, simetrije, temperature, agregatnog stanja, prisustva drugih molekula, itd.

Fluorescencija se može koristiti u analitičke svrhe, jer se prema talasnoj dužini emitovane svetlosti može odrediti kvalitativna i kvantitativna analiza supstanci. Osetljivost metode se ogleda u tome što je moguće detektovati male koncentracije supstanci, 10 do 1000 puta manje nego spektrofotometrijskim metodama. Fluorimetrijska analiza može se koristiti i kao kvantitativna fluorescentna analiza kojom se na osnovu zavisnosti intenziteta fluorescencije u funkciji koncentracije supstance koja fluorescira određuje nepoznata koncentracija te supstance u ispitivanom uzorku.



Slika 13. Shema spektrofлуорimetra.

Na **Slici 13** prikazana je shema spektrofлуорimetra čiji princip rada izgleda ovako: ksenonska lampa proizvodi snop svjetlosti koji pada na ekscitacioni monohromator u kome se svjetlost razdvaja po talasnim dužinama, nakon čega dolazi do interakcije zračenja sa uzorkom. Pomoću odgovarajućih filtera, emitovano zračenje uzorka usmerava se na fotomultiplikatorski detektor koji beleži intenzitete zračenja za različite talasne dužine, čime se dobija emisioni spektar uzorka (odnosno, intenziteti fluorescencije u funkciji talasnih dužina). Za praćenje eksperimenta i prikaz rezultata upotrebljava se računar opremljen sa odgovarajućim softverom.

Spektri fluorescencije uzoraka meda snimljeni su korišćenjem spektrofлуорimetra Fluorolog FL3-221 (Jobin Yvon Horiba, Pariz, Francuska), sa programskim paketom FluorEssence 3.5 (Horiba Scientific, Kjoto, Japan); izvor svjetlosti je bila ksenonska lampa 450 W. Sva merenja u ovoj doktorskoj disertaciji su rađena u front face (prednja strana) konfiguraciji pod uglom od 35° , sa vremenom integracije od 0,1 s, dok je širina otvora za propuštanje pobudne i emitovane svjetlosti (slitovi) bila 2 nm .

3.13. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC) je termoanalitička tehnika koja prati razliku unete energije (toplote) supstance i referentnog materijala, prilikom njihovog podvrgavanja istoj kontrolisanoj temperaturnoj promeni. Entalpija uzorka se menja kada on prolazi kroz fazni prelaz i ta promena se detektuje kao endotermna (apsorpcija toplote) ili egzotermna (oslobađanje toplote) promena protoka toplote u odnosu na baznu liniju (Pravilnik o metodama ispitivanja opasnih svojstava hemikalija, 2013)

Uzorci meda koji su korišćeni za DSC merenja prvo su liofilizovani na -40°C tokom 5 dana. Količina od oko 4 - 5 mg svakog uzorka meda stavljena je u aluminijumsku posudu (30 ml). Posuda je hermetički zatvorena i analizirana koristeći DSC131 Evo (SETARAM Instrument, Caluire, Francuska) prethodno kalibrisan sa indijumom. Prazna zapečaćena posuda je korišćena kao referentna. Obe posude smeštene su u komoru, držane na 30°C 5 min i naknadno zagrejane sa 30 na 200°C sa konstantom brzinom zagrevanja od $5^\circ\text{C} / \text{min}$. Protok azota je bio $20\text{ mL} / \text{min}$.

Osnovna linija je snimljena pod identičnim eksperimentalnim uslovima, dok su bile dve prazne posude smeštene u DSC komori. Oduzimanje osnovne linije izvršeno je pomoću softvera CALISTO PROCESSING podržan od strane SETARAM Instrumentation.

3.14. Statistička obrada podataka

3.14.1. Paralelna faktorska analiza (PARAFAC)

Kod fluorescentne spektroskopije, podaci se mogu prikazati u vidu ekscitaciono-emisione matrice (EEM) koja nastaje akvizicijom analitičkog signala sa detektora. Izlaganjem uzorka seriji određenih ekscitacionih talasnih dužina sa detektovanjem emisije na takođe više talasnih dužina dobija se serija analitičkih signala koji se organizuju u ekscitaciono-emisione matrice. Odgovarajućim multivarijantnim metodama se mogu analizirati dobijene ekscitaciono-emisione matrice pri čemu je moguće izdvojiti uticaj pojedinačnih analita unutar merenog sistema, odrediti njihovu relativnu koncentraciju, te izdvojiti pojedinačne spektre svakog analita koji fluorescira u posmatranom sistemu itd. Paralelna faktorska analiza (*PARAllel FACTor Analysis*, PARAFAC) je najčešće korišćena multivarijantna tehnika za ove potrebe.

Pre statističke obrade podataka, spektralni podaci obično zahtevaju pripremnu obradu. U našem slučaju, ekscitaciono-emisione matrice ispitivanih uzoraka meda su prethodno obrađene u smislu uklanjanja negativnih vrednosti i zamene nultih vrednosti, nepoznatim vrednostima (*Not Assigned Number*, NaN) i spakovane u trodimenzione nizove podataka koji su dalje korišćeni za PARAFAC analizu. Detaljan opis PARAFAC-a pruža Bro (Bro, 1997; Bro i Kiers, 2003] i ovde će on biti ukratko objašnjen. PARAFAC ima mogućnost da faktorizuje trodimenzione nizove podataka u jednodimenzione linearne komponente, čiji broj zavisi od broja fluorofora u uzorcima. Dekompozicija se u osnovi radi prema algoritmu koji minimizira zbir kvadrata ostataka koristeći pristup najmanjih kvadrata prema jednačini:

$$x_{ijk} = \sum_{h=1}^m a_{ih} b_{jh} c_{kh} + e_{ijk} \quad (7)$$

Gde x_{ijk} predstavlja element trodimenzionog EEM niza, tj. izmerenu fluorescenciju uzorka (i), talasnu dužinu emisije (j) i talasnu dužinu pobuđivanja (k). Svaki element se razlaže na rezultate ili skorove (a_{ih}), i emisione i ekscitacione loadinge (b_{jh}) odnosno (c_{kh}), redom, za svaku od h PARAFAC komponenti. Komponente bi u idealnom slučaju trebale da opisuju fluorofore u uzorku, dok bi skorovi trebali da predstavljaju njihove relativne koncentracije. Ostatak e_{ijk} su rezidualne vrednosti koje predstavljaju odstupanja modela ne od eksperimentalnih podataka. Međutim, broj komponentata i njihovi profili nisu unapred poznati. Zbog toga model PARAFAC zahteva validaciju. Postoje dva načina za validaciju modela i odabir odgovarajućeg broja PARAFAC komponenti. Prvi pristup zasnovan je na činjenici da PARAFAC uvek daje jedinstveno rešenje. Ova karakteristika omogućava potvrđivanje PARAFAC modela pomoću analize *split-half* (Bro, 1997; Bro i Kiers, 2003; Lenhardt i sar., 2015). To znači ako je odgovarajući model sa tačnim brojem komponentata dobijen primenom analize na primarne podatke, dve polovine podeljenih skupova podataka trebalo bi nezavisno da vode do dva PARAFAC rešenja sa istim brojem komponenti i sličnim ili istim profilima opterećenja (loadings) emisije i pobude kao što je i originalni model. Drugi pristup zasnovan je na parametrima kao što su konzistentnost jezgra i procena varijanse kao mere kvaliteta modela. Za puni PARAFAC model konzistentnost jezgra je 100%. Međutim, optimalni broj komponentata se određuje na osnovu naglog smanjenja konzistentcije jezgra sa povećanjem broja komponenti (Bro i Kiers, 2003).

3.14.2. Multivarijaciona rezolucija krivih – naizmenični najmanji kvadrati (MCR-ALS)

Ekscitaciono-emisiona matrica je generisana za dalju statističku analizu korišćenjem hemometrijskog algoritma multivarijaciona rezolucija krive – naizmenični najmanji kvadrati (*Multivariate Curve Resolution–Alternating Least Squares*, MCR-ALS). MCR-ALS se koristi za analizu složenih spektara u kojima dolazi do preklapanja signala, odnosno za izdvajanje (procenu) broja komponenti i njihovih spektralnih profila za svaku ekscitaciono-emisionu matricu. MCR-ALS može da identifikuje model iz empirijskih podataka, bez bilo kakvih početnih pretpostavki o prirodi ili sastavu sistema koji se istražuje. MCR-ALS dekompozicija eksperimentalne matrice se radi prema jednačini:

$$D = CS^T + E \quad (8)$$

Spektroskopski podaci su raspoređeni u matrici D ($r \times c$), gde je r broj emisionih talasnih dužina, dok je c broj izmerenih spektara. C ($r \times n$) matrica emisionih spektara komponenti (fluorofora, čiji je broj n); S ($c \times n$) je matricakonzentracionih profila, koji predstavljaju spektre pobude komponenti; E ($r \times c$) je matrica ostataka (rezidua). Uzimajući u obzir prirodu fluorescentnih spektara, nenegativnost i jednodelnost, neophodno je uključiti ova ograničenja u algoritmu za MCR-ALS kako bi se dobila rešenja sa fizičkim značenjem. Softver „Unscrambler X 10.4“ je korišćen za obradu podataka ekscitaciono-emisione matrice (Stanković i sar., 2019).

3.14.3. Analiza glavnih komponentata (PCA)

Analiza glavnih komponentata (*Principal Component Analysis*, PCA) je jedna od najjednostavnijih multivarijantnih tehnika koja se koristi za maksimalno smanjenje kompleksnih skupova podataka na manji broj promenljivih (glavne komponente) uz minimalan gubitak informacija o njima. Analiza glavnih komponentata identifikuje sve izvore varijacija u skupu varijabli, uključujući zajedničke i specifične faktore, a samo komponente koje imaju veliko prisustvo u varijabilitetu biće interesantne i čine glavne komponente.

Princip analize glavnih komponentata se svodi na pronalaženje linearnih kombinacija (tj. pravca) među promenljivim (X_1, X_2, \dots, X_n) radi izračunavanja novih promenljivih (PC_1, PC_2, \dots, PC_n) koje međusobno nisu u korelaciji i opisuju maksimum varijanse skorova. Skorovi predstavljaju projekcije vrednosti podataka na latentnu varijablu, odnosno pravac glavne komponente (Trifković, 2013). Tačnije, prva glavna komponenta (PC_1) obuhvata najveći deo ukupne varijanse podataka i definiše se pomoću vektora koeficijenata latentnih varijabli (loading vector). Druga (PC_2) obuhvata maksimum preostale varijanse, predstavlja pravac normalan na PC_1 kojim se opisuje maksimum preostalog varijabiliteta među podacima. Sve dalje glavne komponente su normalne na prethodne i njihov pravac pokriva maksimum varijansi skorova tj. $\text{Var}(PC_1) \geq \text{Var}(PC_2) \geq \dots \geq \text{Var}(PC_n)$. Suštinski bi trebalo da broj glavnih komponenti ne bude prevelik, a sa druge strane da se zadrži što više informacija iz polaznog sistema varijabli.

U analizi hrane, analiza glavnih komponentata je primenjivana u velikoj meri u cilju određivanja parametara za proveru autentičnosti vina, maslinovog ulja, meda i dr (Giansante i sar., 2003; Kallithraka i sar., 2001; Silvano i sar., 2014; Yucel i sar., 2013).

Analiza glavnih komponentata izvršena je primenom XLSTAT statističkog softvera verzija 18.7 (*Addinsoft Inc, NY, USA*).

3.14.4. Korelaciona analiza

Korelaciona analiza je skup statističkih metoda koji se koristi za istraživanje jačina veze između posmatranih pojava. U ovoj analizi nije važno koja promenljiva je zavisna, a koja je nezavisna. Stepem korelacije se može izraziti Pearsonovim koeficijentom korelacije r koji predstavlja odnos kovarijanse između dve promenljive i kvadrata proizvoda njihovih varijansi. Stoga se r kreće u rasponu $-1 \leq r \leq +1$. Pozitivan koeficijent korelacije ukazuje da sa povećanjem vrednosti jedne varijable, raste i vrednost druge varijable i obrnuto. Negativan koeficijent korelacije ukazuje da sa porastom jedne varijable druga opada i obratno.

Korelaciona analiza je izvršena korišćenjem osnovnog dodatka za analizu podataka (Data analysis) u okviru paketa Microsoft Office Excel 365, izračunavanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije između PARAFAC rezultata i ostalih proučavanih varijabli. Statistički značaj korelacija je procenjen t -testom.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

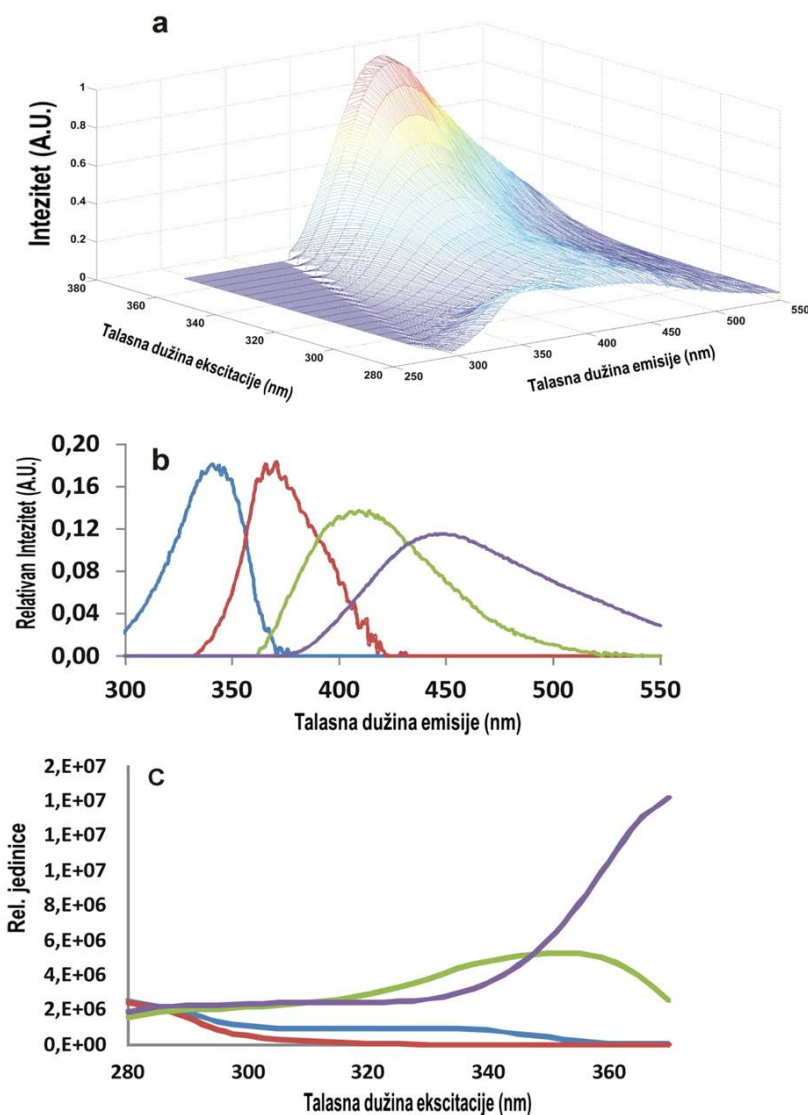
4.1. Procena varijabilnosti ukupnog sadržaja proteina i fenola u medu korišćenjem *front-face* fluorescentne spektroskopije u kombinaciji sa MCR-ALS analizom

Prikupljeni uzorci meda od lipe snimljeni su na spektrofluorimetru (Stanković i sar., 2019). Emisioni spektri uzoraka meda snimljeni su u opsegu od 280 do 550 nm sa talasnim dužinama ekscitacije od 270-370 nm. Korak talasne dužine u merenjima ekscitacije bio je 5 nm, a emisioni korak je bio 1 nm.

Dobijene ekscitaciono-emisione matrice su korišćene za dalju statističku analizu korišćenjem multivarijacione rezolucija krivih – naizmenični najmanji kvadrati analize. Rezultati MCR-ALS analize profila emisije prikazani su na **Slici 14** gde je kao primer prikazan uzorak broj 13. Ovaj emisioni spektar meda sadrži četiri komponente sa maksimumima na 340, 370, 415 i 450 nm. Dobijeni maksimumi se mogu povezati sa prisustvom fluorofora u medu: komponenta na 340 nm odgovara emisiji proteina, komponenta na 370 nm siringinskoj kiselini, a komponente na 415-450 nm mogu poticati od različitih fenolnih jedinjenja (hidroksicimetne kiseline, hlorogene kiseline, kofeinske kiseline, kumarina i stilbena) (Fernández Izquierdo i sar., 2000; Gašić i sar., 2014; Lang i sar., 1991). Položaji maksimalnih emisija fenolnih komponenti varirali su za različite uzorke meda, ali su bili u istom opsegu emisija. Stoga su sve te komponente korišćene kao fenolni otisak prsta (*fingerprint*) za dalje proračune.

Iako je u pojedinim uzorcima meda postojala samo jedna komponenta u fenolnom opsegu spektra (uzorci 1 i 17) korišćena je za dalje proračune. Položaj maksimuma proteinske komponente varirao je za različite uzorke meda, ali je bio u istom rasponu emisija i korišćen je kao proteinski otisak prsta (*fingerprint*). Komponenta na 370-380 nm retko se javljala u uzorcima meda i nije korišćena u daljoj analizi. Odgovarajuća opterećenja (profili pobude) komponenti sa **Slike 14b** prikazana su na **Slici 14c**. Profili spektra pobude su u korelaciji sa kvantnim prinosima odgovarajućih fluorofora.

Istraženo je u kojoj meri odnos dva glavna tipa fluorofora u medu, proteini i fenolna jedinjenja, variraju odmah nakon ceđenja meda i nakon pakovanja u tegle. Pre pakovanja u tegle, med iz više buradi mora se pravilno homogenizovati. Da bi se potvrdio doprinos proteina i fenola u analiziranim spektralnim komponentama, spektrofotometrijski su kvantifikovani proteini i fenoli u svakom uzorku i izvršena je melizopalinološka analiza uzoraka meda radi određivanja koncentracije polenovih zrna.



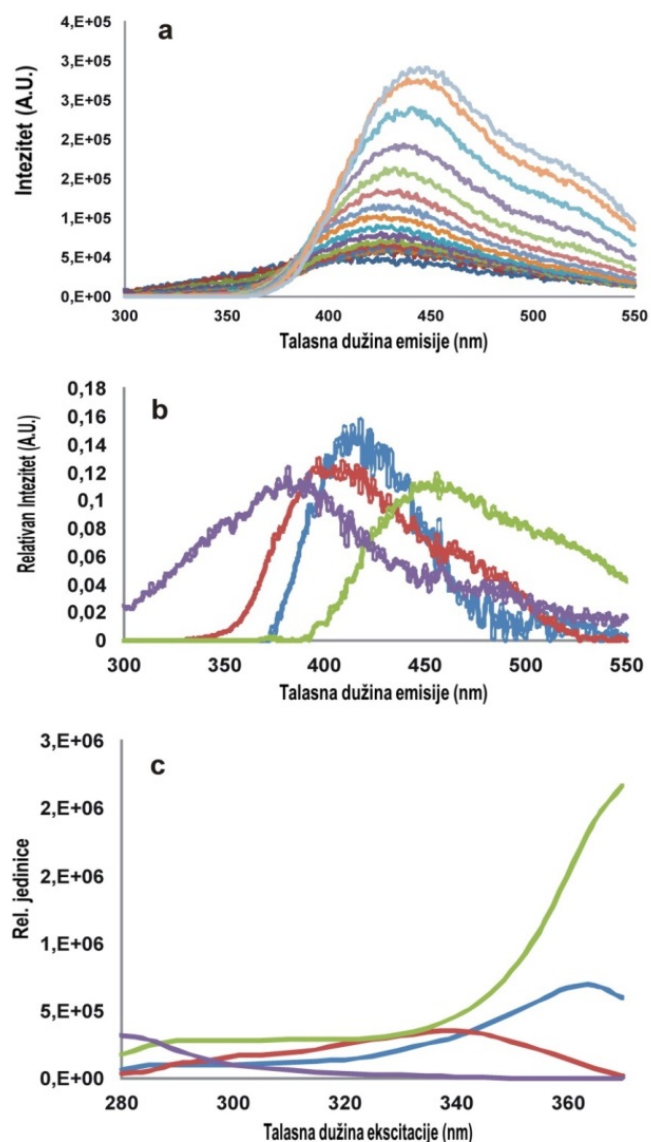
Slika 14. Spektar fluorescencije uzorka meda sa izraženim proteinskim delom (uzorak 13 nakon pakovanja u teglu korišćen kao primer) : **a)** ekscitaciono-emisiona matrica sirovog spektra; **b)** emisioni spektri čistih komponenti dobijeni primenom MCR-ALS metoda u analizi sirovog spektra; **c)** profili spektra pobude (opterećenja) koji odgovaraju spektralnim komponentama iz sirovog spektra dobijenim MCR-ALS metodom. Boje krivih opterećenja odgovaraju bojama odgovarajućih komponenti emisije.

Izračunata je površina karakterističnih proteinskih i fenolnih komponenti. Da bi se utvrdila tačna površina komponente, pomnoženi su spektri komponenti sa odgovarajućim opterećenjima. Dalje je određen odnos $(Fen/Prot)_{fl} = [ukupna\ površina\ fenolnih\ komponenti/površina\ proteinskih\ komponenti]$ kao fluorometrijski pokazatelj odnosa uzoraka meda od raznih pčelara (**Tabela 6**). Takođe, rezultati kvantifikacije ukupnih fenola (TPC) i ukupnih proteina dobijeni su korišćenjem spektrofotometrijskih testova, zajedno sa odgovarajućim odnosom $(Fen/Prot)_{sp} = [TPC/ ukupni\ proteini]$ su predstavljeni u istoj tabeli (**Tabeli 6**) za poređenje.

Tabela 6. Rezultati ukupnih proteina i TPC nakon spektrofotometrijske (sp) i fluorimetrijske (fl) analize uzoraka meda, kao i njihov odnos posle ceđenja i posle pakovanja u tegle nakon mesec dana.

