



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΔΑΣΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«Ανίχνευση προσβολής γόνου των μελισσών (*Apis mellifera*) από
το βακτήριο *Raenibacillus larvae*, με τη χρήση πτητικών
ενώσεων - δεικτών»**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία
Μητρούδη Χριστίνα, Γεωπόνος Α.Π.Θ.

Επιβλέπων: Τανανάκη Χρυσούλα, Λέκτορας Α.Π.Θ.



ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2015

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ, ΔΑΣΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

**«Ανίχνευση προσβολής γόνου των μελισσών (*Apis mellifera*) από το
βακτήριο *Raenibacillus larvae*, με τη χρήση πτητικών ενώσεων -
δεικτών»**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία
Μητρούδη Χριστίνα, Γεωπόνος Α.Π.Θ.

Εξεταστική επιτροπή:

- | | | |
|--|--|---|
| 1. Τανανάκη Χρυσούλα
Λέκτορας Α.Π.Θ | 2. Θρασυβούλου Ανδρέας
Καθηγητής Α.Π.Θ. | 3. Παπαδόπουλος Ηλίας
Αναπληρωτής Καθηγητής Α.Π.Θ. |
|--|--|---|

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ
ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κατά τα έτη 2013-2014. Για την ολοκλήρωσή της απαιτήθηκαν αρκετές ώρες ενασχόλησης με την πειραματική διαδικασία, καθώς και πολλές ώρες μελέτης του αντικειμένου. Παρόλη όμως την ατομική προσπάθεια, τίποτα δεν είχε έρθει εις πέρας χωρίς την υποστήριξη ενός αριθμού ανθρώπων, για τους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες.

Θα ήθελα να ξεκινήσω τις ευχαριστίες μου από τον κ. **Θρασυβούλου Ανδρέα**, καθηγητή του Γεωπονικού Τμήματος της Σχολής Γεωπονίας, Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος και Διευθυντή του εργαστηρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας του ΑΠΘ.. Ευχαριστώ θερμά τον κ. **Θρασυβούλου** για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, από την πρώτη μας συνάντηση, να εκπονήσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο που διευθύνει, δίνοντάς μου την ευκαιρία να μάθω τόσα νέα και ενδιαφέροντα πράγματα για τον τομέα της μελισσοκομίας.

Η ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής θα ήταν αδύνατη χωρίς την πολύτιμη στήριξη της επιβλέπουσας καθηγήτριάς μου, κ. **Τανανάκη Χρυσούλα**, Λέκτορα του Α.Π.Θ. Της εκφράζω ένα βαθύ ευχαριστώ για την άριστη συνεργασία που είχαμε στα πλαίσια της εκπόνησης αυτής της εργασίας, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσε για να μου δώσει σημαντικά στοιχεία και εξηγήσεις πάνω στο θέμα, αλλά και για την προθυμία της και τη βοήθειά της, που δε δίστασε να μου δώσει, τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας όσο και κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Ευχαριστώ τον κ. **Παπαδόπουλο Ηλία**, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Α.Π.Θ., για τη συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή και τις χρήσιμες παρατηρήσεις του στη διόρθωση της διατριβής.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βάθους όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την υποστήριξη και τη βοήθειά τους, καθώς και για το ότι με έκαναν, από την πρώτη στιγμή, να αισθανθώ μέλος της πολύ όμορφης «οικογένειας» που έχουν δημιουργήσει.

Ένα τελευταίο, αλλά πολύ σημαντικό ευχαριστώ, οφείλω στην οικογένεια μου που με στήριξε στη απόφασή μου να συνεχίσω τις σπουδές μου, παρέχοντάς μου τόσο ψυχολογική όσο και οικονομική στήριξη, καθώς και σε όλους εκείνους τους φίλους που μου στάθηκαν όλη αυτή τη χρονική περίοδο.