Broj uzorka	Spektrofluorimetrijski rezultati		Spektrofotometrijski rezultati					
	(Fen/Prot) _n posle ceđenja	(Fen/Prot) _n posle pakovanja	Proteini ukupni posle ceđenja (g/kg)	Proteini ukupni posle pakovanja (g/kg)	TPC posle ceđenja (g/kg)	TPC posle pakovanja (g/kg)	(Fen/Prot) _{sp} posle ceđenja	(Fen/Prot) _{sp} posle pakovanja
1	9,00	3,14	0,05	0,25	0,64	0,57	12,75	2,31
2	2,26	6,59	0,38	0,55	0,68	0,99	1,78	1,81
3	6,37	5,11	0,41	0,33	0,82	0,76	1,99	2,30
4	5,00	–	0,41	0,32	0,67	0,66	1,64	2,07
5	1,76	0,38	0,40	0,30	0,67	0,66	1,67	2,21
6	3,34	3,30	0,33	0,38	0,88	0,83	2,64	2,18
7	–	–	0,35	0,28	0,67	0,62	1,94	2,25
8	3,52	2,39	0,41	0,13	0,63	0,35	1,53	2,65
9	3,4	1,55	0,30	0,40	0,63	0,66	2,13	1,66
10	5,01	3,33	0,47	0,41	0,68	0,65	1,46	1,60
11	0,62	3,56	0,28	0,19	0,72	0,73	2,56	3,93
12	–	2,21	0,30	0,42	0,69	0,64	2,28	1,53
13	–	4,29	0,40	0,27	0,71	0,78	1,77	2,83
14	5,52	1,00	0,57	0,22	0,82	0,76	1,43	3,44
15	6,47	5,83	0,52	0,41	0,75	0,92	1,44	2,42
16	2,59	5,56	0,46	0,51	0,63	0,73	1,37	1,42
17	2,59	0,78	0,28	0,29	0,63	0,65	2,26	2,20

U nekim slučajevima nije bilo moguće odrediti fluorimetrijski odnos $(\text{Ph/Pr})_{\text{fl}}$ (**Tabela 6**, uzorak 4 nakon pakovanja, uzorak 7 nakon ceđenja i pakovanja, uzorci 12 i 13 nakon ceđenja) pošto proteinska komponenta nije primećena nakon MCR-ALS analize. Iako je u ovim uzorcima spektrofotometrijskom metodom utvrđeno prisustvo proteina (**Tabela 6**), njihova emisija je bila ispod nivoa detekcije merenja na spektrofluorimetru. Razlog tome može biti različito proteinsko okruženje u određenim uzorcima meda u odnosu na druge uzorke. To se može videti u sedam od trinaest uzoraka u kojima proteinska komponenta nije izražena, ali rezultat odnosa fenol/protein dobijenog iz emisionog spektra je u skladu sa odgovarajućim odnosom dobijenim iz spektrofotometrijske kvantifikacije proteina i fenola (uzorci 1, 2, 6, 9, 11, 16 i 17). U nekim slučajevima (uzorci 3, 5, 8, 10, 14 i 15), rezultati fluorimetrijske analize nisu u skladu sa odgovarajućim $(\text{Fen/Prot})_{\text{sp}}$ odnosom. Ovi slučajevi u kojima je proteinski deo spektra bio slabo izražen povezani su sa karakteristikama uzoraka, kao što je prikazano na primeru spektra emisije i odgovarajuće MCR-ALS analize za uzorak 7 na **Slici 15**. Odsustvo proteinske komponente nakon MCR-ALS analize ili slaba ekspresija proteinskog maksimuma u sirovim spektrima u uzorcima "nakon ceđenja" mogu biti povezani sa karakteristikama meda iz određenih košnica (Radotić i sar., 2006), a u "uzorcima nakon pakovanja" mogu biti povezane sa neodgovarajućom homogenizacijom meda iz različitih košnica, pre pakovanja u tegle. Kao mogući izvor neslaganja, mogu biti i nedostaci kolorimetrijskih metoda za određivanje ukupnih proteina i ukupnih fenola (Everette i sar., 2010; Olson i Markwel i sar., 2007; Redmile-Gordon i sar., 2013). Moguće ograničenje primenljivosti fluorometrijske metode za određivanje odnosa fenola i proteina može biti izuzetno slaba ekspresija proteina ili fenola u emisionim spektrima (uglavnom se odnosi na karakteristike uzoraka meda), što je ograničenje za uspeh MCR-ALS analize.



Slika 15. Spektar fluorescencije uzorka meda sa slabo izraženim proteinskim delom (uzorak 7 nakon pakovanja): **a)** EEM sirovog spektra; **b)** emisioni spektri čistih komponenti dobijeni primenom metode MCR-ALS iz analize sirovog spektra; **c)** profili spektara pobude (opterećenja) koji odgovaraju emisionom spektru čiste komponente dobijene metodom MCR-ALS. Boje krive opterećenja odgovaraju bojama odgovarajućih komponenti emisije.

Kvalitativna i kvantitativna melizopalinološka analiza izvršena je prema usklađenim metodama polenske analize. Melizopalinološka analiza potvrdila je određen % nektara lipe (*Tilia L.*) (**Tabela 7**) u svim analiziranim uzorcima lipovog meda. U uzorcima 1, 2, 3, 7, 11 i 14 razlika u doprinosu polena lipe (*Tilia L.*), nakon ceđenja i posle pakovanja u tegle, premašila je 10%, ukazujući da za te uzorke postoji neslaganje u doprinosu nektara lipe, najverovatnije nastale usled neodgovarajuće homogenizacije pre pakovanja u tegle. Zbog nepravilne homogenizacije meda i/ili različitih svojstava meda iz različitih košnica postoje razlike između uzoraka meda odmah nakon uzimanja iz košnica (ceđenja) i nakon pakovanja u tegle mesec dana kasnije. U uzorcima 5 i 12 nakon pakovanja došlo je do značajne promene u koncentraciji polena.

Tabela 7. Rezultati melizopalinološke analize pokazuju koncentraciju polena i doprinos polena lipe (*Tilia* L.), odmah nakon ceđenja i nakon pakovanja u tegle.

Redni broj uzorka	Koncentracija polena (PZ/10 g)		% Lipovog polena	
	odmah posle ceđenja	posle pakovanja u tegle	odmah posle ceđenja	posle pakovanja u tegle
1	24778	18407	92,4	61,4
2	18630	21741	69,4	24,9
3	11778	18481	66,8	80,8
4	41815	51741	81,2	79,0
5	22370	1768	83,6	81,5
6	26630	23000	90,5	93,7
7	12630	9852	86,4	73,5
8	33556	11648	77,9	73,3
9	20778	16852	88,2	92,8
10	22370	6815	83,9	83,5
11	19667	18815	79,5	88,6
12	4800	18759	76,5	79,9
13	24852	25407	76,5	82,4
14	22037	10148	69,9	58,1
15	7395	5537	75,3	74,4
16	42481	24074	72,5	81,5
17	4796	7679	87,5	80,1
Srednja vrednost	21257	17101	79,9	75,8
Standardna devijacija	11151	11394	7,7	16,1
Koeficijent varijacije	0,52	0,67	0,10	0,21

Spektrofotometrijska kvantifikacija proteina i fenola, kao i rezultati fluorimetrijske analize pokazuju da su postojale značajne razlike u sadržaju proteina u uzorcima istog proizvođača nakon ceđenja uzoraka i nakon pakovanja. Ove razlike se mogu objasniti na sledeći način. Za uzorke 1 i 2, povećanje sadržaja proteina odgovara promeni doprinosa nektara. Smanjenje polena lipe (*Tilia* L.) (Tabela 7) ukazuje na veći doprinos nektara iz drugih biljnih vrsta, za koji se očekuje da će dovesti do kvalitativne i kvantitativne promene proteinske frakcije koja je poreklom iz biljaka (Bauer, 1996). S druge strane, u uzorcima 8, 13 i 14 iako je došlo do smanjenja sadržaja proteina, doprinos polena lipe nije se značajno promenio. Samo u uzorku 14 postojalo je očigledno smanjenje ukupne koncentracije polena, što ukazuje da je došlo do smanjenja količine proteina koji potiču iz biljaka.

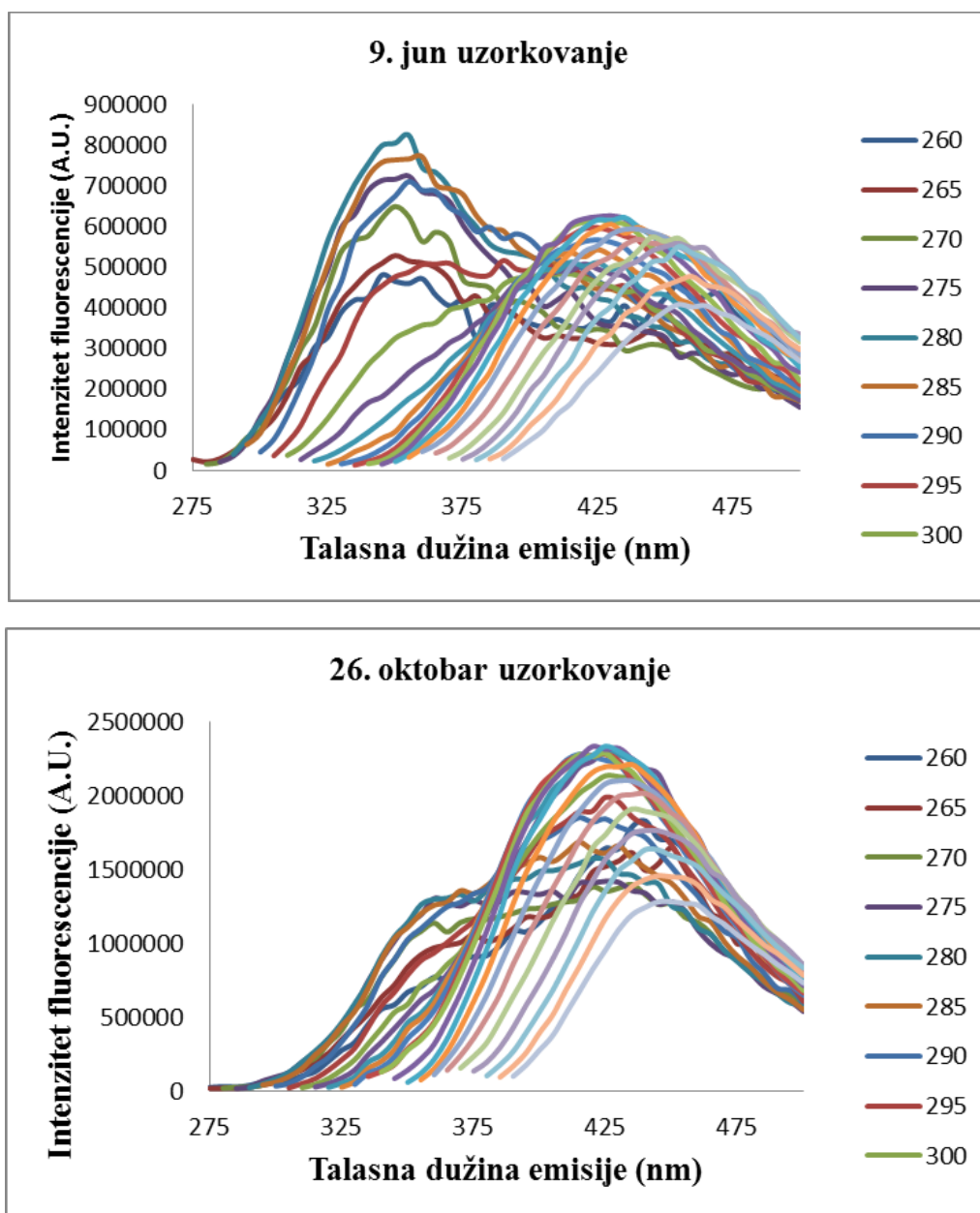
Slični rezultati su dobijeni i u uzorcima 5, 8, 10 i 15 gde postoji smanjenje (više od 50%) koncentracije polena i odgovara smanjenju sadržaja proteina, dok je suprotna situacija u uzorku 12 gde je primetan porast (više od 50%) u koncentraciji polena i odgovara povećanju sadržaja proteina. Takva situacija takođe ukazuje na važnost proteinske komponente koja dolazi iz biljaka. Za uzorke 8 i 13 nema razlike u rezultatima polenske analize pre i posle pakovanja u tegle; stoga možemo samo pretpostaviti da je došlo do neodgovarajuće homogenizacije meda poreklom iz različitih košnica i da je to uticalo na proteinsku komponentu koja potiče od pčela.

Rezultati ove studije su pokazali da se fluorimetrijska analiza može koristiti za brzo i pouzdano ispitivanje varijabilnosti uzoraka meda i za odabir uzoraka radi dalje, detaljnije analize.

Fluorimetrijska procena relativnog sadržaja proteina i fenola omogućava uvid u njihovo prisustvo. Iako su ove komponente prisutne u maloj koncentraciji u medu, njihovo prisustvo je dovoljno za fluotimetrijska ispitivanja. Naime, saharidi koji su glavna komponenta meda, nisu fluorescentno aktivni i ne interferiraju u emisionim spektrima sa proteinima i fenolima. Stoga, predloženi fluorimetrijski pristup može imati prednost u odnosu na postojeće metode koje se koriste za kvantifikaciju proteina i fenola u medu, u smislu brzine i mogućnosti njihovog istovremenog određivanja bez prethodne pripreme uzorka. Ispitivanje sadržaja proteina u uzorcima meda praćeno je poteškoćama, uglavnom zbog niskog sadržaja proteina u medu (0,1 - 0,5%), teškoće u ekstrakciji proteina meda iz matriksa bogatog šećerom i zbog prepreka u karakterizaciji proteina konvencionalnim postupcima (Chua i sar., 2013). Bradford-ova metoda za merenje ukupnih proteina ima nedostatak u pogledu različitog afiniteta *Coomassie Brilliant Blue* reagensa za vezivanje za proteine različitih svojstava (Olson i Markwel i sar., 2007) i mogućnost njegovog vezivanja za fenolna jedinjenja (Redmile-Gordon i sar., 2013), dok se fluorimetrijska metoda oslanja na specifičnu emisiju aminokiselinske fluorofore (triptofan, Trp). *Folin–Ciocalteu*-ova metoda za određivanje ukupnih fenola nije potpuno selektivna. Pokazano je da pored fenola mogu reagovati i brojna organska i neorganska jedinjenja, uključujući proteine (Everette i sar., 2010). S druge strane, maksimum fenolnih jedinjenja u emisionim spektrima je jasno odvojen od proteinskog dela spektra, što omogućava njihovo paralelno određivanje u spektrofluorimetrijskim spektrima.

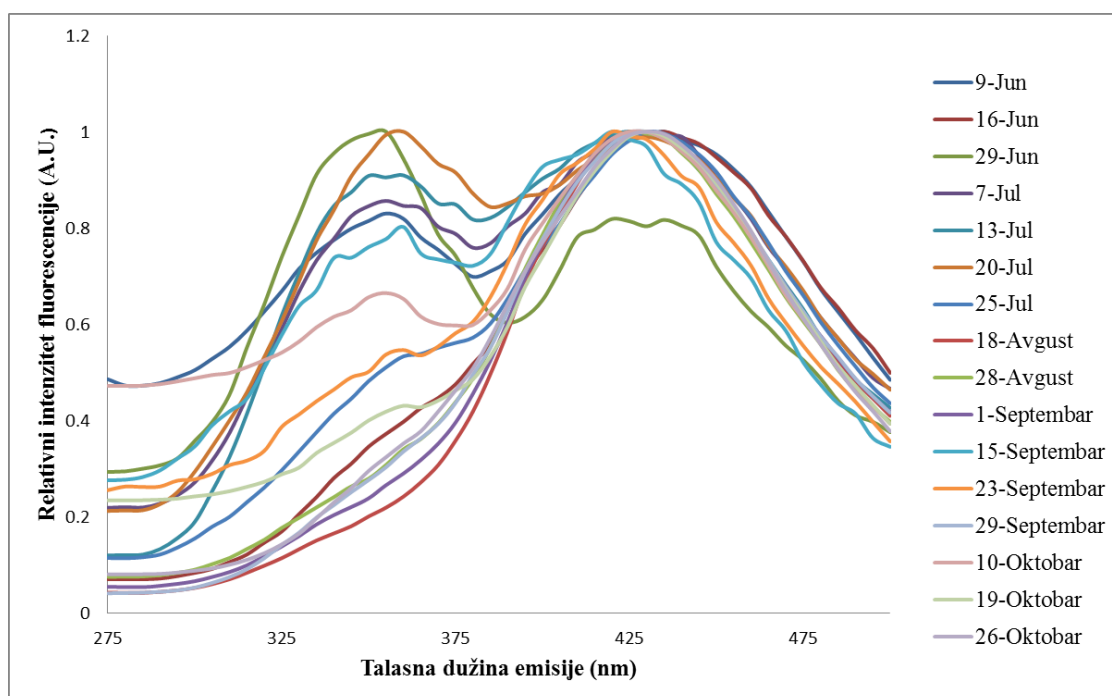
4.2. Praćenje godišnje varijacije proteina i fenola u medu korišćenjem fluorescentne spektroskopije.

Analizirani su uzorci bagremovog meda iz košnice koja je bila tretirana oksalnom kiselinom radi suzbijanja varoe. Fluorescentni emisijski spektri uzoraka meda su snimljeni u opsegu od 275–500 nm, sa korakom od 5 nm, za opseg ekscitacije od 260–380 nm. Primeri emisijskih spektara uzoraka meda sa početka i kraja sezone 2019. godine (9. jun i 26. oktobar) su prikazani na **Slici 16**, dok su ostali emisijski spektri uzoraka meda koji su prikupljeni tokom cele sezone 2019. godine prikazani u **Prilogu (Slika P1 - Slika P14)**.



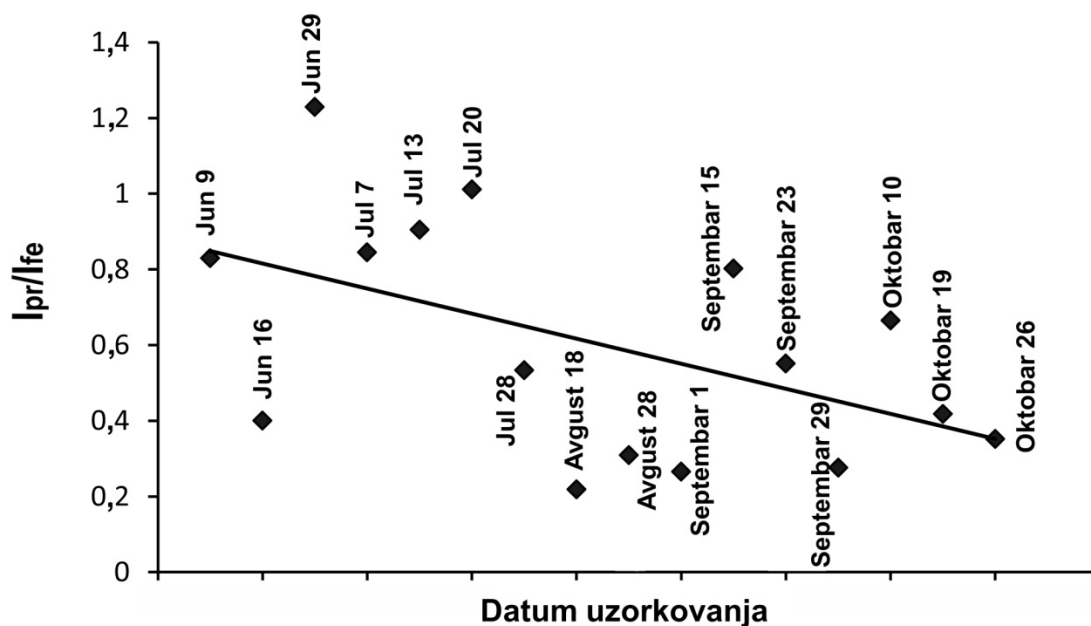
Slika 16. Emisioni spektri meda uzorkovanih 9. juna i 26. oktobra 2019. godine iz iste košnice.

Za svaki uzorak, emisijski spektri izmereni su na različitim talasnim dužinama pobude, a potom su usrednjeni i kao takvi uključuju spektralni doprinos svih fluorofora prisutnih u uzorku. **Slika 17** prikazuje normirane emisijske spektre uzoraka meda dobijenih od istog pčelinjeg društva tokom jedne godine. Dva glavna emisijska maksimuma su zapažena u spektrima, na oko 350 nm i 430 nm, što odgovara emisiji proteina odnosno fenolnih jedinjenja. Očigledno je da intenzitet maksimuma emisije fenola varira mnogo manje od maksimuma proteina. Pretpostavlja se da značajne varijacije intenziteta maksimuma proteina povezane sa različitim aktivnostima pčelinjeg društva u košnici. Med proizveden krajem avgusta (uzorak od 28. avgusta) je karakterističan po tome što ima maksimalni fenolni vrh i minimalni proteinski vrh u odnosu na ostale uzorke meda. Ovo je period kada pčelinje društvo smanjuje svoje aktivnosti traženja hrane (Harbo, 1986), a i vrste biljaka cvetnica nisu tako bogate u drugoj polovini godine u poređenju sa prvom polovinom. Iz tog razloga, od 30. avgusta pčelinje društvo je hranjeno šećernim sirupom. U periodu od 28. jula do 26. oktobra, proteinski maksimum je znatno niži u poređenju sa prvim delom godine, što se može objasniti nižim doprinosom proteina.



Slika 17. Normirani emisijski spektri uzoraka meda dobijenih tokom jedne godine iz iste košnice. Datumi uzorkovanja naznačeni su na grafiku.

Određen je odnos spektralnih komponenti koje potiču od dve glavne fluorofore u medu, proteina i fenola, kao odnos intenziteta emisijskih maksimuma za spektar proteinske i fenolne komponente ($I_{\text{Prot}}/I_{\text{Fen}}$). Odnos $I_{\text{Prot}}/I_{\text{Fen}}$ u različitim terminima uzorkovanja, prikazan je na **Slici 18**. Ovaj grafikon odražava gore opisane godišnje promene sadržaja proteina i fenola u medu, pokazujući smanjenje sadržaja proteina od meseca avgusta. U drugoj polovini septembra i u oktobru je otkriven mali porast proteina, u poređenju sa periodom do druge polovine avgusta i prvom delu septembra, koji se može povezati sa cvetanjem biljke *Aster spp.* Ove promene su u skladu sa godišnjim varijacijama u aktivnostima hranjenja pčelinjih zajednica iz nektara i polena (Stanković i sar., 2020).