Μητρούδη Χριστίνα

Θεσσαλονίκη, 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1. Ασθένειες των μελισσών και επιπτώσεις στη μελισσοκομία	10
2. Αμερικάνικη Σηψιγονία (American Foulbrood – AFB)	13
2.1. Παθογένεση	15
2.2. Κλινική διάγνωση (μακροσκοπικά συμπτώματα)	17
2.3. Εργαστηριακή διάγνωση (προσδιορισμός του παθογόνου)	18
2.4. Θεραπεία και προφύλαξη	22
3. Προσδιορισμός πτητικών συστατικών	25
3.1. Περιγραφή της τεχνικής εκχύλισης με διάταξη παγίδευση (Purge & Trap)	25
3.2. Διαχωρισμός πτητικών συστατικών	26
3.3. Ανίχνευση – Ταυτοποίηση	26
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. Σκοπός	28
2. Υλικά και μέθοδοι	28
2.1. Διερεύνηση πτητικών ενώσεων – δεικτών της προσβολής από Αμερικάνικη Σηψιγονία	28
2.1.1. Ανάπτυξη της μεθόδου προκατεργασίας των δειγμάτων	28
2.1.2. Συγκριτική μελέτη πτητικών του υγιούς και προσβεβλημένου γόνου	32
2.1.3. Μελέτη πτητικών ενώσεων – δεικτών σε μέλι συλλεγόμενο από προσβεβλημένο με AFB μελίτσι	34
2.2. Ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των πτητικών ενώσεων – δεικτών	35
2.2.1. Καμπύλες αναφοράς	35

2.2.2. Επικύρωση της μεθόδου	36
2.2.3. Υπολογισμός συγκέντρωσης των ενώσεων – δεικτών στα δείγματα	36
2.3. Εργαστηριακή διερεύνηση των ποσοτικών αλλαγών των πτητικών ενώσεων – δεικτών	37
2.4. Πρακτική εφαρμογή της μεθόδου ανίχνευσης των ενώσεων – δεικτών στο μελισσοκομείο	38
3. Αποτελέσματα – συζήτηση	40
3.1. Διερεύνηση πτητικών ενώσεων – δεικτών της προσβολής από Αμερικάνικη Σηπιγονία	40
3.2. Καμπύλες αναφοράς και επικύρωση μεθόδου	46
3.2.1. Καμπύλες αναφοράς	46
3.2.2. Επικύρωση της μεθόδου	48
3.3. Εργαστηριακή διερεύνηση των ποσοτικών αλλαγών των πτητικών ενώσεων – δεικτών	49
3.4. Πρακτική εφαρμογή της μεθόδου ανίχνευσης των πτητικών ενώσεων – δεικτών	51
3.5. Ανάλυση δειγμάτων μελιού από ασθενή μελίτσια	58
4. Συμπεράσματα	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	70

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Όπως όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, έτσι και οι μέλισσες κατά τη διάρκεια της ζωής τους έρχονται αντιμέτωπες με εχθρούς και ασθένειες που τις προσβάλλουν. Μία από τις σοβαρότερες ασθένειες που χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ανθεκτικότητα στο πέρασμα του χρόνου και μεγάλη μολυσματική ικανότητα, που είναι ικανή να οδηγήσει μία κυψέλη στον πλήρη αφανισμό της, είναι η Αμερικάνικη Σηψιγονία που προκαλείτε από το βακτήριο *Paenibacillus larvae*.

Από το 1906 όπου προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα της ασθένειας, μέχρι και σήμερα, η έρευνα πάνω στον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση του βακτηρίου δεν έχει σταματήσει. Το πιο ιδιαίτερο γνωρίσματα που υποδηλώνει την ύπαρξη της ασθένειας στην κυψέλη, είναι η χαρακτηριστική οσμή που αναδύεται από τον προσβεβλημένο γόνο, ως επακόλουθο της διεργασίας της σήψης. Παρά το ιδιαίτερο αυτό γνώρισμα όμως, όλα αυτά τα χρόνια δεν έγιναν πολλές προσπάθειες για την ανεύρεση και ταυτοποίηση των πτητικών ουσιών που δημιουργούν τη συγκεκριμένη οσμή. Έτσι, σκοπός αυτής της μελέτης έγινε η ανεύρεση των πτητικών ενώσεων – δεικτών που προσδίδουν στον προσβεβλημένο γόνο αυτή τη δυσάρεστη οσμή της σήψης, ώστε μελλοντικά να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της Αμερικάνικης Σηψιγονίας.