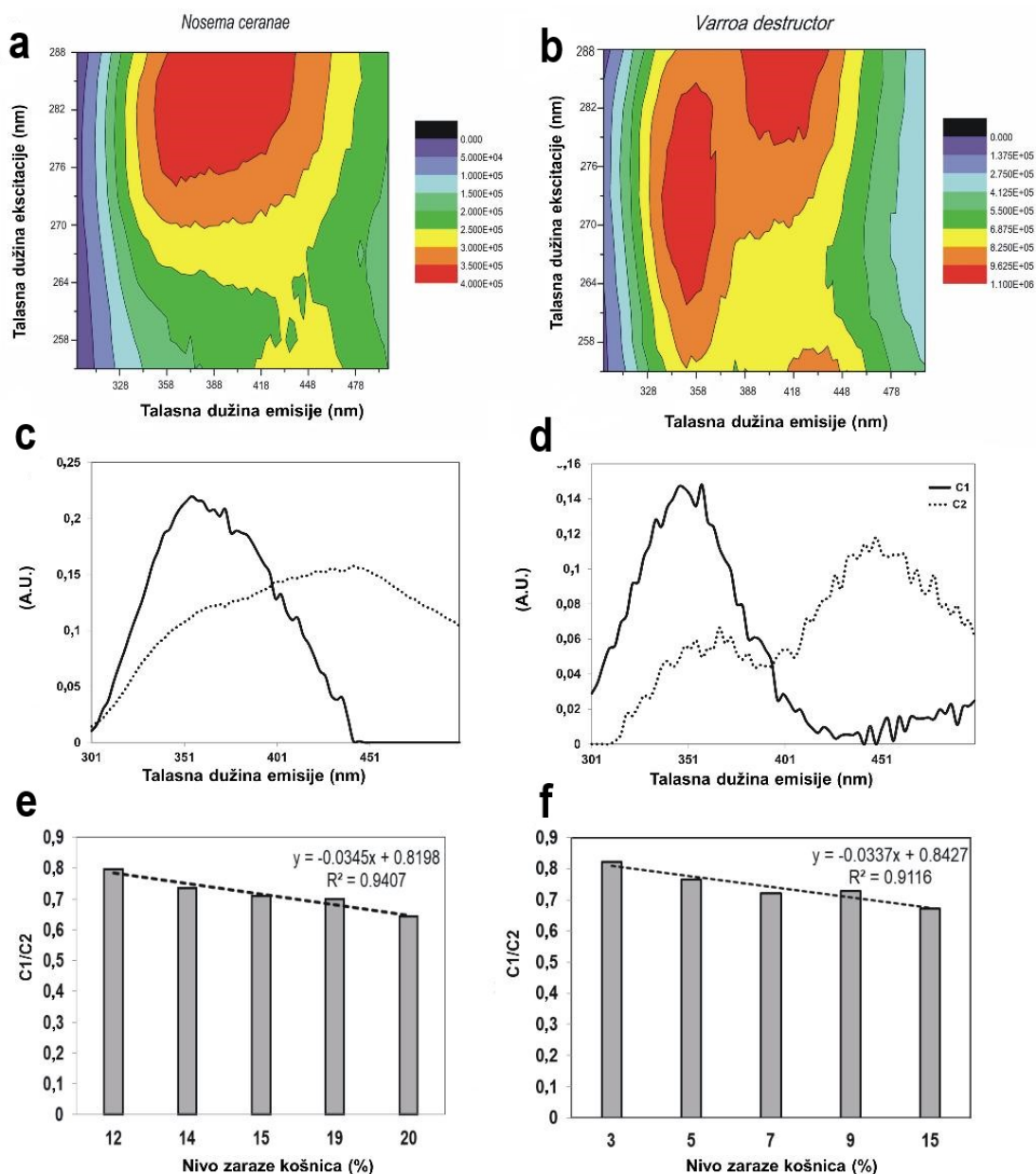


Slika 18. Odnos intenziteta emisionih maksimuma za proteine i fenole ($I_{\text{Prot}}/I_{\text{Fen}}$) u odnosu na vremenske tačke (datume i mesece) kada su prikupljeni uzorci.

Tretman pčelinjih zajednica oksalnom kiselinom započet je 7. jula. Međutim, intenzitet proteinskog i fenolnog maksimuma u spektrima uzoraka koji su prikupljeni tokom jula su uporedivi sa onim uzorcima koji su prikupljeni u junu. Ova činjenica je dokaz da oksalna kiselina ne utiče na sadržaj proteina i fenola u medu. Pošto sadržaj proteina u medu potiče uglavnom iz pčelinje zajednice, ovaj rezultat ukazuje da oksalna kiselina nije promenila pčelinju sintezu proteina, što ukazuje da oksalna kiselina, kao zaštitno sredstvo, nije štetna za pčele.

4.3. Procena infekcije pčelinjih zajednica nozemom i varoom korišćenjem fluorescentne spektroskopije u kombinaciji sa diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom uzoraka meda

Emisioni spektri uzoraka meda koji su prikupljeni tokom 2016. godine su mereni u opsegu 300-500 nm sa korakom 3, za ekscitacije u opsegu 255-288 nm. Na ovaj način su dobijene ekscitaciono-emisione matrice fluorescencije uzoraka meda koje su predstavljale ulazne podatke za dalje statistička analize korišćenjem MCR-ALS analize. Ovaj metod je omogućio uspešnu dekompoziciju fluorescentnih spektara, tj. procenu broja fluorofora (Bartolić i sar., 2018).



Slika 19. Fluorescentna emisija uzoraka meda iz košnica zaraženih sa *N. ceranae* (40%) i *V. destructor* (15%) : **a** i **b** EEM mape, **c** i **d** emisione komponente C1 i C2 dobijene primenom MCR-ALS metode analizom sirovih spektara, **e** i **f** predstavlja odnos površina komponenti (C1-protein/C2-fenol).

Slika 19 prikazuje, kao primer, fluorescentne konture EEM mape dva multifloralna uzorka meda iz pčelinjaka sa nivoom infekcije od 40% nozemom (**Slika 19 a**), a 15% varoom (**Slika 19 b**), za opseg talasnih dužina pobude 255–288 nm. Ukupna fluorescencija multifloralnog meda, u opsegu emisije 300–500 nm, potiče od kombinacije pojedinačnih signala iz različitih unutrašnjih fluorofora (Ruoff i sar., 2006). Na svim EEM mapama uočavaju se karakteristične regije visoke fluorescencije, koje mogu nastati iz različitih fluorofora. Prirodna jedinjenja u medu koja emituju fluorescenciju su aminokiseline/proteini i fenoli.

MCR-ALS algoritam je korišćen za dalje određivanje optimalnog broja čistih komponenti i njihov emisioni spektralni profil. Kao što je prikazano na **Slikama 19 c i d** pronađene su dve karakteristične komponente koje su dalje korišćene za analizu uzoraka meda, sa pozicijama maksimalne emisije na 350 nm za prvu komponentu i 450 nm za drugu komponentu. Komponenta 1 (C1) i komponenta 2 (C2) su dodeljene proteinskim odnosno fenolnim komponentama, zbog položaja emisije proteina i fenolnih jedinjenja u datim regijama fluorescencije (Bortolotti i sar., 2016; Lang i sar., 1991). Broj i pozicija emisionih komponenti su bile iste za sve uzorke meda. Dalje je izračunata površina fluorescencije za svaku komponentu, kao i njihov odnos, a onda je nacrtan grafik zavisnosti tih odnosa naspram nivoa zaraženosti pčelinjih košnica, što je prikazano na **Slikama 19 e i f**.

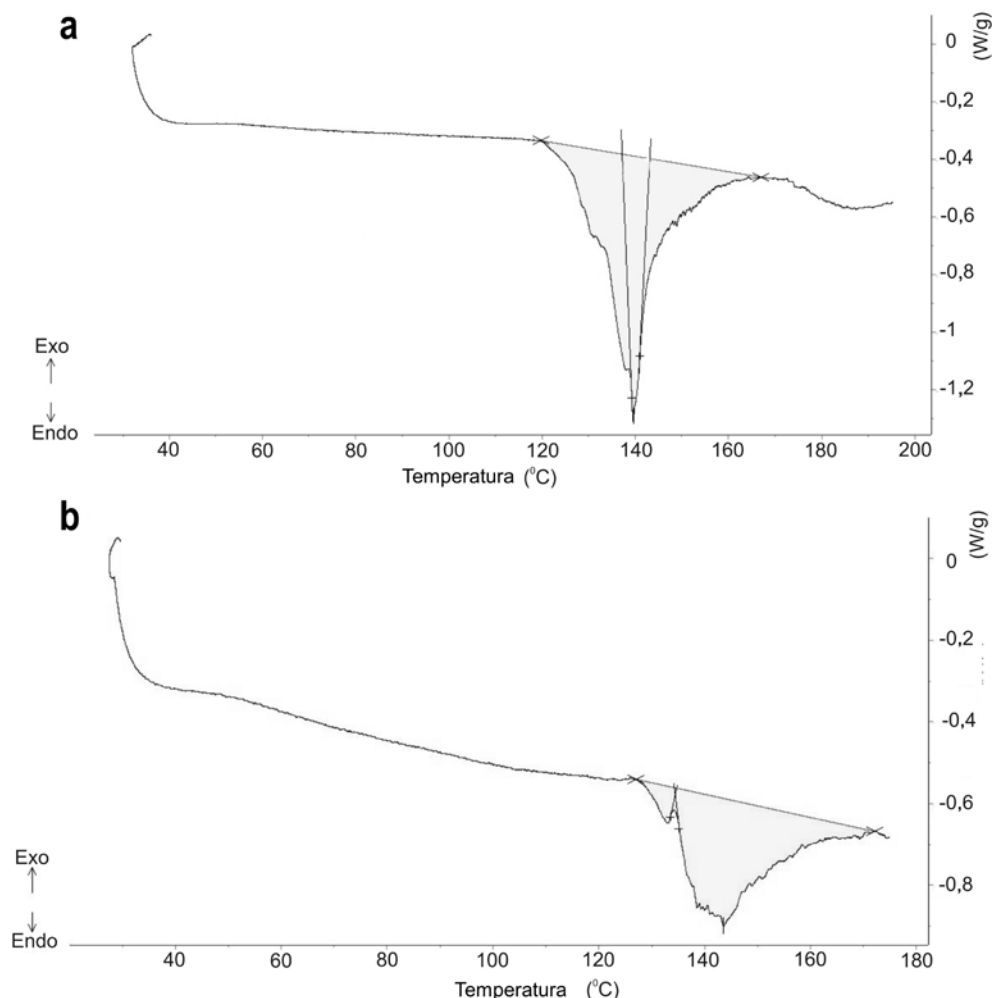
Tabela 8. Nivo i vrsta zaraženosti košnica, DSC parametar – (H) i odnos komponenti emisionih spektara koje potiču od proteina i fenola (C1/C2) u uzorcima meda.

Vrsta zaraženosti košnica	Nivo zaraženosti košnica (%)	Toplota entalpije H (J/g)	Odnos emisionih komponenti (C1/C2)
<i>Nosema ceranae</i>	12	110	0,80
	14	102	0,74
	15	102	0,71
	19	115	0,70
	20	115	0,64
<i>Varroa destructor</i>	3	110	0,82
	5	113	0,77
	7	116	0,72
	9	130	0,73
	15	67	0,67

Tabela 8 pokazuje toplotu entalpije (H) i C1/C2 odnos emisionih komponenti proteina i fenola za uzorke meda iz košnica različitog nivoa zaraze varoom i nozemom. Pored spektrofluorimetrije, korišćena je diferencijalna skenirajuća kalorimetrija da se vidi da li ima promene u okruženju šećera kao glavnog sastojka u uzorcima meda iz zaraženih pčelinjih društava

varoom i nozemom. Šećeri u medu su odgovorni za nekoliko fizičko-hemijskih osobina kao što su viskozitet, gustina, higroskopnost i karakteristike granulacije meda (Tigistu i sar., 2021). U procesu kristalizacije meda, glukoza prelazi u kristalni oblik, čime se povećava sadržaj vode u tečnoj fazi meda (Escuredo i sar., 2014). **Slika 20 a** prikazuje, kao primer, DSC termogram za uzorak meda koji je poreklom iz košnice sa utvrđenim nivoom infekcije od 40% mikrosporidijom *N. Ceranae*. Za uzorke dobijene iz zaraženih kolonija nozemom uočen je jedan fazni prelaz – endotermni pik na 119–167 °C. Postojao je trend početnog smanjenja, a zatim povećanja entalpijskog prelaza sa povećanjem infekcije, kao što je prikazano u **Tabeli 8**.

Slika 20 b pokazuje, kao primer, DSC termogram za uzorak meda iz košnice koja je zaražena 15% varoom. Široki endotermni pik na 127–172 °C, odgovara faznom prelazu (topljenju) šećera (mono-, di-, tri-, i oligosaharida) (Beaurepaire i sar., 2017). Fazni prelaz uzoraka meda vezano za druge nivoe zaraze varoom je u istim temperaturnim rasponima. Toplota entalpije za uzorke koji se odnose na različite nivoe infestacije krpeljom *V. destructor* prikazano je u **Tabeli 8**. Uočen je trend povećanja entalpije sa povećanjem stepena zaraze, do infekcije 9%, a zatim smanjenje entalpije uz dalje povećanje stepena infestacije varoom.



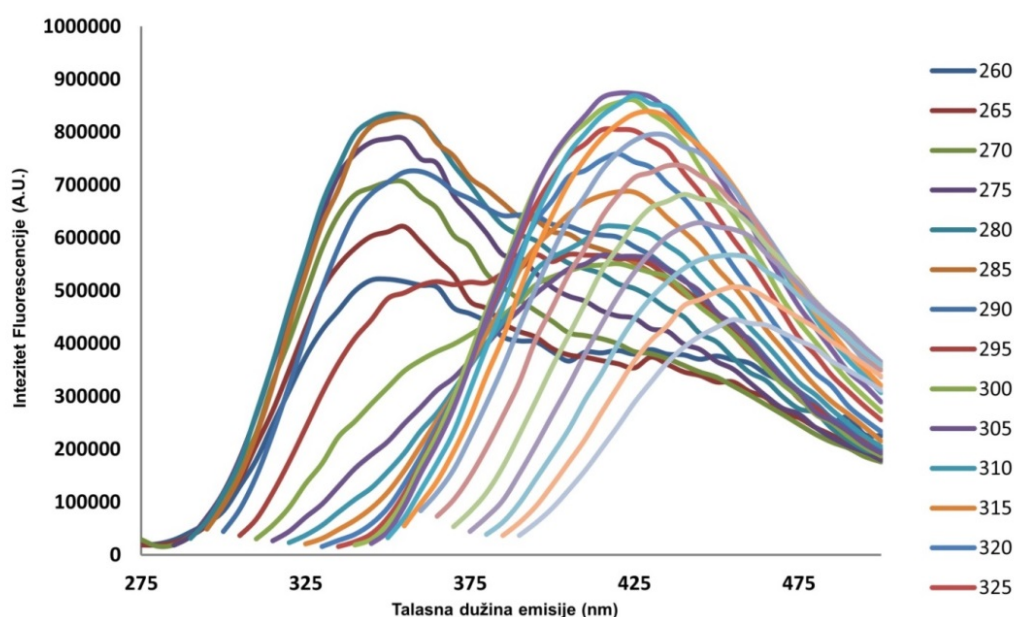
Slika 20. a) DSC termogram (linearno skeniranje temperature) za uzorak meda sa nivoom infekcije od 40% *N. ceranae* **b)** DSC termogram (linearno skeniranje temperature) za uzorak meda sa stepenom infestacije od 15% varoom.

Pošto su razlike u nivou infekcije među uzorcima male, ne treba očekivati velike razlike u njihovom termičkom ponašanju. Promena u entalpiji, u slučaju obe infekcije, (**Tabela 8, Slika 20**), može biti povezana sa promenama u okruženju šećera u medu. Poznato je da fazni prelaz šećera zavisi od fizičkohemijskih svojstava okoline tj. sredine u kojoj se šećeri nalaze, kao što je sadržaj vode, kristalinitet, viskozitet, itd. (Hartel i sar., 2011). Naši rezultati pokazuju da sa porastom zaraze košnica se povećava sadržaj vode u odgovarajućim uzorcima meda (**Tabela 12**), što dovodi do promena u okruženju šećera.

Odnos proteinske i fenolne komponente (C1/C2) u multiflornom medu smanjuje se sa porastom nivoa infekcije, bilo da se govori o *N. ceranae* ili *V. destructor* (**Tabela 8, Slika 19 e i f**). Dobijene vrednosti R^2 za oba grafika, 0,941 odnosno 0,912, pokazuju visoku linearnu zavisnost. Uočena promena u odnosu protein/fenol u medu može ukazivati na promene stanja u pčelinjem društvu zbog infekcije, što se može dovesti u vezu sa promenom imuniteta pčela izloženih stresu (Belsky i Joshi, 2019; Masaquiza i sar., 2021; Negri i sar., 2019). Rezultati naših studija ukazuju da procena nivoa zaraženosti pčelinjih kolonija može biti moguća korišćenjem fluorescentne spektroskopije odgovarajućih uzoraka meda, kao jednostavna metoda bez ikakvog postupka pripreme uzorka pre merenja (Stanković i sar., 2021). S druge strane, pik koji potiče od fenolnih jedinjenja u emisionim spektrima jasno je odvojen od proteinskog dela spektra, što omogućava paralelno određivanje proteina i fenola u medu .

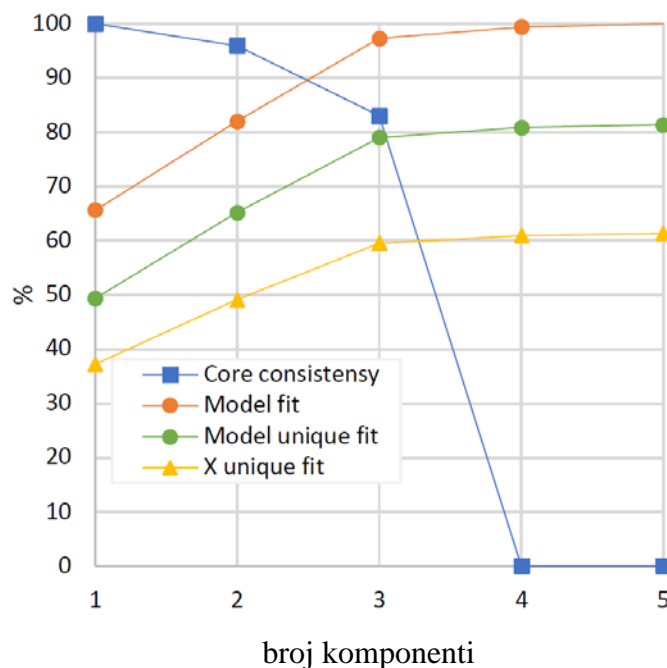
4.4. Procena nivoa zaraze pčelinjih društava primenom spektroskopskih i biohemijskih analiza uzoraka meda

Fluorimetrijska merenja su urađena na uzorcima meda, koji su prikupljeni tokom 2018. godine od društava zaraženih varoom. Na **Slici 21**, kao primer je prikazana serija emisionih spektara uzorka meda dobijenih za različite talasne dužine ekscitacije u formi EEM mapa. Snimljeni spektri emisije fluorescencije u opsegu 280-550 nm, dobijeni su nakon ekscitacije na talasnim dužinama u opsegu 270-370 nm, čime je dobijena ekscitaciono-emisiona matrica koja je korišćena u daljim statističkim analizama.



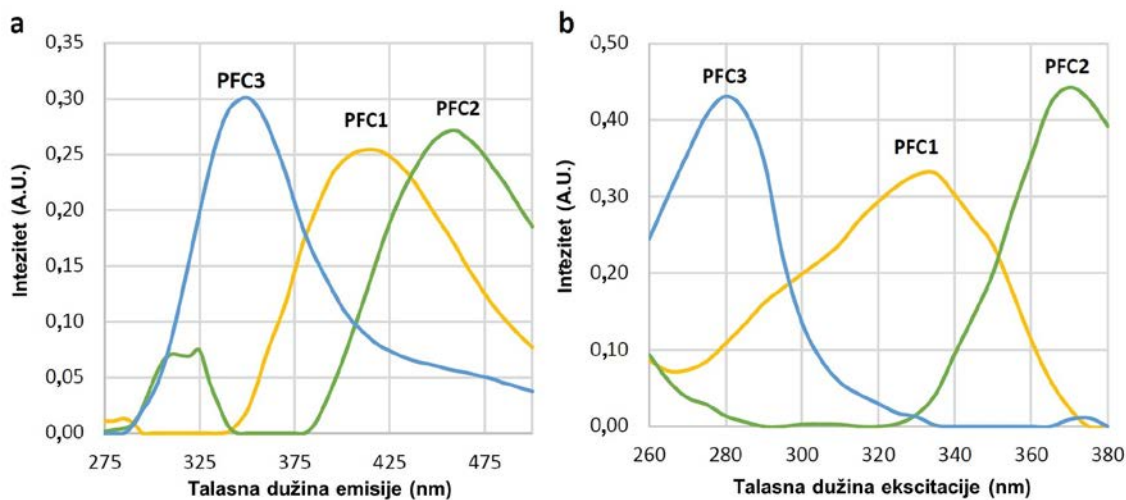
Slika 21. Ekscitaciono-emisione matrica za uzorak meda dobijen iz košnice sa infestacijom od 0,056% varoom.

Ekscitaciono-emisione matrice su dalje faktorizovane pomoću PARAFAC modela koji je izgrađen uzastopnim povećanjem broja komponenti, od 1 do 5. Praćenje promena u konzistentnosti jezgra modela sa promenama u složenosti modela sugerise da se spektralni podaci najbolje opisuju sa 3 komponente. Naime, kod modela sa više od 3 komponente uočen je nagli pad konzistencije jezgra (**Slika 22**), iako je procenat objašnjene varijanse modeliranim podacima bio zadovoljavajući. Konzistentnost jezgra osnovnog trokomponentnog PARAFAC modela bila je 83%, a procenat objašnjene varijanse prema jedinstvenom uklapanju modela i modela uklapanja je bio 79,02% odnosno 97,32%. Ograničenja nenegativnosti su nametnuta u sva tri načina.

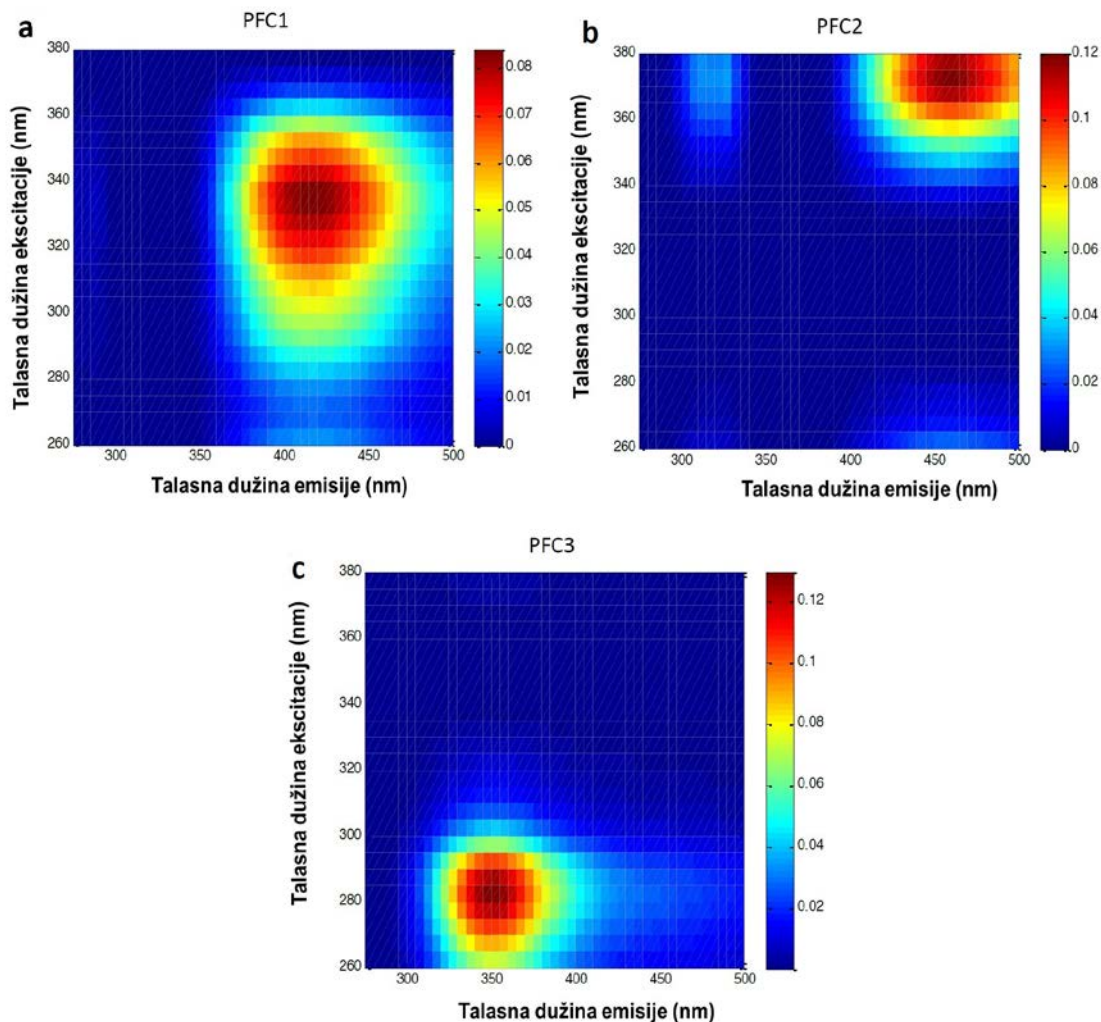


Slika 22. Konzistentnost jezgra (plava linija) i procenat objašnjene varijanse izražene kao uklapanje modela, jedinstveno uklapanje modela i jedinstveno uklapanje Ks (kao narandžaste, zelene i žute linije), za pet PARAFAC modela sa brojem komponenti koji se povećava sa 1 na 5.

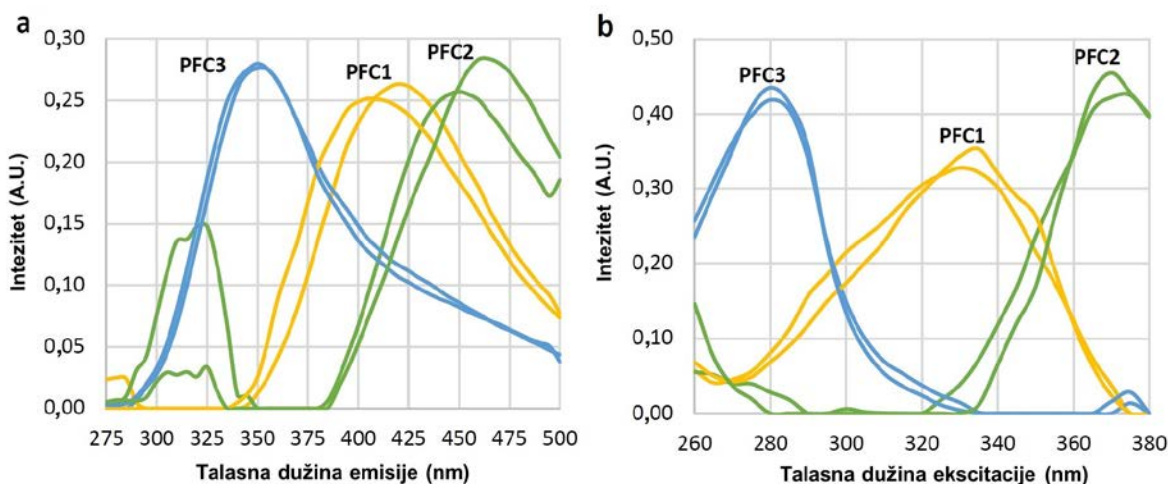
Vektori loadingova za tri PARAFAC komponente su dati na **Slici 23**. Ova dva grafika predstavljaju inherentne spektralne profile čiste emisije (a) i ekscitacije (b) karakterističnih fluorofora ispitivanih uzoraka meda. Vektor loadingova emisije u slučaju, prve PARAFAC komponente (PFC1), ima maksimum na 415 nm, dok odgovarajući vektor loadingova u slučaju ekscitacije dostiže maksimum na 335 nm. Prema prethodnim literaturnim podacima (Rodriguez i sar., 2001), ova komponenta se hipotetički može pripisati fenolnim jedinjenjima u medu. U slučaju druge komponente (PFC2), primećen je jedan maksimum emisije malog intenziteta (na 325 nm) i jedan istaknuti maksimum emisije na 460 nm. Za istu komponentu (PFC2) vektor loadingova u slučaju ekscitacije pokazuje maksimum intenziteta na 375 nm. Ovo se takođe može pripisati polifenolnim jedinjenjima u medu, koja emituju u ovom području nakon ekscitacije na 375 nm (Lang i sar., 1991; Radotić i sar., 2006). Treća komponenta ima maksimume emisije/ekscitacije na 330/280 nm i može biti povezana sa aromatičnim aminokiselinama, slobodnim ili u proteinima (Karoui i sar., 2007). Karakteristike emisije i ekscitacije vektora opterećenja sve tri PARAFAC komponente su predstavljene na uočljiviji način u obliku EEM mapa (**Slika 24**). Lako je uočiti karakteristične regione koji odgovaraju fenolnim jedinjenjima (leva sredina mape, 350-500 × 280-360 nm), polifenolnim jedinjenjima (gornji desni ugao mape, 400-500 × 340-380 nm), i aromatičnim aminokiselinama/proteinima (donji levi deo mape 300-400 × 260-300 nm). Rezultati *split-half* analize pokazuju da su i za obe polovine podataka dobijeni optimalni trokomponentni modeli. Emisioni i ekscitacioni loading profili za sve tri komponente, dobijeni iz jedne polovine podataka vrlo su bliski profilima dobijenim na osnovu druge polovine podataka (**Slika 25**). Ovakvo međusobno poklapanje profila loadingova dobijenih za oba dela podataka u slučaju sve tri komponente, kao i činjenica da se dobijeni profili poklapaju sa loadingovima odgovarajućih PARAFAC komponentata za celoviti model, svedoči da su spektralni podaci najbolje opisani trokomponentnim PARAFAC modelom.



Slika 23. Vektori loadingova a) emisije i b) pobude za tri PARAFAC komponente (PFC1-PFC3).



Slika 24. EEM mape a) za prvu, b) drugu i c) treću PARAFAC komponentu koja odgovara proteinima odnosno fenolnim jedinjenjima u uzorcima meda. Skala intenziteta je izražena u relativnim jedinicama.



Slika 25. Vektori opterećenja **a)** emisije i **b)** pobude za tri PARAFAC komponente (PFC1-PFC3) dobijene analizom *split-half*.

Biohemijske metode koje su rađene na ovim uzorcima su: određivanje ukupnih proteina i TPC spektrofotometrijski, SDS PAGE elektroforeza, određivanje aktivnosti enzima katalaze i dijastaze. SDS PAGE elektroforeza je rađena da bi se dobili proteinski profili uzoraka meda i da bi se potom ispitala varijacija sadržaja biljnih i pčelinjih proteina u medu. Međutim, nije utvrđena značajna razlika u proteinskom profilu analiziranih uzoraka, pa su primenjene osetljivije metode određivanja aktivnosti enzima, katalaze i dijastaze, kao marker enzima bijnog, odnosno pčelinjeg porekla. **Tabela 9** prikazuje rezultate aktivnosti katalaze, aktivnost i dijastaze, ukupnih proteina i TPC u košnicama različitog nivoa zaraze.

Tabela 9. Aktivnost katalaze i dijastaze, ukupni proteini i TPC u uzorcima meda različitog stepena infestacije pčelinjih društava varoom

Broj košnice	Zaraženost (%)	Aktivnost katalaze (min ⁻¹ po gramu meda)	Aktivnost dijastaze (DN)	Ukupni proteini (g/kg)	TPC (mg/kg)
1	0,000	8,321	17,800	0,378	0,423
2	0,000	14,292	23,180	0,341	0,423
3	0,000	23,271	16,450	0,441	0,570
4	0,054	13,120	28,370	0,442	0,708
5	0,056	18,667	16,690	0,407	0,450
6	0,058	14,565	16,370	0,531	0,481
7	0,106	16,079	17,390	0,267	0,384
8	0,264	22,818	14,320	0,305	0,438
9	0,618	25,608	20,870	0,243	0,349
10	1,252	67,411	25,930	0,451	0,508

Da bi se istražile moguće veze spektralnih karakteristika sa biohemijskim, hemijskim i palinološkim svojstvima uzoraka meda, kao i stepenom infestacije pčelinjih društava, izračunata je korelaciona matrica, zasnovana na Pirsonovom koeficijentu. Rezultati korelacije između PARAFAC skorova svih komponenti (PFC1-PFC3), te njihovih odnosa (PFC1/PFC3 i PFC3/PFC1) na jednoj strani, i biohemijskih podataka (aktivnost katalaze i dijastaze, ukupni proteini i TPC) sa druge strane predstavljeni su kao tabela korelacije (**Tabela 10**). Za broj uzoraka $n = 10$, smatra se da vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije veće od 0,632 i manje od -0,632 impliciraju statistički značajnu korelaciju između varijabli sa unapred definisanom značajnošću $p = 0,05$.

Dobijeni rezultati pokazuju znatno povećanje aktivnosti enzima katalaze u uzorcima meda iz košnica visoke zaraženosti varoom u poređenju sa uzorcima meda iz kontrolnih košnica. Korelacionom analizom je utvrđeno da između stepena zaraženosti i aktivnost katalaze postoji pozitivna korelacija ($r = 0,936$) i odsustvo korelacije sa aktivnošću dijastaze. Stoga, uočeni porast u aktivnosti enzima katalaze, može biti korišćen za procenu nivoa zaraze pčelinjih društava varoom. Ovi rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima, u kojima se navodi da promena u aktivnosti katalaze može da ukaže na stanje oksidativnog stresa kod pčelinjih društava (Margotta i sar., 2018). Naime, u stanju oksidativnog stresa dolazi do porasta koncentracije reaktivnih vrsta kiseonika (reactive oxygen species, ROS), kao i vodonik-peroksida koji je ujedno i supstrat enzima katalaze (Negri i sar., 2019). Ovaj enzim, ima antioksidativnu aktivnost i uklanja višak vodonik-peroksida razlažući ga do vode i kiseonika.

U radu koji su objavili Zamocky i saradnici sugerisano je da katalaza u medu može da potiče iz izvora zagađivača kao što su mikroorganizmi (Zamocky i sar., 2008). Uzorci meda testirani u ovom radu su se pokazali kao sterilni, a ono što bi se moglo pretpostaviti da bi jedan deo katalaze u medu (enzim koji je prisutan u svim živim ćelijama) mogao da potiče od spoljašnjih parazita pčela kao što je *V. destructor* u našem slučaju (Badotra i sar., 2013; Dmochowska-Ślęzak i sar., 2016). Za potvrdu ovih navoda bila bi potrebna detaljnija ispitivanja porekla katalaze u medu i njene varijabilnosti pod uticajem različitih vrsta stresa pčelinjeg društva, uključujući i zarazu.

Tabela 10. Koeficijent korelacije zaraženosti pčelinjih društava varoom u rasponu 0 - 1,25%, analizirani enzimi, ukupni proteini, TPC i PARAFAC komponente. Vrednosti Pirsonovog koeficijenta korelacije veće od 0,632 i manje od -0,632 impliciraju statistički značajnu korelaciju između varijabli sa unapred definisanom značajnošću $p = 0,05$.

	Zaraženost(%)	Katalaza	Dijastaza	Ukupni proteini	TPC	Pro/Phe*	Phe/Pro**	PFC1	PFC2	PFC3	PFC1/PF3	PFC3/PFC1
Zaraženost(%)	1,000	0,936	0,406	-0,047	-0,108	0,003	-0,036	0,656	0,513	0,608	0,061	-0,184
Katalaza	0,936	1,000	0,308	0,160	0,049	0,104	-0,154	0,753	0,672	0,662	0,223	-0,272
Diastaza	0,406	0,308	1,000	0,160	0,499	-0,271	0,298	0,706	0,606	0,700	-0,035	-0,080
Proteini	-0,047	0,160	0,160	1,000	0,653	0,648	-0,583	0,476	0,563	0,452	0,129	-0,066
TPC	-0,108	0,049	0,499	0,653	1,000	-0,149	0,221	0,590	0,728	0,414	0,466	-0,425
Pro/Phe	0,003	0,104	-0,271	0,648	-0,149	1,000	-0,984	0,003	-0,035	0,180	-0,377	0,416
Phe/Pro	-0,036	-0,154	0,298	-0,583	0,221	-0,984	1,000	0,004	0,040	-0,181	0,376	-0,440
PFC1	0,656	0,753	0,706	0,476	0,590	0,003	0,004	1,000	0,938	0,907	0,276	-0,310
PFC2	0,513	0,672	0,606	0,563	0,728	-0,035	0,040	0,938	1,000	0,753	0,521	-0,486
PFC3	0,608	0,662	0,700	0,452	0,414	0,180	-0,181	0,907	0,753	1,000	-0,131	0,115
PFC1/PFC3	0,061	0,223	-0,035	0,129	0,466	-0,377	0,376	0,276	0,521	-0,131	1,000	-0,941
PFC3/PFC1	-0,184	-0,272	-0,080	-0,066	-0,425	0,416	-0,440	-0,310	-0,486	0,115	-0,941	1,000

* odnos sadržaja ukupnih proteina i TPC;

** odnos sadržaja TPC i ukupnih proteina

Stepen zaraze je u pozitivnoj korelaciji sa prvom komponentom PARAFAC (PFC1), koja potiče od fenolnih jedinjenja u medu. Ovo ukazuje da PFC1 može ukazivati na stepen zaraze košnica zaraženih varoom. PARAFAC rezultati za sve tri komponente su takođe u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću katalaze, ali ne u meri koja bi se mogla koristiti za predviđanje. Ovakva pozitivna korelacija između aktivnosti katalaze i fenolnih spektralnih komponenti može biti posledica činjenice da obe potiču iz istih biljnih izvora. Ranija istraživanja su pokazala da katalaza potiče iz polena, dok fenoli potiču iz nektara (Dustman, 1971; Ferreres i sar., 1996; Gillette, 1931). Pozitivna korelacija između katalaze i PFC3 (proteinske spektralne komponente) je potvrda da treća PARAFAC komponenta potiče uglavnom od proteina. Slično, aktivnost dijastaze pokazuje statistički značajnu pozitivnu korelaciju sa PFC1 i PFC3. Pored toga, PFC2 pokazuje značajnu korelaciju sa TPC ($r = 0,728$), što je potvrda da druga komponenta PARAFAC potiče uglavnom od fenolnih jedinjenja. U **Tabeli 11** se mogu videti vrste polena koje su se nalazile u analiziranim uzorcima meda sa značajnim doprinosom izvora nektara. Karakteristični Trnovac (*Gleditsia triacanthos*) je potvrđen kod uzoraka sa zarazama 0,000% i 0,058%, dok kod uzorka sa zarazom 0,054% dominira polen anemofilne ambrozije (*Ambrosia* sp.). Ovo ukazuje na kontaminaciju koja potiče od pčelinjeg polena koji pčele sakupljaju i skladište za ishranu larvi. Generalno, prisustvo i koncentracija polena u uzorcima meda nije u korelaciji sa izmerenim parametrima.

Tabela 11. Koncentracija različitih tipova polena u uzorcima meda iz košnica različitog stepena zaraženosti varoom.

Koncentracija polena (PZ/10 g)										
Zaraženost (%)	0,000	0,000	0,000	0,054	0,056	0,058	0,100	0,260	0,620	1,250
<i>Ambrosia</i> sp.	89,32									
<i>Amorpha fruticosa</i>	45,56	56,44	11,76		25,45		48,66	20,95	77,59	
<i>Gleditsia triacanthos</i>			17,24			21,77				
<i>Prunus</i> sp.						43,08		17,14		33,53
<i>Robinia pseudoacacia</i>								18,09		
<i>Trizonocolporate reticulate</i>			12,58							
<i>Vitis</i> sp.										28,29
neindetifikovani	16,67				32,30	15,87	23,95	28,09		

Ono što je zaključeno u ovom istraživanju je da su rezultati korelacione analize pokazali da aktivnost enzima katalaze u medu i PFC1 PARAFAC komponenta (fenolna fluorofora) mogu biti upotrebljeni za procenu nivoa zaraze pčelinjih kolonija varoom, analizom odgovarajućih uzoraka meda. Naši rezultati ukazuju da se fluorescentna spektroskopija i biohemijske analize uzoraka meda mogu koristiti za posmatranje efekata drugih vrsta spoljašnjih stresora na pčelinja društva.

4.5. Ispitivanje veze između fizičko-hemijskih parametara u uzorcima meda i procene stepena infekcije košnica korišćenjem Analize glavnih komponenata (PCA)

Ispitani su sledeći fizičko-hemijski parametri u uzorcima meda: sadržaj vode, električna provodljivost, specifična optička rotacija i slobodna kiselost, primenom metoda preporučenih od strane Međunarodne komisije za med (IHC). Rezultati fizičko-hemijskih parametara uzoraka meda iz 2018. godine koji potiču iz košnica zaraženih nozemom su prikazani u **Tabeli 12**.

Tabela 12. Rezultati fizičko-hemijskih parametara za uzorke meda koji potiču iz košnica različitog stepena zaraze nozemom (kod optičke rotacije znak - znači levorotacioni, a znak + desnorotacioni med).

Uzorci meda	Zaraženost košnica nozemom (%)	Sadržaj vode (%)	Slobodna kiselost (meq/kg)	Vrednost specifične optičke rotacije (°)	Električna provodljivost na 20 °C (mS/cm)
1	0,00	13,10	31,83	-30,25	0,60
2	10,00	14,70	24,08	-25,75	0,54
3	13,33	14,85	25,76	-24,25	0,57
4	23,33	15,00	20,64	-5,25	0,43
5	30,00	16,20	13,76	1,50	0,22
6	43,33	16,30	13,61	-1,50	0,22
7	63,33	16,35	12,72	1,25	0,22
8	100,00	17,30	13,85	-1,25	0,23

Dobijeni rezultati ukazuju da uzorci uglavnom ispunjavaju propisane zahteve kvaliteta meda (Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, 2015).

Rezultati pokazuju da sa porastom zaraženosti košnica nozemom u uzorcima meda raste sadržaj vode (**Tabela 12**). Najniža vrednost sadržaja vode (13,10%) izmerena je u medu koji potiče iz košnice čije pčele nisu bila inficirane sporama nozeme, dok najviša vrednost sadržaja vode (17,30%) je određena u medu koji je poreklom iz košnice gde su sve pčele bile zaražene. Poznato je da sadržaj vode zavisi od botaničkog porekla nektara, klimatskih prilika tokom sezone, stepena zrelosti meda koji je dostignut u košnici, pčelarske tehnike i uslova skladištenja meda (Bogdanov i sar., 2004; Pascual–Mate, 2018). Svi uzorci meda ukazuju na odgovarajući stepen zrelosti, u skladu sa međunarodnim zahtevima za sadržaj vode koji bi trebalo da bude niži od 20% (*Council Directive 2001/110/EC*).

Rezultati slobodne kiselosti meda opadaju sa porastom infekcije nozemom odgovarajućih košnica (**Tabela 12**). Najviša vrednost slobodne kiselosti (31,83 meq/kg) je utvrđena u medu koji je poreklom iz košnice čije pčele nisu bila inficirane, dok niže vrednosti su primećene kod visoko zaraženih košnica. Slobodna kiselost je blisko vezana za proces kvarenja meda. Povećane vrednosti slobodne kiselosti (iznad 50 meq/kg) u uzorcima meda su pokazatelj fermentacije šećera koji prelaze u kiseline (da Silva i sar., 2016), što nije slučaj sa našim uzorcima.

Ukoliko se posmatraju apsolutne vrednosti specifične optičke rotacije meda može se primetiti da opadaju sa porastom zaraženosti košnica nozemom. Optička rotacija meda zavisi od sastava i koncentracije šećera, kao i od toga da li su pčele med napravile od medljikovca (obrću

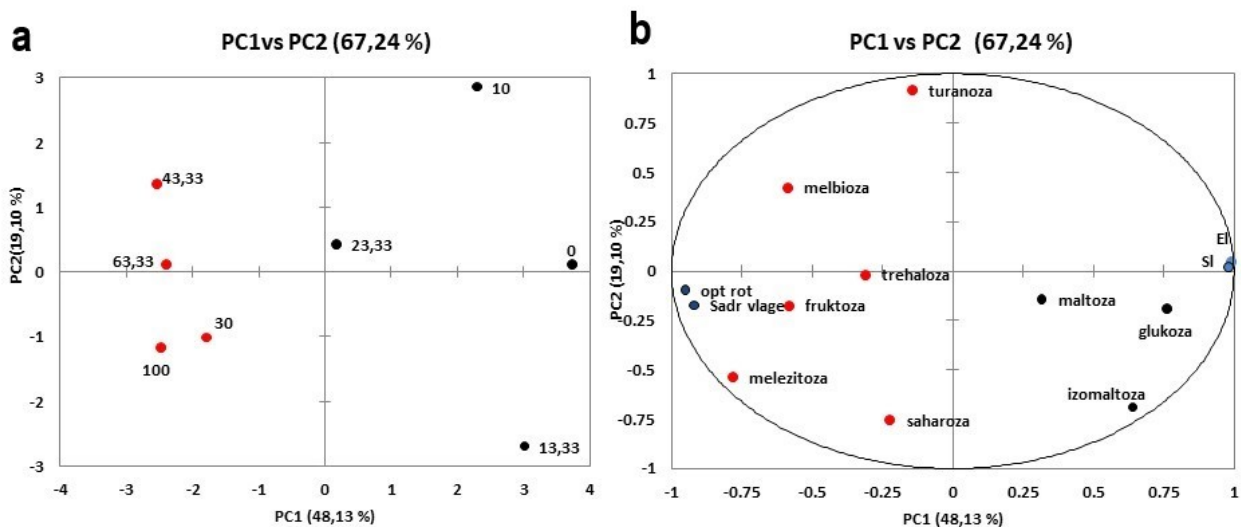
ugao polarizovane svetlosti u desno - desnorotacioni) ili od nektara (obrću ugao polarizovane svetlosti u levo - levorotacioni) (Bogdanov i sar., 1999; Dinkov, 2003). Vrednosti optičke rotacije naših uzoraka imaju većinom negativnu vrednost što ukazuje da je med poreklom od nektara.

Električna provodljivost uzoraka meda opada sa porastom zaraženosti košnica nozemom. Uzorak meda koji potiče iz košnice gde pčele nisu bile inficirane imao je najveću vrednost električne provodljivosti (0,600 mS/cm), dok med poreklom iz visokozaraženih košnica je imao značajno manje vrednosti električne provodljivosti (0,230 mS/cm). Električna provodljivost je parametar koji se vrlo često koristi u rutinskoj kontroli kvaliteta meda i može se smatrati validnim kriterijumom za određivanje botaničkog porekla uzoraka meda i razlikovanje meda koji potiče od nektara i medljike (Bogdanov i sar., 2004). Zavisi od minerala, organskih kiselina i sadržaja proteina u medu.

Visoko efikasna jonska hromatografija sa pulsno-amperimetrijskom detekcijom (HPAEC/PAD) primenjena je za određivanje šećera i dobijen je šećerni profil za uzorke meda što je prikazano u **Tabeli 13**. Fruktaza i glukoza su utvrđene kao najzastupljeniji šećeri u svim ispitivanim uzorcima. Sadržaj oba šećera je u granicama utvrđenim zakonodavstvom EU (*Council Directive* 2001/110/EC). Povećane vrednosti sadržaja glukoze u uzorcima meda (343,60-311,90 g/kg) utvrđene su kod društava niže zaraženosti nozemom (0-30%). Kod uzoraka meda koji potiču iz košnica veće zaraze (43,33-100%), vrednosti glukoze su manje (246,50-278,30 g/kg). Sadržaj saharoze je dva puta veći u uzorku meda koji potiče iz košnice u kojoj su sve pčele bile inficirane sporama nozeme u odnosu na uzorak iz nezaražene košnice. Međutim, ostali rezultati sadržaja pojedinačnih šećera u uzorcima meda pokazali su varijabilnost između košnica različite zaraženosti.