Ο προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων – δεικτών, έγινε με τη μέθοδο ανίχνευσης Purge & Trap – GC-MS. Στο πρώτο μέρος της ερευνητικής διαδικασίας αναλύθηκαν δείγματα προσβεβλημένου και μη προσβεβλημένου γόνου και οι ενώσεις που εντοπίστηκαν μόνο στον προσβεβλημένο γόνο και θεωρήθηκαν υπαίτιες για την οσμή ήταν: το Δισουλφίδιο του Διμεθυλίου, το Τρισουλφίδιο του Διμεθυλίου και η 2-ενδεκανόνη.

Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς με πρότυπες ενώσεις προκειμένου να πραγματοποιηθεί ποσοτικοποίηση των ενώσεων – δεικτών που εντοπίστηκαν στην πρώτη φάση της έρευνας. Προκειμένου να διερευνηθεί η χρήση των ενώσεων – δεικτών για την ανίχνευση της ασθένειας σε επίπεδο μελισσοκομείου, πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση κυψελών με προσβεβλημένο γόνο. Από την ημέρα της επιμόλυνσης, λαμβάνονταν δείγματα ανά διαστήματα μια εβδομάδας, μέχρι το σημείο όπου τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της ασθένειας ήταν ιδιαίτερα έντονα. Όλα τα δείγματα του συλλεγόμενου γόνου αναλύθηκαν με τη μέθοδο Purge & Trap –

GC-MS, ενώ η ποσοτικοποίηση των ενώσεων δεικτών πραγματοποιήθηκε με βάση τις καμπύλες αναφοράς που κατασκευάστηκαν στην προηγούμενη φάση. Από την ανάλυση των δειγμάτων προέκυψε ότι η συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων – δεικτών αυξάνεται όσο εξελίσσεται η ασθένεια.

Τελευταίο στάδιο στη μελέτη των πτητικών ενώσεων – δεικτών που αναδύονται από τη δράση του βακτηρίου *Paenibacillus larvae* ήταν να ερευνησουμε αν αυτές οι ενώσεις μπορούν να βρεθούν και στο μέλι μίας προσβεβλημένης κυψέλης. Για το λόγο αυτό, αναλύθηκαν δείγματα μελιού από κυψέλες με εμφανή συμπτώματα Αμερικάνικης Σηψιγονίας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πτητικές ενώσεις – δείκτες που χαρακτηρίζουν την οσμή του προσβεβλημένου γόνου, ανιχνεύονται και στο μέλι της κυψέλης που νοσεί.

ABSTRACT

Like all living organisms, the bees are confronted, during their life, with pests and diseases that affect them. One of the most serious diseases characterized by excellent resistance and high infectious capacity that can destroy the whole bee hive, is the American Foulbrood caused by the bacterium *Paenibacillus larvae*.

Since 1906, when for the first time the phenotypic features of the disease were defined, up to date, the research on the determination and identification of the bacterium is consecutive. The most distinctive feature showing the existence of the disease in the hive is the characteristic smell that emerges from the affected brood, as a consequence of the putrefaction. However, not many studies have been done over the years on the volatile substances which create that odor. The aim of this study was the research of the volatile compounds that give the affected brood this unpleasant odor, so that in future they could be used for the detection of the American Foulbrood.

The determination of volatile compounds – markers was performed using the Purge & Trap – GC-MS system. In the first part of this research, infected and unaffected brood samples were analyzed. The compounds that were found only in the affected brood and held to be responsible for the odor were: dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide and 2-undecanone.

For the quantitative determination of the volatile markers, calibration curves were constructed. To investigate the use of the markers in a detection of the disease at an apiary, hives contaminated with infected bee brood. Then brood samples were taken from the hives at intervals of one week, to the point where the phenotypic characteristics of the disease were particularly intense. All the collected samples were analyzed using Purge & Trap – GC-MS system, and the quantification of the volatile markers was done using the calibration curves produced in the previous step. The analysis of the samples shows that the concentration of volatile compounds increases as the disease progresses.