Tabela 13. Sadržaj šećera u uzorcima meda (g/kg) iz košnica zaraženih nozemom.

Uzorci meda	Zaraženost košnica nozemom (%)	Glukoza	Fruktoza	Saharoza	Trehaloza	Melbioza	Izomaltoza	Turanoza	Maltoza	Melezitoza
1	0,00	343,60	404,20	28,90	00,40	00,20	30,10	06,20	14,90	02,50
2	10,00	301,80	318,80	33,90	00,30	00,40	09,50	15,50	12,20	00,30
3	13,33	313,70	311,60	53,60	00,10	00,00	68,30	03,00	07,70	03,30
4	23,33	324,70	326,30	40,50	01,10	00,30	07,60	09,80	08,60	04,10
5	30,00	311,90	427,90	42,80	01,00	00,20	09,40	07,10	13,20	05,20
6	43,33	246,50	390,20	36,10	00,10	00,70	01,60	10,10	02,50	04,40
7	63,33	244,00	395,20	37,10	00,60	00,20	04,00	08,60	04,00	05,10
8	100,00	278,30	427,90	54,30	00,50	00,60	19,10	08,20	15,90	05,10



Slika 26. Analiza glavnih komponenata (PCA) razdvajanja uzoraka meda na osnovu fizičko-hemijskih parametara koji potiču iz košnica različitog stepena infekcije sa nozomom **a)** grafik skorova; **b)** grafik promjenljivih (*loadingsa*).

Na **Slici 26** prikazani su rezultati analize glavnih komponenata grafik skorova i grafik promjenljivih (*loadingsa*). Analiza glavnih komponenata (*Principal component analysis, PCA*) primenjena na dobijene rezultate fizičko-hemijskih analiza i sadržaja šećera uzoraka meda rezultovala je modelom kojim se objašnjava 67,24% ukupne varijacije od čega 48,13% se odnosi na PC1 i 19,10% na PC2. Informacije sadržane u preostalim varijablama nisu bile značajne za analizu posmatranih podataka. Uzorci obeleženi crvenom bojom na grafiku skorova predstavljaju uzorke meda iz visokozaraženih košnica i lokalizovani su na levoj strani grafika skorova analize glavnih komponenata. Duž PC1 ose razdvojili su se medovi iz visokozaraženih košnica koje karakterišu niže apsolutne vrednosti optičke rotacije i više vrednosti sadržaja vode. Sadržaj ukupnih šećera fruktoze, melbioze i melezitoze se nalazi u većoj količini kod uzoraka meda iz košnica višeg stepena infekcije nozomom, u odnosu na uzorke meda koji potiču iz košnica manje zaraženosti. Sa druge strane, glukoza i izomaltoza su prisutne u većim količinama u uzorcima meda iz košnica manje zaraženosti sporama *N. Ceranae* u odnosu na uzorke iz košnica veće zaraženosti. Desna strana grafika skorova pripada uzorcima (obeleženi crnom bojom) iz manje zaraženih košnica. Najveći doprinos u ovom slučaju daju električna provodljivost i slobodna kiselost koje imaju više vrednosti kod uzoraka meda koji potiču iz manje zaraženih košnica nozomom, kao i glukoza i izomaltoza kojih takođe ima više u ovim uzorcima u odnosu na uzorke koji potiču iz više zaraženih košnica.

Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni DSC analizom, a koji su ukazali da ima promena u okruženju šećera kao glavnog sastojka u uzorcima meda (Stanković i sar., 2021). Ovo se može dovesti u vezu sa povećanim sadržajem vode u uzorcima koji potiču iz košnica veće zaraze (**Tabela 12**). Fizička svojstva meda, kao što su kristalizacija i viskozitet, zavise od sadržaja vode u medu (Hartel i sar., 2011; Tigistu i sar., 2021). U procesu kristalizacije šećeri prelaze u kristalni oblik, čime se povećava sadržaj vode u tečnoj fazi meda (Escuredo i sar., 2014).

Sadržaj šećera, specifična optička rotacija, električna provodljivost, sadržaj vlage i slobodna kiselost su određeni radi dobijanja dodatnih karakteristika uzoraka meda i pokazalo se da i ovi parametri mogu biti od pomoći u razdvajanju pčelinjih društava različitog stepena zaraze.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati predstavljeni u okviru ove disertacije deo su prvog sistematskog istraživanja veze između karakterističnih fizičko-hemijskih i biohemijskih parametara meda i stresa pčelinjih društava, konkretno zaraze društava parazitima *Varroa destructor* i *Nosema ceranae*.

Dobijene su odgovarajuće proteinske i fenolne komponente emisionih spektara meda korišćenjem metode multivarijacione rezolucije krivih – naizmenični najmanji kvadrati (MCR-ALS) koja je primenjena na ekscitaciono-emisione matrice uzoraka meda. Određena je površina proteinske i fenolne komponente i izračunat njihov odnos. Taj odnos je bio u skladu sa rezultatima kvantifikacije ukupnih proteina i ukupnih fenola (TPC) koji su dobijeni korišćenjem spektrofotometrijskih testova.

Pokazano je da se odnos proteinske i fenolne komponente u ispitivanim uzorcima meda smanjuje sa porastom nivoa infekcije u odgovarajućim košnicama, bilo da su zaražene parazitima *N. ceranae* ili *V. destructor*. Uočena promena odnosa protein/fenol u medu može ukazivati na promene stanja u pčelinjem društvu koje je izloženo biotičkom stresu.

Odnos spektralnih komponenti koje odgovaraju fluoroforama proteina i fenola u uzorcima meda pokazao se pogodan parametar za praćenje promena kvaliteta homogenizacije meda i godišnje varijabilnosti uzoraka.

Rezultati odnosa spektralnih komponenti koje odgovaraju fluoroforama proteina i fenola u uzorcima meda ukazuju da oksalna kiselina nije promenila pčelinju sintezu proteina, što ukazuje da oksalna kiselina, kao zaštitno sredstvo od krpelja *V. destructor*, nije štetna za pčele.

Stepen zaraze je u pozitivnoj korelaciji sa prvom komponentom PARAFAC (PFC1), koja potiče od fenolnih jedinjenja u medu. Ovo ukazuje da PFC1 može biti indikator za procenu nivoa zaraze pčelinjih kolonija varoom, kao vrstom biotičkog stresa. PARAFAC rezultati za sve tri komponente su takođe u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću katalaze, ali ne u meri koja bi se mogla koristiti za predviđanje.

Korišćenjem SDS PAGE elektroforeze nije utvrđena razlika u proteinskom profilu analiziranih uzoraka meda.

Aktivnost katalaze prati promene u stepenu zaraze pčelinjih društava varoom. Korelaciona analiza je pokazala da se stepen zaraze nalazi u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću katalaze i može biti korišćeno za skrining meda poreklom iz košnica zaraženih varoom.

Nije utvrđena promena aktivnosti dijastaze u uzorcima meda koji su dobijeni iz društava zaraženih parazitima *V. destructor* i *N. ceranae*.

Metodom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC) dobijena je promena u entalpiji uzoraka meda u slučaju infekcija varoom i nozemom. Uočeno je povećanje, a zatim smanjenje entalpije sa povećanjem stepena zaraze varoom. Postojao je trend početnog smanjenja, a zatim povećanja entalpije sa povećanjem nivoa infekcije nozemom.

Specifična optička rotacija, električna provodljivost, sadržaj vlage, slobodna kiselost i sadržaj šećera su određeni radi dobijanja dodatnih karakteristika uzoraka meda i pokazano je da se na osnovu razlika u vrednostima ovih veličina u uzorcima meda može bolje razumeti uticaj stepena infekcije na pčelinja društva. Ovi rezultati pokazuju da sa porastom infekcije košnica nozemom u uzorcima meda, raste sadržaj vode dok slobodna kiselost, apsolutna vrednost specifične optičke

rotacije i električna provodljivost opadaju. PCA je pokazala da sadržaj ukupnih šećera fruktoze, melbioze i meleziotoze se nalazi u većoj količini kod uzoraka meda iz košnica višeg stepena infekcije, u odnosu na uzorke meda koji potiču iz košnica manje zaraženosti. Sa druge strane, glukoza i izomaltoza su prisutne u većim količinama u uzorcima manje zaraženosti u odnosu na uzorke iz košnica veće zaraženosti.

Razmatrajući sve uzorke, utvrđeno je da ne postoji veza između prisustva i koncentracije polena u uzorcima meda, koji su određeni melizopalinološkom analizom, i zaraženosti društava parazitima *V. destructor* i *N. ceranae*. Sa druge strane, veći doprinos polena iz određenih biljnih vrsta u slučajevima pojedinih uzoraka može biti razlog neslaganja u odnosu proteina i fenola određenim spektrofotometrijskom i spektrofotometrijskom metodom.

Pokazano je da se fluorescentna spektroskopija može koristiti za brzo i pouzdano ispitivanje varijabilnosti uzoraka meda. Spektrofotometrijska procena relativnog sadržaja fenola i proteina može imati prednost u odnosu na postojeće metode koje se koriste za kvantifikaciju proteina i fenola u medu, jer se radi bez postupka pripreme uzorka. Ova metoda omogućava istovremeno određivanje proteina i fenola, jer su jasno razdvojeni njihovi maksimumi u emisionim spektrima. Dobijeni rezultati u okviru ove disertacije mogu biti osnova za razvijanje novih spektroskopsko-statističkih metoda za procenu uticaja faktora stresa na stanje pčelinjih društava. Predložen je savremen i neinvazivan pristup za praćenje zdravstvenog stanja pčela, što je od značaja za blagovremene aktivnosti u cilju sprečavanja širenja zaraze.

Fluorescentna spektroskopija i biohemijske analize, kao i određene fizičko-hemijske analize uzoraka meda mogle bi se potencijalno koristiti ne samo za procenu uticaja zaraženosti parazitima *V. destructor* i *N. ceranae*, nego i efekata drugih vrsta spoljašnjih stresora na pčelinja društva.

6. LITERATURA

- Aizen, M.A., Harder, L.D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current Biology*, 19, 915–918.
- Alaux, C., Dantec, C., Parrinello, H., Le Conte, Y. (2011). Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics*, 12, 496.
- Alghamdi, B.A., Alshumrani, E.S., Bin Saeed, M.S., Rawas, G.M., Alharthi, N.T., Baeshen, M.N., Helmi, N.M., Alam, M.Z., Suhail, M. (2020). Analysis of sugar composition and pesticides using HPLC and GC–MS techniques in honey samples collected from Saudi Arabian markets. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27, 3720–3726.
- Aliferis, K.A., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., Alissandrakis, E. (2010). Botanical Discrimination and Classification of Honey Samples App`lying Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Fingerprinting of Headspace Volatile Compounds. *Food Chemistry*, 121(3), 856-862.
- Amdam, G.V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W. (2004). Altered Physiology in Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Infested with the Mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A Factor in Colony Loss During Overwintering? *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 741-747.
- Amiot, M.J., Aubert, S., Gonnet, M., Tacchini, M., (1989). Phenolic composition of honeys: Preliminary study on identification and group quantification. *Apidologie*, 20, 115-125.
- Anklam, E., (1998). A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63(4), 549-562.
- Arismendi, N., Caro, S., Castro, M.P., Vargas, M., Riveros, G., Venegas, T. (2020). Impact of mixed infections of gut parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae* on the lifespan and immune-related biomarkers in *Apis mellifera*. *Insects*, 11, 420.
- Babacan, S., Rand, A.G. (2007). Characterization of Honey Amylase. *Journal of Food Science*, 72, 50-55.
- Badaoui, B., Fougeroux, A., Petit, F., Anselmo, A., Gorni, C., Cucurachi, M., Cersini, A., Granato, A., Cardeti, G., Formato, G., Mutinelli, F. (2017). RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *PLoS One*, 12(3), e0173438.
- Badotra, P., Kumar, N.R., Harjai, K. (2013). *Varroa* causes oxidative stress in *Apis mellifera* L. *Journal of Global Biosciences*, 2 (6), 199-201.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A.G. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57, 530-533.
- Baroni M.V., Chiabrande G.A., Costa C., Wunderlin D.A. (2002). Assessment of the floral origin of honey by SDS-page immunoblot techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1362–1367.
- Bartolić, D., Stanković, M., Mutavdžić, D., Stanković, S., Jovanović, D., Radotić, K. (2018). Multivariate curve resolution - Alternate least square analysis of excitation-emission matrices for maize flour contaminated with aflatoxin B1. *Journal of Fluorescence*, 28(3), 729–733.

- Bauer, L., Kohlich, A., Hirschwehr, R., Siemann, U., Ebner, H., Scheiner, O., Kraft, D., Ebner, C. (1996). Food allergy to honey: pollen or bee products? Characterization of allergenic proteins in honey by means of immunoblotting. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97, 65–73.
- Beaurepaire, A.L., Krieger, K.J., Moritz, R.F. (2017). Seasonal cycle of inbreeding and recombination of the parasitic mite *Varroa destructor* in honeybee colonies and its implications for the selection of acaricide resistance. *Infection, Genetics and Evolution*, 50, 49–54.
- Beretta G., Granata P., Ferrero M., Orioli M., Facino RM. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185–91.
- Bilikova K., Simuth J. (2010). New criterion for evaluation of honey: quantification of royal jelly protein apalbumin 1 in honey by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8776–8781.
- Bilikova, K., Trusheva, P.M., Bankova, B.V. (2013). New anti-*Paenibacillus* larvae substances purified from propolis. *Apidologie*, 44, 278-285.
- Belsky, J., Joshi, N.K., (2019). Impact of Biotic and Abiotic Stressors on Managed and Feral Bees. *Insects*, 10(8), 1-42.
- Bocian A., Buczkowicz J., Jaromin M., Hus K.K., Legáth J. (2019). An Effective Method of Isolating Honey Proteins. *Molecules*, 24, 2399.
- Bogdanov S., Kilchemann V., Fluri P., Buhler U., Lavanchy P. (1999). Influence of organic acids and components of essential oils on honey taste. *American Bee Journal*, 139 (1), 61-6.
- Bogdanov S., Ruoff K., Persano Oddo L. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: A review. *Apidologie*, 35, S4-S17.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37, 1-18.
- Bogdanov S., Jurendic T., Siebert R. (2008). Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- Bogdanov, S. (2010a). The Book of Honey, Chapter 1, A Short History of Honey, Bee Product Science.
- Bogdanov, S. (2011). Harmonized Methods of the International Honey Commission, *International Honey Commission* (IHC responsible for the methods: Stefan Bogdanov, Bee Product Science).
- Bonvehí, S.J. (2000). Invertase activity in fresh and processed honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 507–512.
- Bortolotti, A., Wong, Y.H., Korsholm, S.S., Bahring, N.H.B., Bobone, S., Tayyab, S., Van de Weert, M., Stella, L. (2016). On the purported “backbone fluorescence” in protein three-dimensional fluorescence spectra. *RSC Advances*, 6(114), 112870–112876.
- Botías, C., Martín-Hernández, R., Barrios, I., Meana, A., Higes, M. (2013) *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level. *Veterinary Research* 2013, 44, 1-14.
- Bouseta, A., Scheirman, V., Collin, S. (1996). Flavor and free amino acid composition of lavender and eucalyptus honey. *Journal of Food Science*, 61, 683–687.

- Bowen-Walker, P.L., Gunn, A. (2001). The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 101, 207–217.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-54.
- Bro, R. (1997). PARAFAC, Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 38, 149–171.
- Bro, R., Kiers, H. A. L. (2003). A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *Journal of Chemometrics*, 17, 274–286.
- Brodtschneider, R., Gray, A., Adjlane, N., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Dahle, B., de Graaf, D., Dražić, M.M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gregorc, A., Grzęda, U., Hetzroni, A., Kauko, L., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Medina-Flores, C.A., Mutinelli, F., Raudmets, A., Ryzhikov, V.A., Simon-Delso, N., Stevanovic, J., Uzunov, A., Vejsnæs, F., Wöhl, S., Zammit-Mangion, M., Danihlík, J. (2018). Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research*, 57 (3), 452-457.
- Brudzynski, K., Miotto D. (2011). The relationship between the content of Maillard-reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys. *Food Chemistry*, 124, 867–874.
- Burlando, B., Cornara, L. (2013). Honey in dermatology and skin care: a review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12(4), 306-313.
- Cajka, T., Hajšlová, J., Cochran, J., Holadová, K., Klimánková, E. (2007). Solid phase microextraction-comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the analysis of honey volatiles. *Journal of Separation Science*, 30, 534-546.
- Can, Z., Yildiz, O., Sahin, H., Akyuz, T. E., Silici, S., Kolayli, S. (2015). An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*, 180, 133–41.
- Chantawannakul, P., Guzman, L.L., Li, J., Williams, G.R. (2016). Parasites, pathogens, and pests of honeybees in Asia. *Apidologie*, 47, 301–324.
- Chua, L. S., Lee, J. Y., Chan, G. F. (2013). Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(10), 3063–3074.
- Codex Alimentarius Commission (2001). Revised Codex Standard for Honey, *Codex STAN 12-1981*, Rev.1 (1987), Rev.2 (2001).
- COLOSS- honey bee research association (<https://coloss.org/>).
- Council directive 2001/110/EC (2001) Official Journal of the European Communities of 20 December 2001 relating to honey, L10/47-L10/52.
- Cremer, S., Armitage, S.A., Schmid-Hempel, P. (2007). Social immunity. *Current Biology*, 17, 693-702.
- Csáki, T., Heltai, M., Markolt, F., Kovács, B., Békési, L., Ladányi, M., Péntek-Zakar, E., Meana, A., Botfás, C., Martín-Hernández, R., Higes, M. (2015). Permanent prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(3), 358–369.

- Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L., Neumann, P. (2012a). Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. *PLoS ONE*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151>.
- Dainat, B., vanEngelsdorp, D., Neumann, P. (2012b). Colony collapse disorder in Europe, *Environmental Microbiology Reports*, 4(1),123-5.
- Danforth, B.N., Sipes, S., Fang, J., Brady, S.G. (2006). „The history of early bee diversification based on five genes plus morphology”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (41), 15118—15123.
- Da Silva, P.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309-323.
- Davies, A.M.C., Harris, R.G. (1982). Free amino acid analysis of honeys from English and Walse: Application to the determination of geographical origin of honeys. *Journal of Apicultural Research*, 21, 168-173.
- DeGrandi-Hoffman, G., Chen Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 170–176.
- Delgado, C., Tomás-Barberán, F.A., Talou, T., Gaset, A. (1994). Capillary electrophoresis as an alternative to HPLC for determination of honey flonoids. *Chromatographia*, 38, 71-78.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D., Locke, B., Delaplane, K. S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., Ellis, J. D. (2013a). Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–54.
- Dietemann, V., Ellis J.D., Neumann P. (2013b). The COLOSS BEEBOOK Volume I: Standard Methods for Apis mellifera Research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–4.
- Di Prisco G., Annoscia D., Margiotta M., Ferrara R., Varricchio P., Zanni V., Caprio E., Nazzi F., Pennacchio F. (2016). A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, 3203-3208.
- Dinkov, D. (2003). A scientific note on the specific optical rotation of three honey types from Bulgaria. *Apidologie*, 34, 319–320.
- Dmochowska-Ślęzak, K., Dmitryjuk, M., Zaobidna, E., Żółtowska, K. (2016). The antioxidant defense system of *Varroa destructor* mites facilitates the infestation of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 60, 163-165.
- Doner L.W. (1977). The sugars of honey-A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(5), 443–56.
- Dramićanin, T., Lenhardt Acković, L., Zeković, I., Dramićanin, M. D. (2018). Detection of Adulterated Honey by Fluorescence Excitation-Emission Matrices. *Journal of Spectroscopy*, 1–6.
- Dustman, J. H. (1971). UÈber die KatalaseaktivitaÈt in Bienenhonig aus der Tracht der HeidekrautgewaÈchse (Ericaceae). *Zeitschrift fuÈr Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 145, 292-295.

Dynes, T. L., Berry, J. A., Delaplane, K. S., Brosi, B. J., De Roode, J. C. (2019). Reduced density and visually complex apiaries reduce parasite load and promote honey production and overwintering survival in honey bees. *PLoS One*, 14, 1–16.

Emsen, B., Guzman-Novoa, E., Kelly P., G. (2013). Honey production of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies with high and low *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) infestation rates in eastern Canada. *Entomological Society of Canada*, 146: 236–240.

Escriche, I., Kadar, M., Juan-Borrás, M., Domenech, M. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment, *Food Chemistry*, 142, 135-143.

Escuredo, M., Dobre I., Fernández-González M., Seijo M., S. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84–90.

European Food Safety Authority (EFSA). Bee-health topic. Dostupno na: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bee-health>.

Evans, J.D., Spivak, M. (2010). Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), 62-72.

Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., and Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58, 8139–8144.

Farrar, C. L. (1942). *Nosema* disease contributes to winter losses and queen supersedure. *Gleanings in Bee Culture*, 70, 660-661.

Farrar, C. L. (1947). *Nosema* losses in package bees as related to queen supersedure and honey yields. *Journal of Economic Entomology*, 40(3), 333-338.

Fernández Izquierdo, M. E., Quesada Granados, J., Villalón Mir, M., López, M.C. (2000). Comparison of methods for determining coumarins in distilled beverages. *Food Chemistry*, 70, 251–258.

Ferreres, F., Blázquez, M.A., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A. (1994a). Separation of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 669 (1-2), 268-274.

Ferreres, F., Giner, J.M., Tomás-Barberán, F.A. (1994b). A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65, 371-372.

Ferreres, F., Andrade, P., Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A. (1996). Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 202, 40–44.

Floris, I., Satta, A., Cabras, P., Garau, V.L., Angioni, A. (2004). Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. *Journal of Economic Entomology*, 97, 187-191.

- Francis, R.M., Nielsen, S.L., Kryger, P. (2013). Varroa–virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE*, 8:e57540.
- Fries, I., Ekbohm, G., Villumstad, E. (1984). *Nosema apis*, sampling techniques and honey yield. *Journal of Apicultural Research*, 23(2), 102-105.
- Fries I. (1993). *Nosema Apis*-A Parasite in the Honey Bee Colony, *Bee World*, 74(1), 5-19.
- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J. (1996). *Nosema ceranae* n .sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, 32, 356–365.
- Fries, I., Martín-Hernández, R., Meana, A., García-Palencia, P., Higes, M. (2006). Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 45, 230–233.
- Gašić, U., Šikoparija, B., Tosti, T., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D., Natić, M., Tešić, Ž., (2014). Phytochemical Fingerprints of Lime Honey Collected in Serbia. *Journal of AOAC International*, 97, 1259–1267.
- Gheldof, N., Engeseth, N., J. (2002b). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3050-5.
- Giansante L., Di Vincenzo D, Bianchi G. (2003). Classification of monovarietal Italian olive oils by unsupervised (PCA) and supervised (LDA) chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(9), 905–11.
- Gilbert, J., Shepherd, M.J., Wallwork, M.A., Harris, R.G. (1981). Determination of the geographical origin of honeys by multivariate analysis of gas chromatographic data on their free amino acid content. *Journal of Apicultural Research*, 20, 125-135.
- Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O., Raine, N.E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature*, 491, 105–108.
- Gillette, C. (1931). Honey catalase. *Journal of Economic Entomology*, 24, 605–606.
- Glavinic U., Stankovic B., Draskovic V., Stevanovic J., Petrovic T., Lakic N., Stanimirovic Z. (2017). Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE*, 12, e0187726.
- Glavinic, Stevanovic J., Ristanic M., Rajkovic M., Davitkov D., Lakic N., Stanimirovic Z. (2021a). Potential of fumagillin and *Agaricus blazei* mushroom extract to reduce *Nosema ceranae* in honey bees. *Insects*, 12, 282.
- Glavinic U., Rajkovic M., Vunduk J., Vejnovic B., Stevanovic J., Milenkovic I., Stanimirovic Z. (2021b). Effects of *Agaricus bisporus* mushroom extract on honey bees infected with *Nosema ceranae*. *Insects*, 12, 915.
- Goblirsch, M. (2018). *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* , 49, 131–150 .

- Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1220-1234.
- Gonzalez-Miret, M.L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernandez-Recamales, M.A., Heredia, F.J. (2005). Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2574-2580.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347 (6229), 1122-1126.
- Gray, A., Brodschneider, R., Adjlane, N., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Cornelissen, B., da Costa, C.A., Csáki, T., Dahle, B., Danihlík, J., Dražić, M.M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., de Graaf, D., Gregorc, A., Johannesen, J., Kauko, L., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Medina-Flores, C.A., Mutinelli, F., Patalano, S., Petrov, P., Raudmets, A., Ryzhikov, V.A., Simon-Delso, N., Stevanovic, J., Topolska, G., Uzunov, A., Vejsnaes, F., Williams, A., Zammit-Mangion, M., Soroker, V. (2019). Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *Journal of Apicultural Research* , 58(4), 479–485.
- Gray, A., Adjlane, N., Arab, A., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Cornelissen, B., da Costa, C.A., Dahle, B., Danihlík, J., Dražić, M.M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gajda, A., de Graaf, D., Gregorc, A., Ilieva, I., Johannesen, J., Kauko, L., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Medina-Flores, C.A., Mutinelli, F., Patalano, A., Raudmets, A., San Martin, G., Soroker, V., Stevanovic, J., Uzunov, A., Vejsnaes, F., Williams, A., Zammit-Mangion, M., Brodschneider, R. (2020). Honey bee colony winter loss rates for 35 countries participating in the COLOSS survey for winter 2018–2019, and the effects of a new queen on the risk of colony winter loss. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 744–751.
- Gregorec, A., Sampson, B. (2019). Diagnosis of Varroa Mite (*Varroa destructor*) and Sustainable Control in Honey Bee (*Apis mellifera*) Colonies—A Review. *Diversity*, 11(12), 243.
- Hao, S., Li, J., Liu, X., Yuan, J., Yuan, W., Tian, Y., Xuan, H. (2021). Authentication of acacia honey using fluorescence spectroscopy. *Food Control*, 130, 1-8.
- Harbo, JR. (1986). Effect of population-size on brood production, worker survival and honey gain in colonies of honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 25:22–29
- Hartel, R. W., Ergun, R., Vogel, S. (2011). Phase/State Transitions of confectionery sweeteners: Thermodynamic and kinetic aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 17–32.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Garrido-Bailon, E., Gonzalez-Porto, A.V., Barrios, L., Del Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jimenez, J.J., Garcia-Palencia P., Meana A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10, 2659–2669.
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailon, E., Gonzalez-Porto, AV., Garcia-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M.J., Mayo, R., Bernal, J.L. (2009). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 110-3.
- Higes, M., Martín-Hernández R., Meana A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 41, 375–392.

- Hermosin, I., Chiconv, R.M., Cabezudo, D.M. (2003). Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 83, 263–268.
- El-Seedi, H.R., Ahmed, H.R., El-Wahed, A.A.A., Saeed, A., Algethami, A.F., Attia, N.F., Guo, Z., Musharraf, S.G., Khatib, A., Alsharif, S.M., Naggar, Y.A., Khalifa, S.A.M., Wang, K. (2022). Bee Stressors from an Immunological Perspective and Strategies to Improve Bee Health. *Veterinary sciences*, 9, 199.
- Holt, H.L., Aronstein, K.A., Grozinger, C.M., (2013). Chronic parasitization by *Nosema* microsporidia causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*, 14, 799.
- Hong, I., Woo, S., Choi, Y., Han, S., Kim, N., Kim, H., Han, S., Lee, M., Byeon, K. (2011). Prevalence of *Nosema* and virus in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies on flowering period of Acacia in Korea. *Mycobiology*, 39, 317–320.
- Huidobro, J.F., Sánchez, M.P., Muniategui, S., Sancho, M.T., (2005). Precise method for the measurement of catalase activity in honey. *Journal of AOAC International*, 88(3), 800-804.
- Iglesias, M. T., Martín-Alvarez, P. J., Polo, M. C., Lorenzo, C. D., Pueyo, E. (2006). Protein analysis of honeys by fast protein liquid chromatography: application to differentiate floral and honeydew honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (21), 8322–8327.
- Janeček, Š., Svensson B., Mac Gregor E.A. (2014). α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(7):1149-70.
- Jovanovic, N.M., Glavinic, U., Delic, B., Vejnovic, B., Aleksic, N., Mladjan, V., Stanimirovic, Z. (2021). Plant-based supplement containing B-complex vitamins can improve bee health and increase colony performance. *Preventive Veterinary Medicine*, 190, 105322.
- Jovetić, M., Trifković, J., Stanković, D., Manojlović, D., Milojković-Opsenica, D. (2017). Mineral content as a tool for the assessment of honey authenticity. *Journal of AOAC International*, 100(4), 862–70.
- Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E.H., Psarra, E.P. (2001). Instrumental and sensory analysis of Greek wines; Implementation of principal component analysis (PCA) for classification according to geographical origin. *Food Chemistry*, 73(4), 501-14.
- Karoui, R., Dufour, E., Bosset, J.O., De Baerdemaeker, J. (2007). The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. *Food Chemistry*, 101, 314–323.
- Kasianchuk, V., Berhilevych, O., Negai, I., Dimitrijevič, L., Marenkova, T. (2019). Determination of honey geographic origin according to its elemental composition by the method of x-ray fluorescence. *EUREKA: Life Sciences*, (2), 12-19.
- Kaškonienė, V., Venskutonis, P. R., Ceksterytė, V. (2010a). Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. *Food Science and Technology*, 43(5), 801–807.
- Khalil, M.I., Sulaiman, S.A. (2010). The potential role of honey and its polyphenols in preventing heart diseases: a review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 7(4), 315-321.

- Kiliç, Altun S., Dinç, H., Paksoy, N., Temamoğullari, F.K., Savrunlu, M. (2017). Analyses of Mineral Content and Heavy Metal of Honey Samples from South and East Region of Turkey by Using ICP-MS. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017(8), 1-6.
- Lackowicz, J.R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy, 2nd edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- L'arrivee, J.C.M. (1966). Effets de la noseose sur le rendement en miel. *Canadian Agriculture* 11(13), 24-25.
- Lang, M., Stober, F., Lichtenthaler, H.K. (1991). Fluorescence emission spectra of plant leaves and plant constituents. *Radiation and Environmental Biophysics*, 30, 333–347.
- Laughton, A.M., Boots, M., Siva-Jothy, M.T. (2011). The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, 57, 1023-1032.
- Le Conte, Y., Ellis, M., Ritter, W. (2010). *Varroa* mites and honey bee health: Can *Varroa* explain part of the colony losses?, *Apidologie*, 41, 353–363.
- Lee, D.C., Lee, S.Y., Cha, S.H., Choi, Y.S., Rhee, H.I. (1998). Discrimination of native bee-honey and foreign bee-honey by SDS-PAGE. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 30(1), 1-5.
- Lenhardt, L., Bro, R., Zeković, I., Dramićanin, T., Dramićanin, M. D. (2015). Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey, *Food Chemistry*, 175, 284–291.
- Lourenço, A.P., Guidugli-Lazzarini, K.R., de Freitas, N.H., Message, D., Bitondi, M.M., Simões, Z.L., Teixeira, É.W. (2021). Immunity and physiological changes in adult honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*: The natural colony environment. *Journal of Insect Physiology*, 131, 104237.
- Louveaux J., Maurizio A., Vorwohl G. (1978). Methods of melissopalynology, *Bee World*, 59, 139-157.
- Margotta, J.W.; Roberts, S.P.; Elekonich, M.M. (2018). Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, 221, 1-12.
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailon, E., Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6331-6338.
- Martín-Hernández, R., Bartolomé, C., Chejanovsky, N., Le Conte, Y., Dalmon, A., Dussaubat, C., García-Palencia, P., Meana, A., Pinto, M.A., Soroker, V., Higes, M. (2018). *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental Microbiology*, 20 (4), 1302-1329.
- Masaquiza, D., Vargas, J., Ortíz, N., Salazar, R., Curbelo, L., Pérez, A., Arenal, A. (2021). Hygienic Behavior of *Apis mellifera* and Its Relationship with *Varroa destructor* Infestation and Honey Production in the Central Highlands of Ecuador, *Insects*, 12(11), 966.
- Mato, I., Huidobro, J.F., Simal-Lozano, J., Sancho, M.T. (2003). Significance of nonaromatic organic acids in honey. *Journal of food protection*, 66(12), 2371-6.
- Mato, I., Huidobro, J., Simal-Lozano, J. (2006a). Review: Analytical methods for the determination of organic acids in honey. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36, 3-11.

- Mato, I., Huidobro, J.F., Simal-Lozano, J., Sancho, M.T. (2006b). Rapid Determination of Nonaromatic Organic Acids in Honey by Capillary Zone Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1541-1550.
- Mayack, C., Natsopoulou, M.E., McMahon, D.P. (2015). *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honey bees. *Insect Molecular Biology*, 24, 662-670.
- Meixner, M.D.; Le Conte, Y. (2016). A current perspective on honey bee health. *Apidologie*, 47, 273-275.
- Merken, H. M., Beecher, G.R. (2000). Measurements of Food Flavonoids by High Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3).
- Michener, C. D. (2000). *The Bees of the World*. Johns Hopkins University Press. crp. 19-25.
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., Pettis, J.S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One*, 5:e9754.
- Nabhan, G.R, Buchmann, S.L. (1997). "Services provided by pollinators", in: G.C. Daily, ed., *Nature's Services* (Island Press, Washington, DC) 133-150 (Chapter 8)
- Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., Nagashima, T. (2009). Alpha-amylase from persimmon honey: purification and characterization. *International Journal of Food Properties*, 12, 512-521.
- Nalda, M.J.N., Yague, J.L.B., Calva, J.C.D., Gomez, M.T.M. (2005). Classifying honeys from the Soria Province of Spain via multivariate analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 311-319.
- Nazarian, H., Taghavizad, R., Majd, A. (2010). Origin of honey proteins and method for its quality control. *Pakistan Journal of Botany*, 42, 3221-3228.
- Negri, P., Villalobos, E., Szawarski, N., Damiani, N., Gende, L., Garrido, M., Maggi, M., Quintana, S., Lamattina, L., Eguaras, M. (2019). Towards Precision Nutrition: A Novel Concept Linking Phytochemicals, Immune Response and Honey Bee Health. *Insects*, 10, 401-429.
- Neov, B., Georgieva, A., Shumkova, R., Radoslavov, G., Hristov, P. (2019). Biotic and abiotic factors associated with colonies mortalities of managed honey bee (*Apis mellifera*) *Diversity*, 11 (12) , 237.
- Neumann, P., Carreck, N. L. (2010). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 1-6.
- Nimse, S.B., Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants and their reaction mechanisms. *Royal Society of chemistry*, 5, 27986-28006.
- Ogihara, M.H., Stoic, M., Morimoto, N., Yoshiyama, M., Kimura, K. (2020). A convenient method for detection of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) using roasted soybean flour. *Applied Entomology and Zoology*, 55, 429-433.
- Oliver, R. (2018). Extended-release oxalic acid progress report: 2018 California field trial. *The American Bee Journal*, 729-738.

- Olson, B. J., Markwell J. (2007). *Current Protocols in Pharmacology*, 3(4), 1–29.
- Paris L., El Alaoui H., Delbac F., Diogon M. (2018). Effects of the gut parasite *Nosema ceranae* on honey bee physiology and behavior. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 149-154.
- Pascual-Mate, A., Osés, S. M., Marcazzan, G. L., Gardini, S., Fernandez-Muino, M. A., & Teresa Sancho, M. (2018). Sugar composition and sugar-related parameters of honeys from the northern Iberian Plateau. *Journal of Food Composition and Analysis*, 74, 34-43.
- Peréz, R.A., Iglesias, M.T., Pueyo, E., Gonzáles, M., De Lorenzo, C. (2007). Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 360-365.
- Persano-Oddo, L. (1999). Invertase activity in honey. *Apidologie*, 30, 57-65.
- Persano Oddo, L., Piana, L., Bogdanov, S., Bentabol, A., Gotsiou, P., Kerkivliet, J., Martin, P., Morlot, M., Valbuena Ortiz, A., Ruoff, K., Von der Ohe, K. (2004a). Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie* 35, 82-93.
- Persano Oddo, L., Piro R. (2004b). Main European uni-floral honeys: descriptive sheets, *Apidologie*, 35(1), 38–81.
- Pirk, C.W.W., Strauss, U., Yusuf, A.A., Démares, F., Human, H. (2016). Honeybee health in Africa—a review. *Apidologie*, 47, 276–300.
- Pita-Calvo C., Vázquez M. (2017). Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 79–87.
- Pita-Calvo, C., Vázquez M. (2018). Honeydew Honeys: A Review on the Characterization and Authentication of Botanical and Geographical Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 2523–37.
- Pohl, P. (2009). Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(1), 117-28.
- Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 25, 345–353.
- Porrini, C., Sabatini, A.G., Girotti, S., Ghini, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., Bortolotti, L., Gattavecchia, E., Celli, G. (2003). Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, 38, 63-70.
- Pravilnik o kvalitetu meda i drugih proizvoda pčela, (2015) “Službeni glasnik Republike Srbije”, broj 101/15 od 8. decembra 2015. godine.
- Pravilnik o metodama ispitivanja opasnih svojstava hemikalija, (2013) “Službeni glasnik Republike Srbije”, broj 117/2013 od 30. decembra 2013. godine.
- Pravilniku o utvrđivanju programa mera zdravstvene zaštite životinja, (2017) “Službeni glasnik Republike Srbije”, broj 91/05, 30/10 i 93/12 od 5. maja 2017. godine.
- Ptaszyńska, A. A., Grzegorz, B., Mułenko, W., Olszewski, K.. (2012). Monitoring of nosemosis in the Lublin region and preliminary morphometric studies of *Nosema* spp. spores, *Medycyna Weterynaryjna*, 68 (10), 622-625.

- Ptaszyńska, A. A., Trytek, M., Borsuk, G., Buczek, K., Rybicka-Jasińska, K., Gryko, D. (2018). Porphyrins inactivate *Nosema* spp. microsporidia. *Scientific Reports*, 8, 5523.
- Radakovic, M., Stevanovic, J., Djelic, N., Lakic, N., Knezevic-Vukcevic, J., Vukovic-Gacic, B., Stanimirovic, Z. (2013). Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the Comet assay. *Journal of Biosciences* 38, 53-62.
- Radotić, K., Kalauzi, A., Djikanović, D., Jeremić, M., Leblanc, R. M., Cerović, Z. G. (2006). *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 83, 1–10.
- Ramsey, S.D., Ochoa R., Bauchan G., Gulbranson C., Mowery JD., Cohen A., Lim D., Joklik J., Cicero JM., Ellis JD., Hawthorne D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116, 1792–1801.
- Redmile-Gordon, M. A., Armenise E., White R. P., Hirsch P. R., Goulding K. W. T. (2013). A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 166–173.
- Rodriguez Delgado, M. A., Malovana, S., Perez, J. P., Borges, T., Garcia Montelongo, F. J. (2001). Separation of phenolic compounds by high performance liquid chromatography with absorbance and fluorometric detection. *Journal of Chromatography A*, 912, 249–257.
- Roffet-Salque, M., Regert, M., Evershed, R. P., Outram, A. K., Cramp, L. J., Decavallas, O., Pääkkönen, M. (2015). Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers. *Nature*, 527(7577), 226-30.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 96-119.
- Ruoff, K., Luginbu, W., Keunzli, R., Bogdanov, S., Bosset, J. O., Von Der, K., Von Der Ohe, W., Amado, R. (2006). Authentication of the botanical and geographical origin of honey by front-face fluorescence spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6858–6866.
- Sádecká, J., Tóthová, J. (2007). Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics in the Food Classification – a Review. *Journal of Food Science*, 25, 159–173.
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M. (2017). Chemical Composition of Honey. *Bee Products - Chemical and Biological Properties*, Springer, 43–82.
- Schade, J.E., Marsh, G.L., Eckert, J.E. (1958). Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their usefulness in detecting heat adulteration. *Food Research* 23, 446-463.
- Serra Bonvehi, J., Gomez-Pajuelo, A., Gonell-Galindo, F. (1987). Composition, physicochemical properties and pollen spectrum of various single-flower honeys from Spain. *Alimentaria*, 185, 61-84.
- Silvano, M.F., Varela, M.S., Palacio, M.A., Ruffinengo, S., Yamul, D.K. (2014). Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. *Food Chemistry*, 152C, 500–7.
- Simeunovic, P., Stevanovic J., Cirkovic D., Radojicic S., Lakic N., Stanisic L., Stanimirovic Z. (2014). *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony. *Journal of Apicultural Research*, 53, 545-554.

- Simone-Finstrom, M.D.S.M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41, 295-311.
- Simone-Finstrom, M., Tarry, F.B., Starks, D.R.P.T. (2014). Impact of food availability, pathogen exposure, and genetic diversity on thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Behavioral Medicine*, 27, 527-539.
- Simone, M., Evans, J.D., Spivak, M. (2009). Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution*, 63, 3016-3022.
- Singhal, R.S., Kulkarni, P.R., Rege, D.V. (1997). Handbook of indices of food quality. Elsevier, Cambridge.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *The American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Smith, K.M., Loh, E.H., Rostal, M.K., Zambrana-Torrel, C.M., Mendiola, L., Daszak, P. (2014). Pathogens, Pests, and Economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses. *EcoHealth*, 10, 434–445.
- Snow, J. W., Ceylan Koydemir, H., Karınca, D. K., Liang, K., Tseng, D., Ozcan, A. (2019). Rapid imaging, detection, and quantification of *Nosema ceranae* spores in honey bees using mobile phone-based fluorescence microscopy. *Lab on a Chip*, 19(5), 789–797.
- Stanimirović, Z., Soldatović, B., Vučinić, M. (2000). Biologija pčela - Medonosna pčela.
- Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Jovanovic, S., Andjelkovic, M. (2005). Evaluation of genotoxic effects of Apitol® (cymiazole hydrochloride) in vitro by measurement of sister chromatid exchange. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 588, 152-157.
- Stanimirović, Z., Ćirković, D., Pejin, I., Pejović, D. (2007). Strategija ekološke kontrole u borbi protiv *Varroa destructor*. *Veterinarski Glasnik*, 61 (1-2): 11-35.
- Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Bajic, V., Radovic, I. (2007). Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests in vivo. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628, 1-10.
- Stanimirović, Z., Aleksić, N., Stevanović, J., Ćirković, D., Mirilović, M., Djelić, N., Stojić, V. (2011). The influence of pulverised sugar dusting on the degree of infestation of honey bee colonies with *Varroa destructor*. *Acta Veterinaria*, 61(2), 309-325.
- Stanimirovic, Z., Glavinic, U., Lakic, N., Radovic, D., Ristanic, M., Taric, E., Stevanovic, J. (2017). Efficacy of plant-derived formulation “Argus Ras” in *Varroa destructor* control. *Acta Veterinaria*, 67(2), 191–200.
- Stanimirovic, Z., Glavinic, U., Ristanic, M., Aleksic, N., Jovanovic, N.M., Vejnovic, B., Stevanovic, J. (2019). Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses. *Acta Veterinaria*, 69, 1–31.
- Stanimirovic, Z., Glavinic, U., Jovanovic, N.M., Ristanic, M., Milojković-Opsenica, D., Mutic, J., Stevanovic, J. (2021). Preliminary trials on effects of lithium salts on *Varroa destructor*, honey and wax matrices. *Journal of Apicultural Research*, 3, 375-391.
- Stanković, M., Bartolić, D., Šikoparija, B., Spasojević, D., Mutavdžić, D., Natić, M., Radotić, K. (2019). Variability estimation of the protein and phenol total content in honey using front face

- fluorescence spectroscopy coupled with MCR-ALS analysis. *Journal of Applied Spectroscopy*, 86, 241–248.
- Stanković, M., Nikčević M., Radotić K. (2020). Annual variation of proteins and phenols in honey of a bee society using fluorescence spectroscopy: a way to assess effects of antivarroa treatments on honey composition. *European Food Research and Technology*, 246, 1515–1518.
- Stanković, M., Bartolić, D., Mutavdžić, D. R., Marković, S. B., Grubić, S., Jovanović, N. M., Radotić K. D. (2021). Estimation of honey bee colony infection with *Nosema ceranae* and *Varroa destructor* using fluorescence spectroscopy in combination with differential scanning calorimetry of honey samples. *Journal of apicultural research*, 1-7.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Radakovic, M., Stojic, V. (2008). In vitro evaluation of the clastogenicity of fumagillin. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 49, 594-601.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Genersch, E., Kovacevic, R.S., Ljubenkovic, J., Radakovic, M., Aleksic, N. (2011). Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder. *Apidologie*, 42, 49-58.
- Stevanovic, J., Simeunovic, P., Gajic, B., Lakic, N., Radovic, D., Fries, I., Stanimirovic, Z. (2013). Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies. *Apidologie*, 44, 522-536.
- Stevanovic, J., Schwarz, R.S., Vejnovic, B., Evans, J.D., Irwin, R.E., Glavinic, U., Stanimirovic, Z. (2016). Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: a nine-year survey (2007-2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 139, 6-11.
- Suarez-Luque S. (2002). Rapid determination of minority organic acids in honey by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 955, 207–214.
- Sumner, D.A.; Boriss, H. (2006). Bee-economics and the leap in pollination fees. *Journal of Agricultural and Resource Economics*, 9, 9–11.
- Suwannapong, G., Yemor, T., Boonpakdee, C., Benbow, M. E. (2011). *Nosema ceranae*, a new parasite in Thai honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(2), 236–241.
- Széles, É., Luca, M., Czipa, N., Prokisch, J. (2008). Determination of free amino acids in honey by gas chromatography. *Cereal Research Communications*, 36, 1903-1906.
- Tapasztai, Z., Forgách, P., Kovágó, C., Békési, L., Bakonyi, T., Rusvai, M. (2009). First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Veterinaria Hungarica*, 57, 383–388.
- Taric, E., Glavinic, U., Stevanovic, J., Vejnovic, B., Aleksic, N., Dimitrijevic, V., Stanimirovic, Z. (2019). Occurrence of honey bee (*Apis mellifera* L.) pathogens in commercial and traditional hives. *Journal of Apicultural Research*, 58, 433-443.
- Tigistu, T., Worku, Z., Mohammed, A. (2021). Evaluation of the physicochemical properties of honey produced in Doyogena and Kachabira Districts of Kembata Tambaro zone, Southern Ethiopia. *Heliyon*, 7(4), e06803.
- Trautvetter, S., Koelling-Speer, I., Speer, K. (2009). Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. *Apidologie*, 40(2), 140-150.

- Trifković, J.Đ. (2013). Određivanje kvantitativnog odnosa strukture i retencije arilpiperazina primenom tečne hromatografije i multivarijantnih hemometrijskih metoda. *Doktorska disertacija*, Hemijski fakultet, Beograd.
- Truzzi, C. (2014). Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chemistry*, 150, 477-481.
- Turhan, K. (2009). Innovations in Chemical Biology: Effects of Thermal Treatment and Storage on Hydroxymethylfurfural-HMF Content and Diastase Activity of Honeys Collected from Middle Anatolia in Turkey. *Innovations in Chemical Biology*, 233-239.
- VanEngelsdorp, D., Evans, J.D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B.K., Frazier, M., Frazier, J., Cox-Foster, D., Chen, Y.P. (2009). Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE*, 4, e6481.
- vanEngelsdorp, D., Hayes, J.J., Underwood, R., Pettis, J.S. (2010). A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research*, 49, 7–14.
- Vasić, V.P. (2019). Korelacija fizičko-hemijskih parametara i fitohemijskog profila medljikovaca sa njihovim biljnim poreklom. *Doktorska disertacija*, Hemijski fakultet, Beograd.
- Von der Ohe, W., Persano Oddo, L., Piana, M.L., Morlot, M., Martin, P. (2004). Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 35, 18–25.
- Vejnovic B., Stevanovic J., Schwarz RS., Aleksic N., Mirilovic M., Jovanovic NM., Stanimirovic Z. (2018). Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 151, 76-81.
- Vujčić Zoran, (2002). Eksperimentalna biohemija : praktikum, prvo izdanje, Rantec, Beograd (80-81).
- Wallner, K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30, 235-248.
- Wang, J., Qing, X.L. (2011). Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins, (Chapter 3), In Taylor, S.L. (Ed.). *Advances in Food and Nutrition Research*, 62, 89-137. Amsterdam, Holland: Elsevier. ISBN: 978-0-12-385989-1.
- Weston, R. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, 71, 235-239.
- White, J.W.J., Rudyj, O.N. (1978). The protein content of honey, *Journal of Apicultural Research*, 17, 234-238.
- Wilkins, A.L., Lu, Y., Tan, S.T. (1995). Extractives from New Zealand honeys: 5. Aliphatic dicarboxylic acids in New Zealand rewarewa (*Knigheya excelsa*) honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 3021-3025.
- Wilson-Rich, N., Dres, S.T., Starks, P.T. (2008). The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 2008, 54:1392-1399.
- Won, S. R, Lee, D.G., Seuk Hyun, Ko, S.H., Kim, J.W., Rhee, H.I. (2008). Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, 41, 952–95.

World Organization for Animal Health, (OIE, 2017) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chap. Nosemosis of Honey Bees, <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/3-02-04-nosemosis-final.pdf>

Yao, L., Jiang, Y., Singanusong, R., Datta, N., Raymont, K. (2005). Phenolic acids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, 38(6), 651-658.

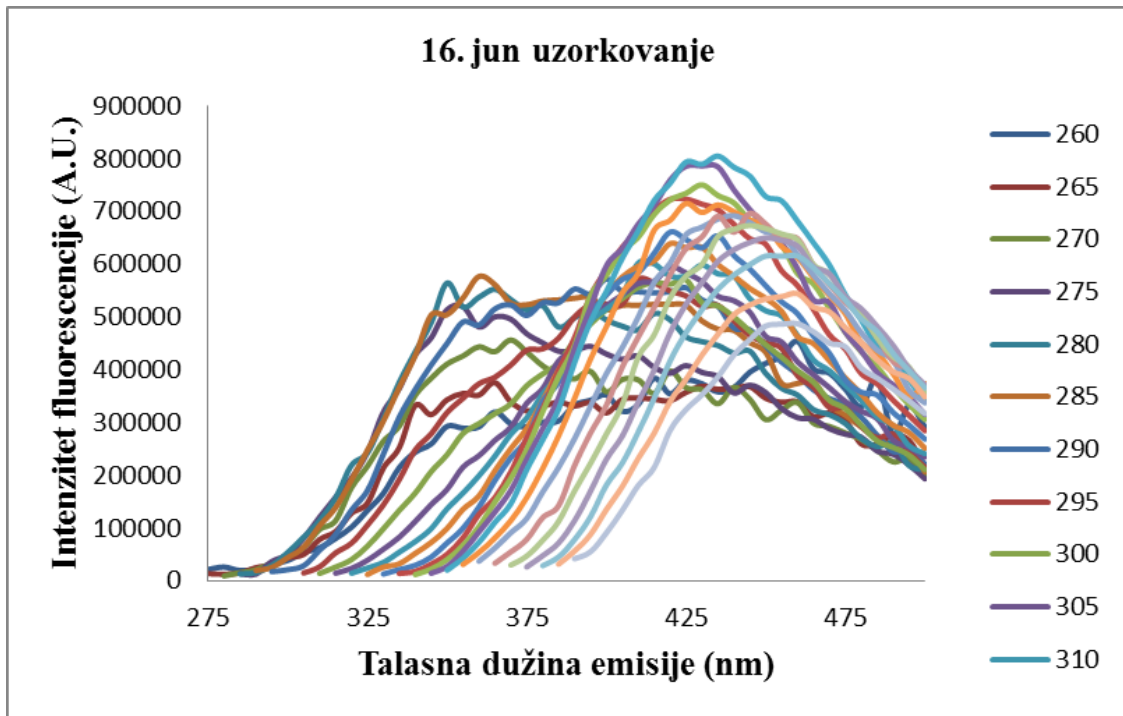
Yucel, Y., Sultanoglu, P. (2013). Characterization of Hatay honeys according to their multi-element analysis using ICP-OES com-bined with chemometrics. *Food Chemistry*, 140, 231–37.

Zamocky, M., Furtmüller, P. G., Obinger, C. (2008). Evolution of Catalases from Bacteria to Humans. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10, 1527–1548.

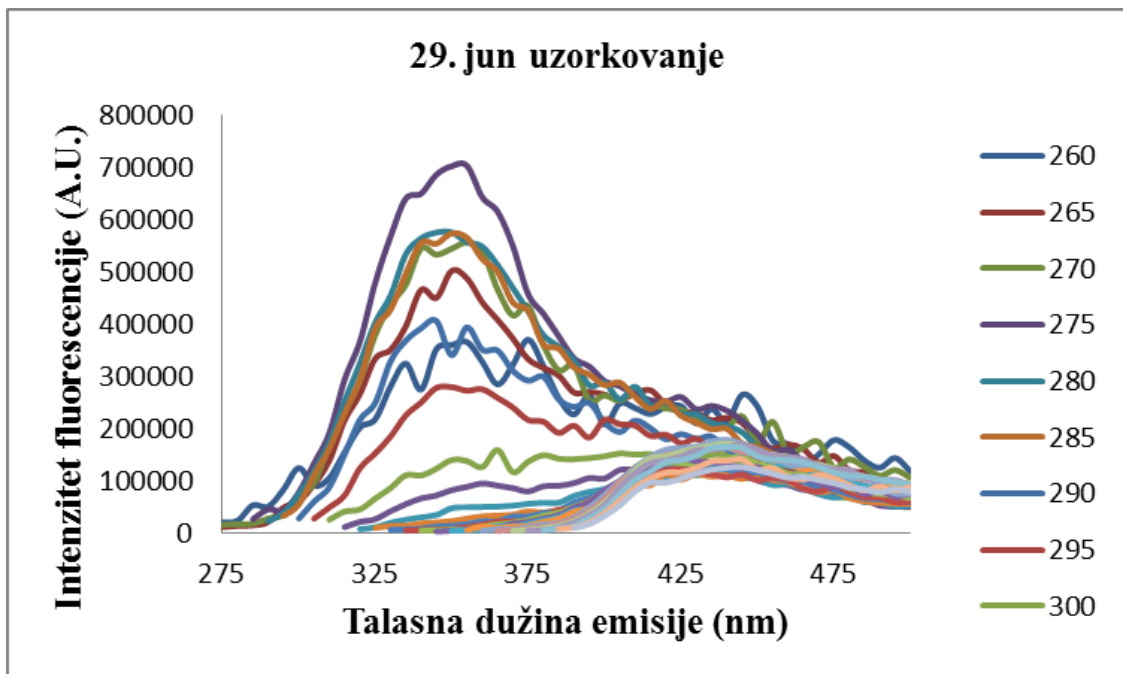
Zander, E. (1909). Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene. *Münchener Bienenzeitung*, 31, 196–204.

Zhao, Y., Heerman, M., Peng, W., Evans, J.D., Rose, R., DeGrandi-Hoffman, G., Simone-Finstrom, M., Li, J., Li, Z., Cook, SC., Su, S., Rodríguez-García, C., Banmeke, O., Hamilton, M., Chen, Y. (2019). The dynamics of deformed wing virus concentration and host defensive gene expression after *Varroa* mite parasitism in honey bees, *Apis mellifera*. *Insects*, 10, 16.

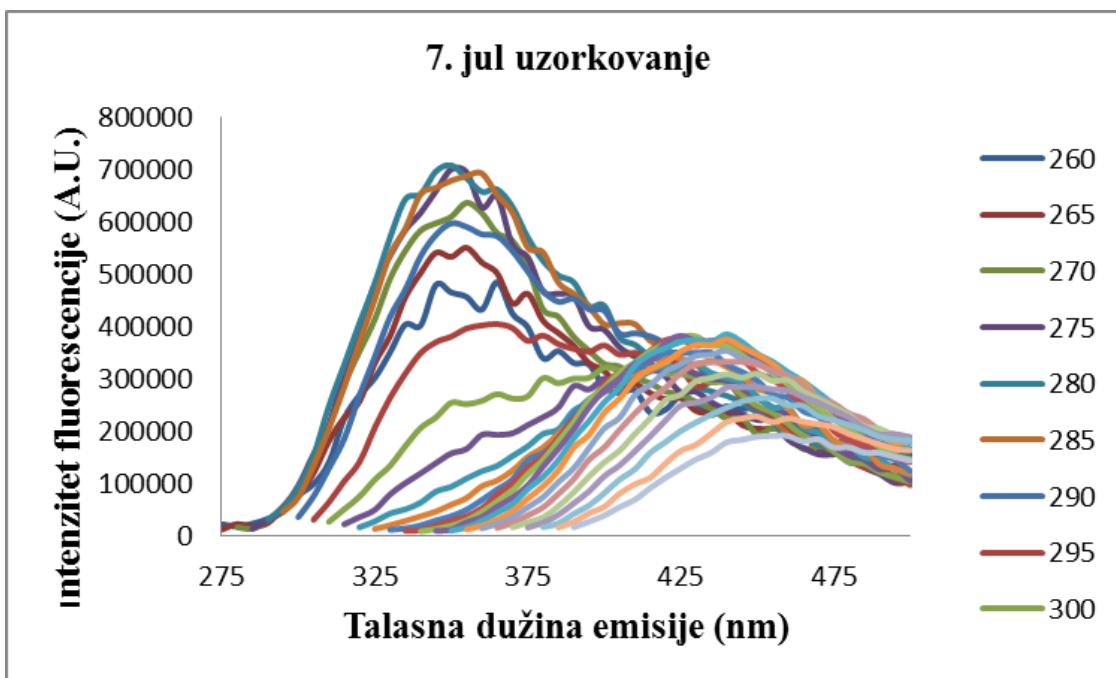
7. PRILOG



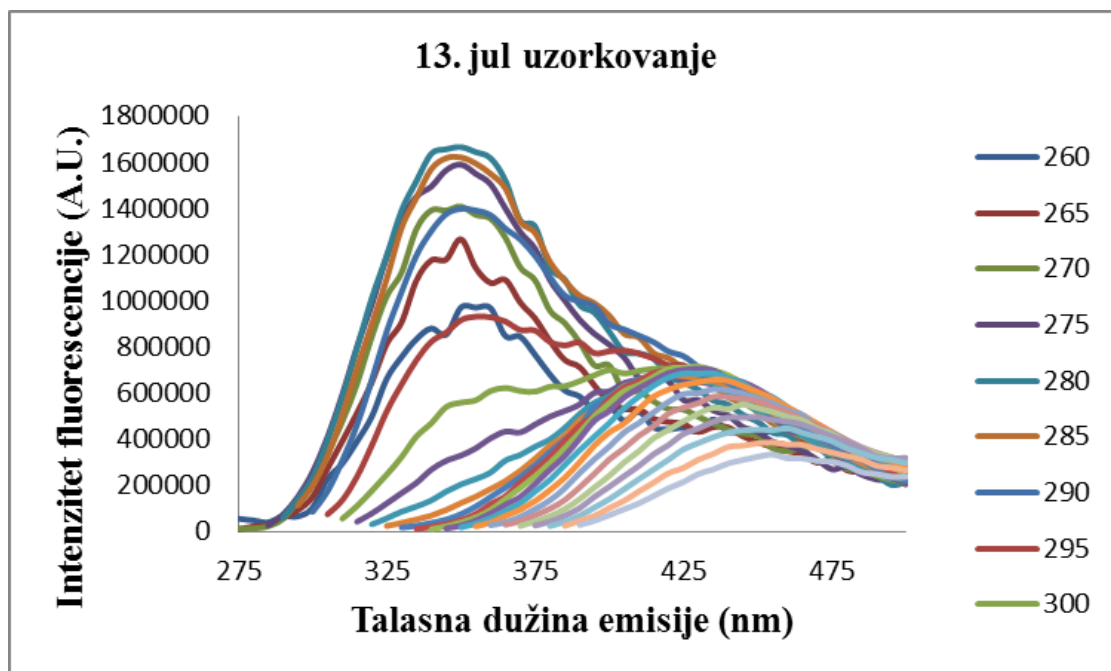
Slika P1. Emisioni spektar meda uzorkovanog 16. juna 2019. godine.



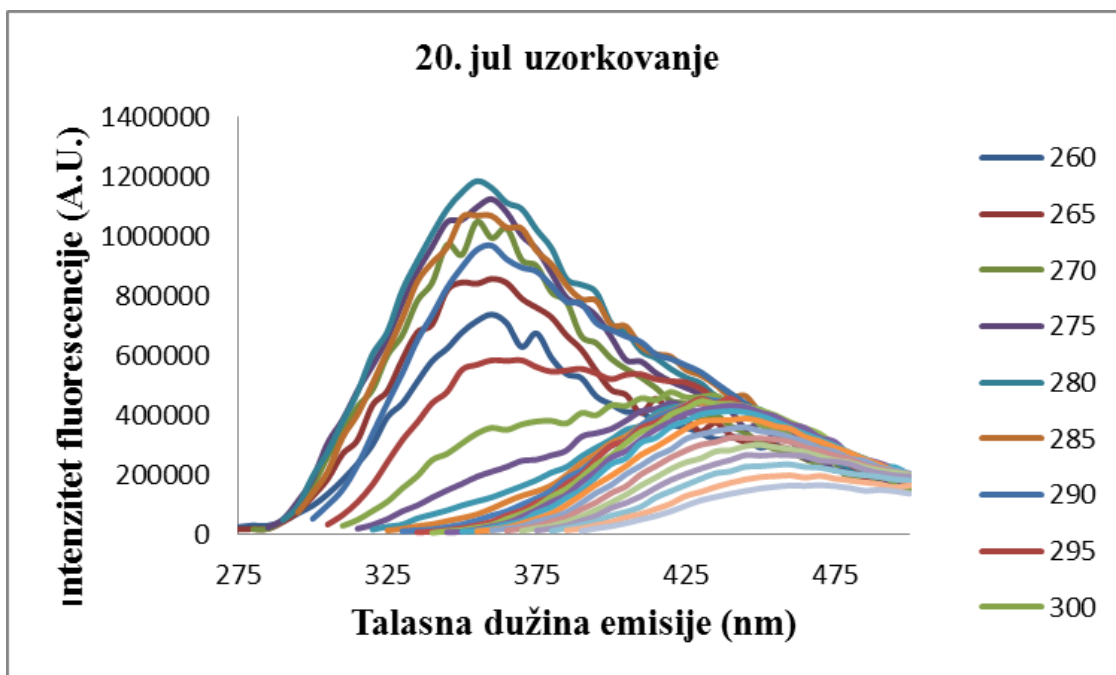
Slika P2. Emisioni spektar meda uzorkovanog 29. juna 2019. godine.



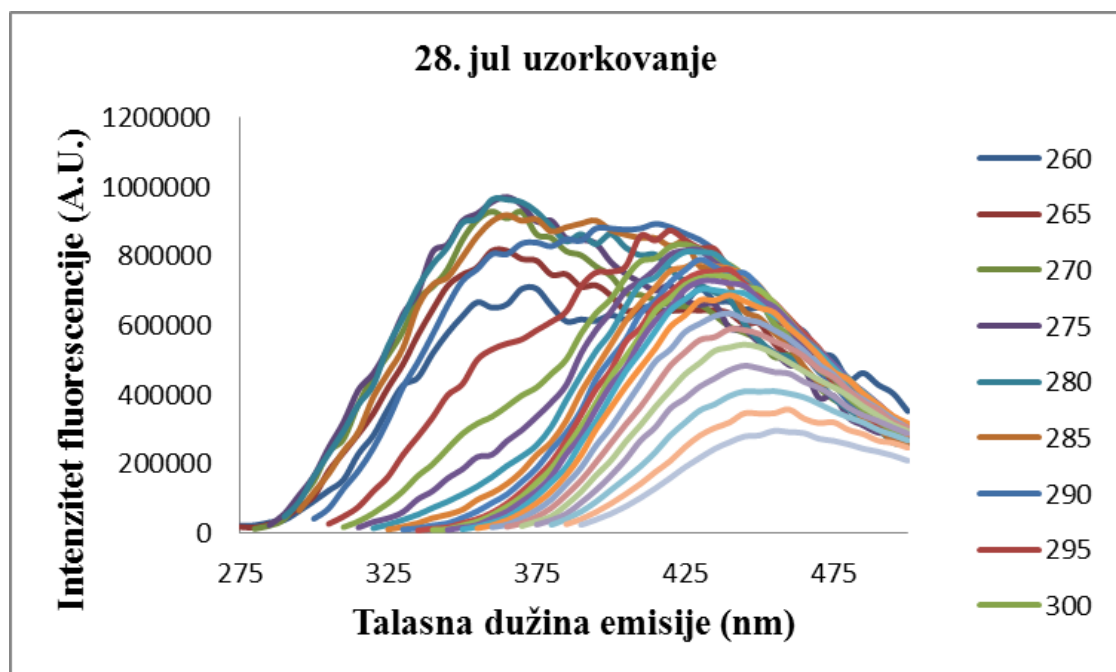
Slika P3. Emisioni spektar meda uzorkovanog 7. jula 2019. godine.



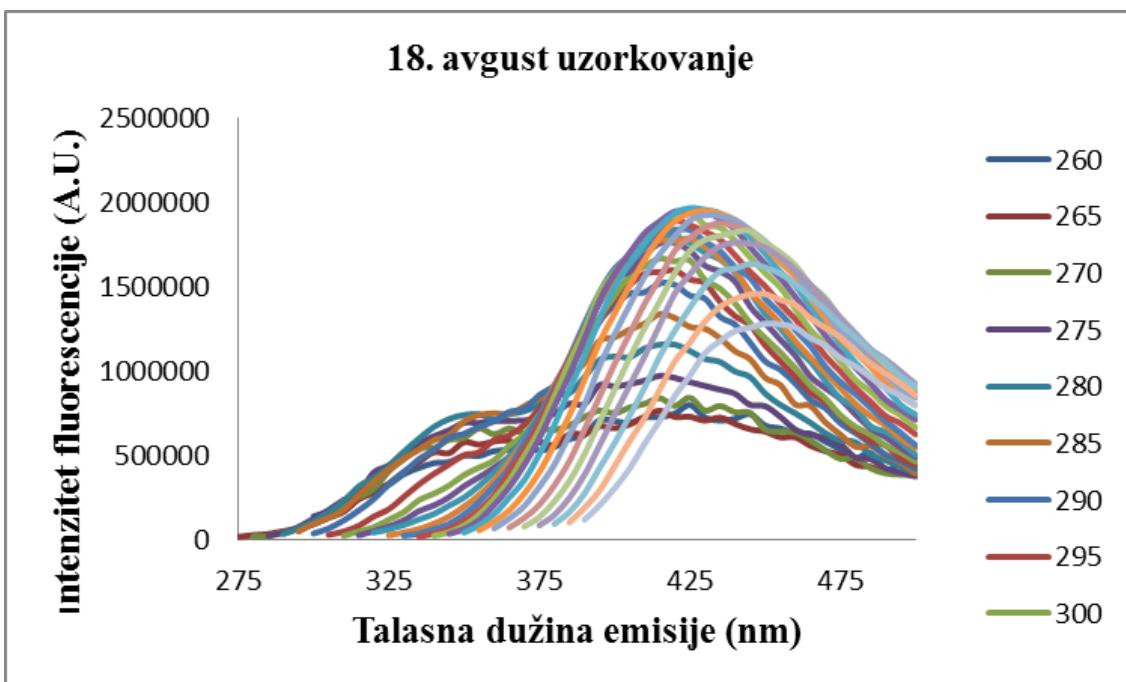
Slika P4. Emisioni spektar meda uzorkovanog 13. jula 2019. godine.



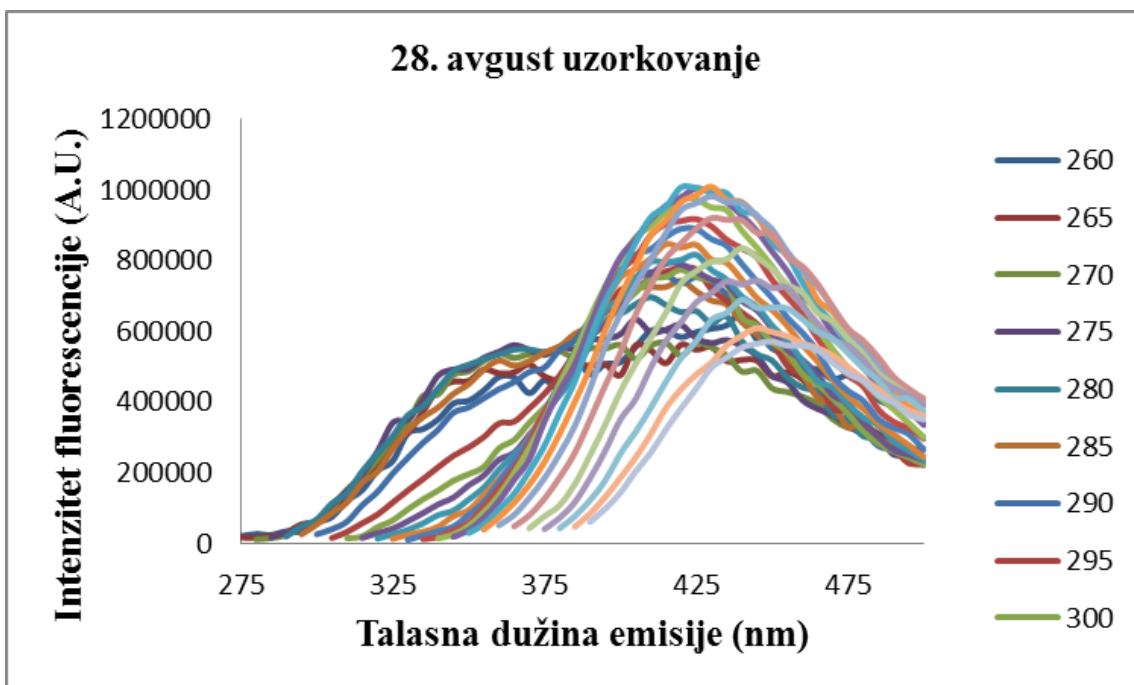
Slika P5. Emisioni spektar meda uzorkovanog 20. jula 2019. godine.