The last step of this study was to investigate whether the volatile compounds emerging from the action of the bacterium *Paenibacillus larvae* can be found in honey of an infected hive. Therefore, honey samples from hive with symptoms of American Foulbrood were analyzed. The results showed that the volatile compounds – markers characterizing the odor of the infected brood were also detected in the honey of the diseased hive.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ασθένειες των μελισσών και επιπτώσεις στη μελισσοκομία

Οι μέλισσες, εκτός από την παραγωγή μελιού και των λοιπών μελισσοκομικών προϊόντων, διαδραματίζουν ένα πολύ ζωτικό ρόλο στο περιβάλλον με τη συμβολή τους στην επικονίαση τόσο των αυτοφυών, όσο και των καλλιεργήσιμων φυτών, και όπως όλα τα άλλα έντομα και ζώα, έτσι και οι μέλισσες υπόκεινται σε πολλές ασθένειες και παράσιτα (FAO, 2006). Η καλά οργανωμένη κοινωνία των μελισσών με το ένστικτο καθαρισμού που έχει, την συνεχή ανανέωση του πληθυσμού της και με τις ιδιομορφίες των μικροβιοκτόνων ουσιών των προϊόντων που παράγουν, βοηθούν το μέλισσι να αντισταθεί, μέχρι ένα ποσοστό, σε όλους τους κινδύνους που το περιβάλλουν. Για να διατηρηθεί όμως υγιής ο πληθυσμός των μελισσών και να μπορέσουν να συνεισφέρουν, με τις βασικές και πολύτιμες δραστηριότητες τους, χρειάζονται και τους σωστούς μελισσοκομικούς χειρισμούς (FAO, 2006).

Για να διατηρηθεί ένας υγιής πληθυσμός, βασική αρχή είναι η γνώση των εχθρών και ασθενειών που προσβάλουν τις μέλισσες. Συνοπτικά, οι κυριότερες ασθένειες και εχθροί των μελισσών είναι (Shimanuki, 1983; FAO, 2006):

- i. Ασθένειες που προσβάλουν το γόνο
 1. Αμερικάνικη Σηψιγονία – Βακτήριο *Paenibacillus larvae*
 2. Ευρωπαϊκή Σηψιγονία – Βακτήριο *Melissococcus pluton*
 3. Ασκοσφαίρωση – Μύκητας *Ascosphaera apis*
 4. Σακκόμορφη Σηψιγονία – Ιός
- ii. Ασθένειες που προσβάλουν τις ακμαίες μέλισσες
 1. Βαρρόα – Άκαρι *Varroa jacobsoni*
 2. Τραχειακή ακαρίαση – Άκαρι *Acarapis woodi*
 3. Νοσεμίαση – Πρωτόζωο *Nosema apis*
 4. Σηψαιμία – Βακτήριο *Pseudomonas apiseptica*
 5. Χρόνια παράλυση – Ιός

iii. Εχθροί

1. Έντομα

A) Κηρόσκωρος – Λεπιδόπτερα *Galleria mellonella* & *Achroia grisella*

B) Αχερόντεια – Λεπιδόπτερο *Acherontia atropos*

Γ) Σφήκες

Δ) Μυρμήγκια

E) Μελισσόψειρα – Δίπτερο *Braula cocea*

2. Πουλιά

A) Μελισσοφάγος – *Merops apiaster*

B) Χελιδόνια

Γ) Μελισσογερακίνα ή Σφηκοβαρβακίνα – *Pernis apivorus*

3. Θηλαστικά

A) Ποντίκια

B) Αρκούδες

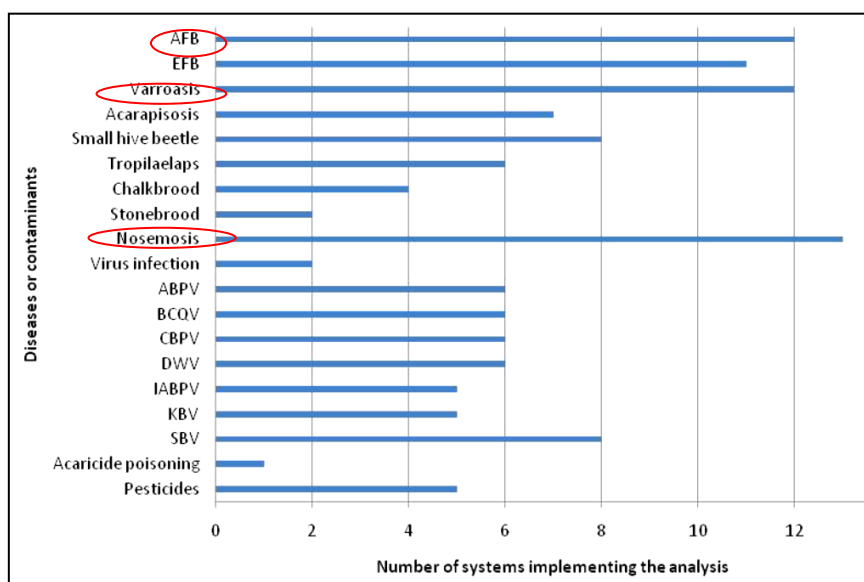
Το κατά πόσο ένα μελίσι θα θεωρηθεί κάποια στιγμή ότι νοσεί, εξαρτάται κάθε φορά από το μέγεθος και τη μορφή της βλαβερής επίδρασης πάνω σ' αυτό και κατά πόσο αυτή προκαλεί οικονομικές επιπτώσεις. Δηλαδή, η απλή και μόνο διαπίστωση ότι το μελίσι έχει μολυνθεί, π.χ. από κάποιο ιό ή βακτήριο, δεν αρκεί για να το χαρακτηρίσουμε ως «άρρωστο». Ο χαρακτηρισμός δικαιολογείται όταν θα έχει προχωρήσει η ασθένεια τόσο, ώστε να επηρεάζεται πλέον αρνητικά η απόδοση του μελισσιού, ή έστω όταν υπάρχουν βάσιμες εκτιμήσεις ότι κάτι τέτοιο θα μπορούσε να συμβεί μέσα στην τρέχουσα παραγωγική περίοδο. Σε μια τέτοια κατάσταση το μελίσι χαρακτηρίζεται πλέον όχι ως μολυσμένο, αλλά ως προσβεβλημένο (Υφαντίδης, 2011).

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (2010) θεωρώντας τη μελισσοκομία έναν σημαντικό κλάδο της ευρωζώνης, τόσο σε επαγγελματικό (μελισσοκόμοι με περισσότερα από 150 μελίσια) όσο και σε ερασιτεχνικό επίπεδο, δημοσίευσε ανακοίνωση της προς το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και το συμβούλιο, για την υγεία των μελισσών.

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση υπάρχουν περίπου 700.000 μελισσοκόμοι, εκ' των οποίων το 97% δεν είναι επαγγελματίες και σε αυτούς αντιστοιχεί περίπου το 67% των μελισσιών στην ΕΕ. Η παραγωγή μελιού εκτιμάται κοντά στους 200.000 τόνους, και αν υπολογίσουμε ότι η μελισσοκομία συνδέεται και με την παραγωγή άλλων προϊόντων (κερί, βασιλικό πολτό, πρόπολη, δηλητήριο και την σημαντική συμβολή

των μελισσών στην επικονίαση) κρίθηκε αναγκαία η δημιουργία κανονισμών για την ορθή μεταχείριση των μελισσών και των προϊόντων που παράγουν (http://ec.europa.eu/food/archive/animal/liveanimals/bees/docs/honeybee_health_communication_el.pdf).

Στα πλαίσια της παραπάνω ανακοίνωσης της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, διεξήχθη και επιστημονική έρευνα από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA – European Food Safety Authority) με θέμα τη θνησιμότητα και την παρακολούθηση των μελισσών στην Ευρώπη (Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe – 2009), όπου έδειξε ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας των μελισσών οφείλονται στις ασθένειες – εχθρούς: Νοσεμίαση, Βαρρόα και Αμερικάνικη Σηφιγονία.