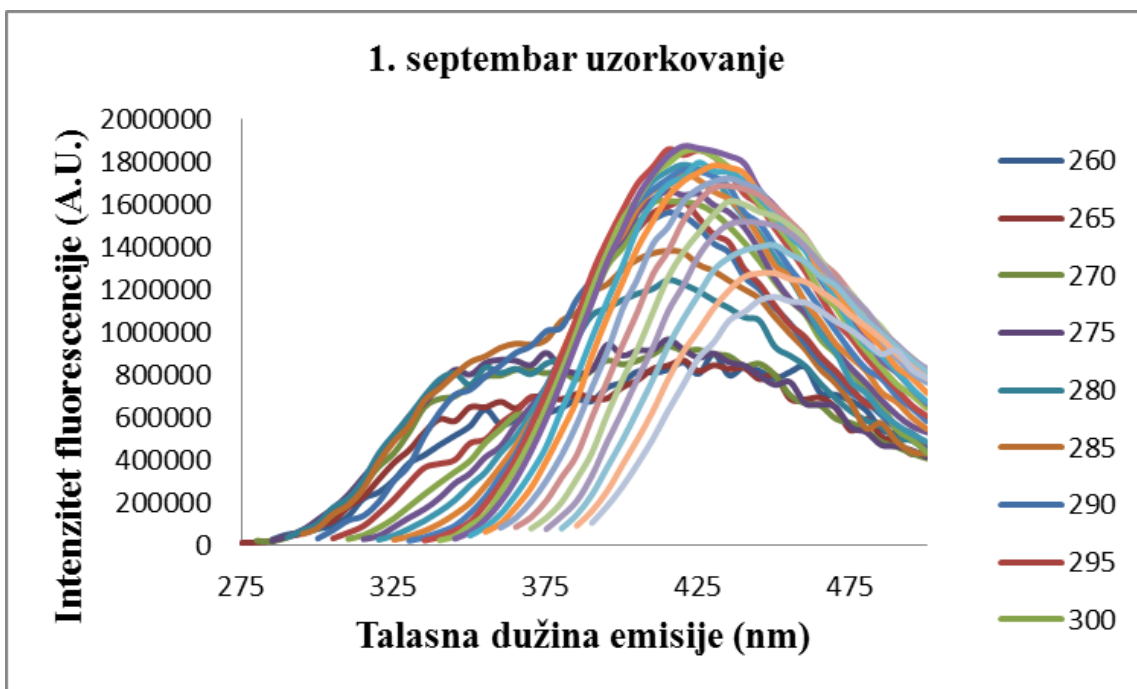
Slika P6. Emisioni spektar meda uzorkovanog 28. jula 2019. godine.



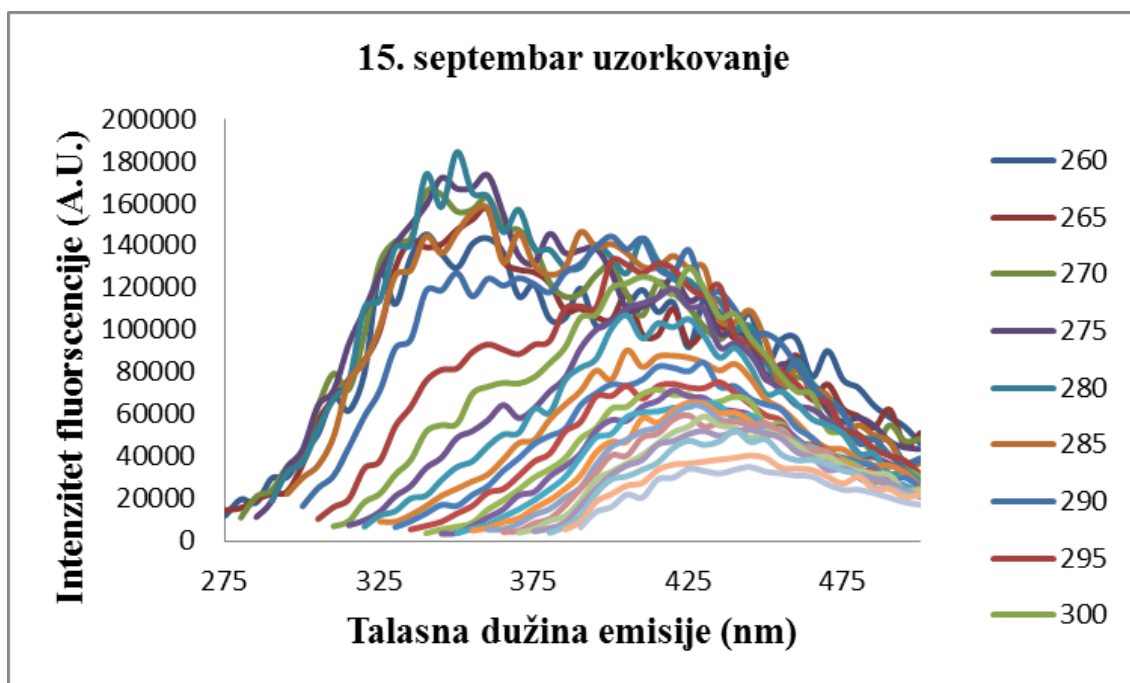
Slika P7. Emisioni spektar meda uzorkovanog 18. avgusta 2019. godine.



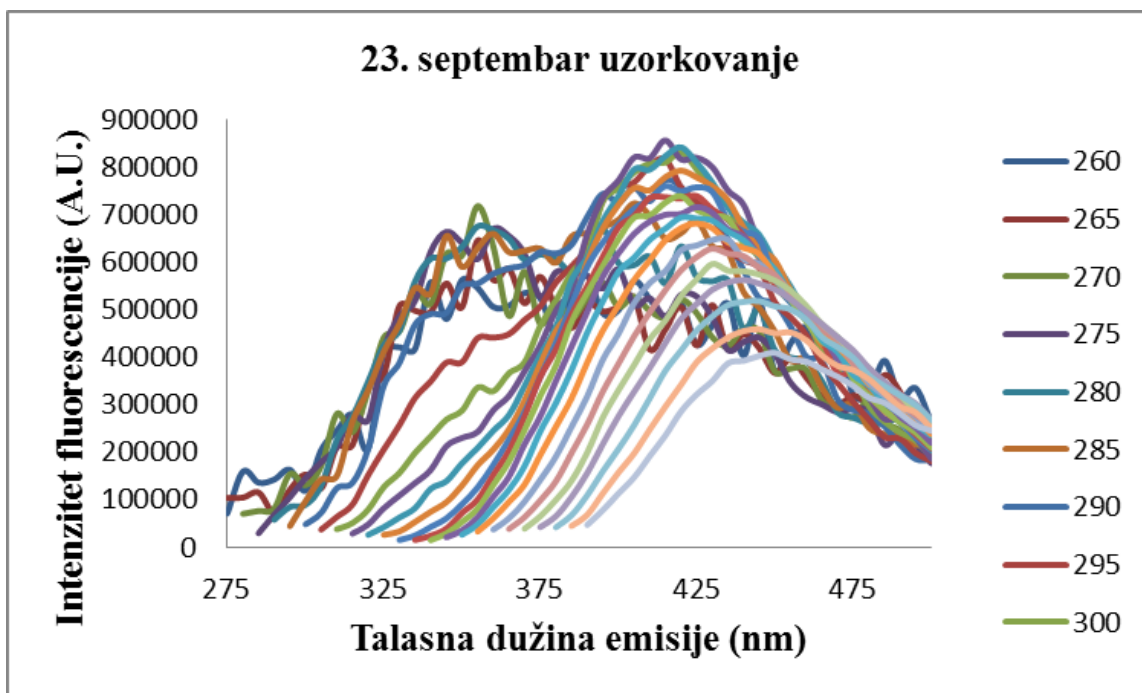
Slika P8. Emisioni spektar meda uzorkovanog 28. avgusta 2019. godine.



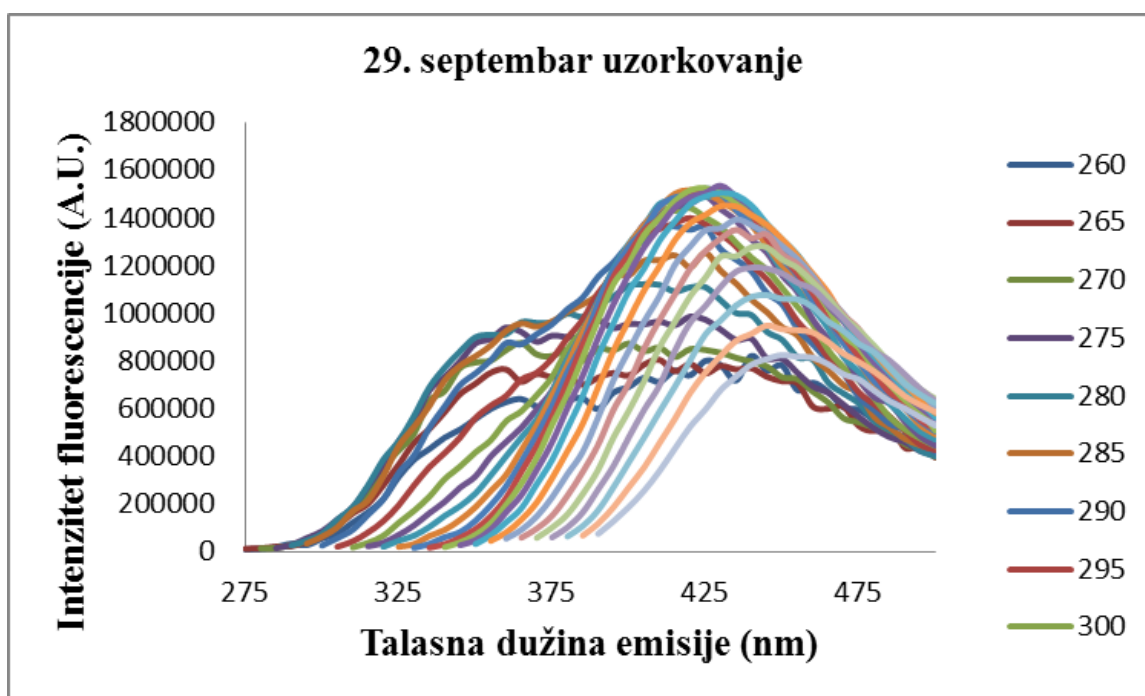
Slika P9. Emisioni spektar meda uzorkovanog 1. septembra 2019. godine.



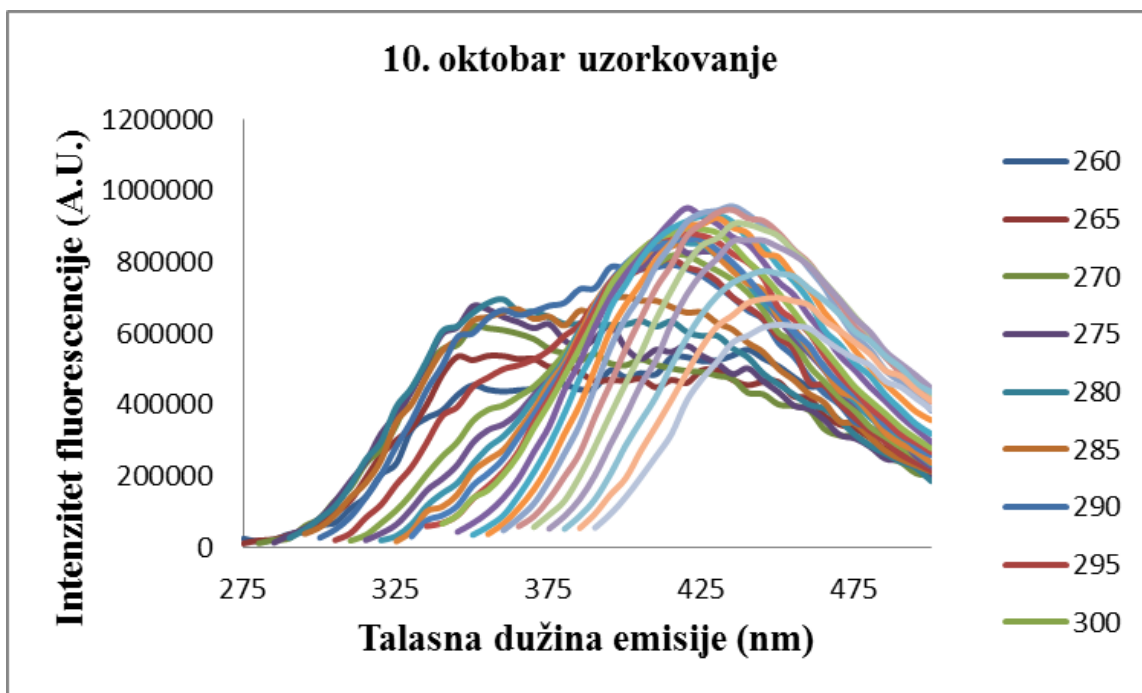
Slika P10. Emisioni spektar meda uzorkovanog 15. septembra 2019. godine.



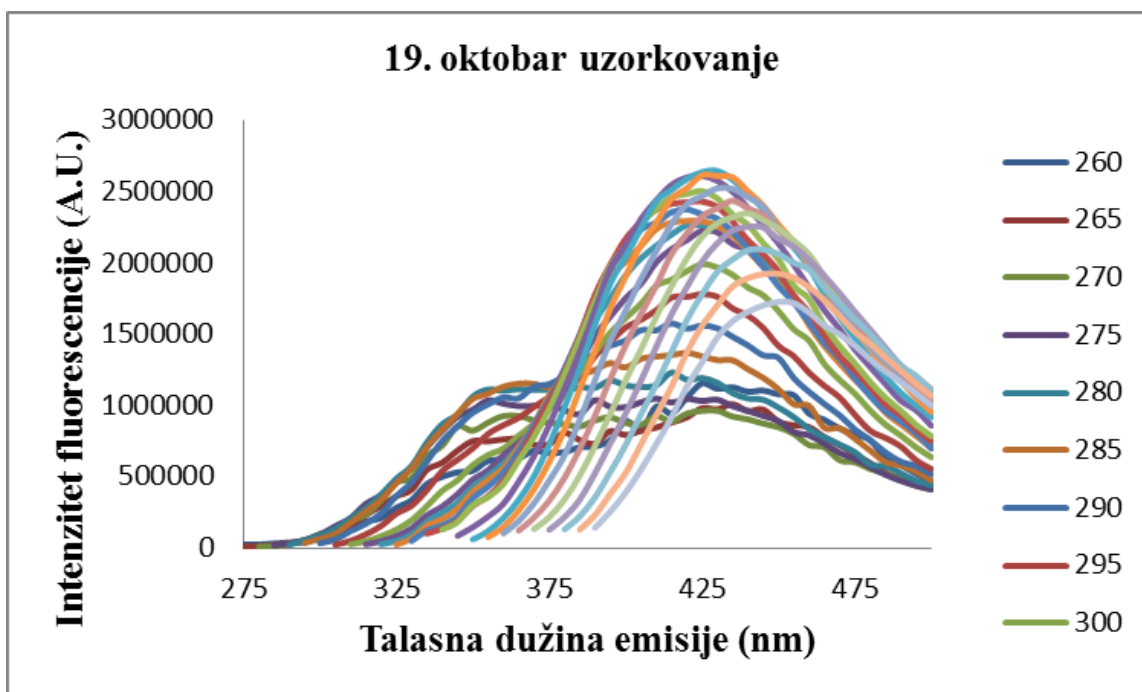
Slika P911. Emisioni spektar meda uzorkovanog 23. septembra 2019. godine.



Slika P12. Emisioni spektar meda uzorkovanog 29. septembra 2019. godine.



Slika P13. Emisioni spektar meda uzorkovanog 10. oktobra 2019. godine.



Slika P14. Emisioni spektar meda uzorkovanog 19. oktobra 2019. godine.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Mira M. Stanković (devojački Mutavdžić) rođena je u Užicu, 11. februara 1983. godine. Osnovnu školu i kasnije Medicinsku školu završila je u Užicu. Osnovne studije na Univerzitetu u Beogradu - Hemijskom fakultetu, smer Diplomiran hemičar završila je 2011. godine. Iste godine upisala je master akademske studije na Katedri za analitičku hemiju, Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta, a završila 2012 sa prosečnom ocenom 9,50 (devet i 50/100) i ocenom 10 na odbrani master rada. Doktorske studije na Katedri za analitičku hemiju, Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta, upisala je 2013. godine i položila sa najvišim ocenama sve ispite koji su predviđeni planom i programom.

Od novembra 2013. godine zaposlena je kao istraživač-pripravnik, a od januara 2018. godine kao istraživač-saradnik u Univerzitetu u Beogradu - Institutu za multidisciplinarna istraživanja na odelu Nauka o živim sistemima (na projektu br. 173017) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom: „Ispitivanja odnosa struktura-funkcija u ćelijskom zidu biljaka i izmene strukture zida enzimskim inženjeringom“ pod rukovodstvom dr Ksenije Radotić Hadžimanić. Kandidatkinja je istraživač Centra za zelene tehnologije, Univerziteta u Beogradu - Instituta za multidisciplinarna istraživanja (centar izuzetnih vrednosti). Učesnik je na projektu (br. 6039613) pod nazivom „Detekcija i kvantifikacija bioaerosola značajnih za zdravlje ljudi i biljaka u realnom vremenu“ Fonda za Nauku Republike Srbije u okviru programa PROMIS (od 2020. godine -). Mira Stanković je do sada objavila devet naučnih radova u međunarodnim časopisima i to jedan rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (kategorija M21a), četiri rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (kategorije M21), tri rada u istaknutim međunarodnim časopisima (kategorije M22) i jedan rad u međunarodnom časopisu (kategorija M23).

OBJAVLJENI RADOVI I SAOPŠTENJA KOJA ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Spisak objavljenih radova i saopštenja koji čine deo disertacije:

M21 - Рад у врхунском међународном часопису

1. **Stankovic Mira**, Bartolic Dragana, Mutavdzic Dragosav, Markovic Smilja, Grubic Sasa, Jovanovic Nemanja, Radotic Ksenija. Estimation of honey bee colony infection with *Nosema ceranae* and *Varroa destructor* using fluorescence spectroscopy in combination with differential scanning calorimetry of honey samples. JOURNAL OF APICULTURAL RESEARCH, (2021), str. 1-7 (M21, IF2020= 2,584; Entomology 22/102) DOI: [10.1080/00218839.2021.1889803](https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1889803)

M22 - Рад у истакнутом међународном часопису

1. **Stankovic Mira**, Nikcevic Miroslav, Radotic Ksenija. Annual variation of proteins and phenols in honey of a bee society using fluorescence spectroscopy: a way to assess effects of antivarroa treatments on honey composition. EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY, (2020), vol. 246, br. 7, str. 1515-1518 (IF2020=2,988; Food Science & Technology 64/144) DOI: [10.1007/s00217-020-03507-x](https://doi.org/10.1007/s00217-020-03507-x)

M23 - Рад у међународном часопису

1. **Stanković Mira**, Bartolić Dragana, Šikoparija Branko, Spasojević Dragica, Mutavdžić Dragosav, Natić Maja, Radotić Ksenija. Variability Estimation of the Protein and Phenol Total Content in Honey Using Front Face Fluorescence Spectroscopy Coupled with MCR-ALS Analysis. JOURNAL OF APPLIED SPECTROSCOPY, (2019), vol. 86 br. 2, str. 256-263 (IF₂₀₁₉= 0,710; Spectroscopy 36/42) DOI: [10.1007/s10812-019-00809-1](https://doi.org/10.1007/s10812-019-00809-1)

M33 - Саопштења са међународних скупова штампана у целости:

1. **Stanković Mira**, Bartolić Dragana, Prokoprijević Miloš, Prodanović Olivera, Đikanović Daniela, Simonović Radosavljević Jasna, Radotić Ksenija. Fluorescence spectroscopy and principal component analysis in the honey samples classification, Proceedings: 27th International Conference: Ecological Truth and Environmental Research - EcoTER'19, Proceedings: 27th International Conference: Ecological Truth and Environmental Research - EcoTER'19, pp. 89 - 92, 978-86-6305-097-6, Bor Lake, Serbia, 18. - 21. Jun, 2019.

M34 - Саопштења са скупа међународног значаја штампана у изводу

1. **Stanković Mira**, Bartolić Dragana, Marković Smilja, Maksimović Vuk, Nikčević Miroslav, Radotić Ksenija. Differentiation of the honey samples based on botanic origin using fluorescence spectroscopy, differential scanning calorimetry and HPLC-PAD. The UNIFood Conference, The UNIFood Conference, pp. BKHP73 - FQSP73, 978-86-7522-060-2, Belgrade, Serbia, 5. - 6. Oct, 2018.
2. **Stanković Mira**, Bartolić Dragana, Šikoparija Branko, Spasojević Dragica, Mutavdžić Dragosav, Natić Maja, Radotić Ksenija. Fluorescence of bio-molecules a simple and quick method: What honey emission speaks about bee society state and honey quality. Šesta međunarodna škola i konferencija fotonike, pp. 21828, Belgrade, Serbia, 28. Avgust - 1. Septembar, 2017.

9. IZJAVA O AUTORSTVU

Ime i prezime autora: Mira M. Stanković

Broj indeksa: DH09/2013.

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Određivanje sadržaja proteina i fenola u uzorcima meda kao indikatora uticaja faktora stresa na pčelinja društva“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini i u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugihlica.

U Beogradu,

Potpis autora

10. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA

Ime i prezime autora: Mira M. Stanković

Broj indeksa: DH09/2013.

Studijski program: Doktor hemijskih nauka

Naslov rada: „Određivanje sadržaja proteina i fenola u uzorcima meda kao indikatora uticaja faktora stresa na pčelinja društva“.

Mentori: dr Maja Natić, redovni profesor Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta i dr Ksenija Radotić Hadži-Manić, naučni savetnik Univerziteta u Beogradu - Instituta za multidisciplinarna istraživanja.

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjenja u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

Potpis autora

11. IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Određivanje sadržaja proteina i fenola u uzorcima meda kao indikatora uticaja faktora stresa na pčelinja društva“, koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje. Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence.

Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CCBY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CCBY-NC)
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CCBY-NC-ND)**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CCBY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CCBY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CCBY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu,

Potpis autora

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.