Εικόνα 1. Ποσοτικό διάγραμμα με τις αιτίες θνησιμότητας των μελισσών. (<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/27e.pdf>)

Βάση αυτής της έρευνας, δημιουργήθηκε μία νεότερη κατά τη χρονική περίοδο φθινόπωρο 2012 – καλοκαίρι 2013, μελετώντας τα ποσοστά εμφάνισης των ασθενειών σε κάθε κράτος μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Όσον αφορά την ασθένεια της Αμερικάνικης Σηφιγονίας, τα αποτελέσματα έδειξαν χαμηλά ποσοστά προσβολής σε όλες τις χώρες με υψηλότερο ποσοστό αυτό της Γαλλίας και της Λετονίας (~ 10 %), ενώ το ποσοστό της Ελλάδας έφτανε έως 5% (EpiLovee 2014).

2. Αμερικάνικη Σηψιγονία (American Foulbrood – AFB)

Η Αμερικάνικη Σηψιγονία (Α.Σ.) είναι μία ιδιαίτερα μεταδοτική ασθένεια με παγκόσμιες διαστάσεις που οφείλεται στο βακτήριο *Paenibacillus larvae* (Genersch et al, 2006) και το οποίο προσβάλλει τον γόνο των μελισσών.

Μέχρι το 1906, οι δύο ασθένειες που προκαλούν σήψη του γόνου των μελισσών: Αμερικάνικη και Ευρωπαϊκή Σηψιγονία, δεν είχαν διαφοροποιηθεί και η ασθένεια αποκαλούνταν με το γενικό όρο «Σήψη Γόνου». Οι ονομασίες Ευρωπαϊκή και Αμερικάνικη δεν οφείλονται στη γεωγραφική κατανομή της ασθένειας, αλλά στην περιοχή που έγινε για πρώτη φορά η επιστημονική έρευνα της κάθε ασθένειας. Το 1906 ο White, χρησιμοποιώντας τα κριτήρια του Koch, απέδειξε ότι το βακτήριο με την ονομασία *Bacillus larvae* ήταν αυτό που προκαλούσε την Αμερικάνικη Σήψη του γόνου. Το 1950, ο Katznelson, παρατήρησε σε κελιά την ύπαρξη λεπιών τα οποία ήταν στεγνά και χρώματος καφέ, αλλά είχαν μία εμφάνιση πούδρας, κάτι που τα διαφοροποιούσε ελαφρώς από τη μέχρι τότε γνωστή Αμερικάνικη Σηψιγονία. Έτσι, μετά από αναλύσεις που έκανε, έδωσε σε αυτό το βακτήριο το όνομα *Bacillus pulvifaciens*.

Το 1993, ο Ash και οι συνεργάτες του αναταξινόμησαν το γένος του βακτηρίου σε *Paenibacillus*. Το όνομα προήλθε από το λατινικό *Paenibacillus* που σημαίνει «σχεδόν βακτήριο» επειδή προέρχεται από αυτό το γένος, αλλά είναι φυλογενετικά διακριτό, όπως ορίζεται από τις αναλύσεις RNA (Ash et al., 1993). Τα επόμενα χρόνια αρκετοί ήταν οι ερευνητές που ασχολήθηκαν με την ταυτοποίηση του βακτηρίου και μέσα από τις έρευνές τους ανακατατάξαν το όνομα του βακτηρίου αρκετές φορές. Βασιζόμενος την έρευνα του Ash, αλλά στηριζόμενος στις φαινοτυπικές και γενοτυπικές διαφορές, ο Heyndrickx και οι συνεργάτες του διαχώρισαν το βακτήριο σε δύο υποείδη: *P. larvae subsp. larvae* και *P. larvae subsp. pulvifaciens* (Heyndrickx et al., 1996). Μεταγενέστερες έρευνες με χρήση PCR έδωσε το τελικό αποτέλεσμα θεωρώντας τα δύο υποείδη ως ένα είδος με το όνομα *Paenibacillus larvae* (de Graaf et al., 2006 & Genersch et al., 2006).

Η γεωγραφική καταγωγή της Α.Σ. είναι άγνωστη, αλλά τη συναντάμε σε παγκόσμιο επίπεδο και θεωρείται η πιο μολυσματική ασθένεια του γόνου των μελισσών (Fries and Camazine, 2001). Είναι από τις λίγες ασθένειες των μελισσών που είναι ικανή να εξοντώσει μία αποικία και δημιουργεί μοναδικά προβλήματα στην πρόληψη και τον έλεγχο δεδομένου ότι τα σπόρια του βακτηρίου διατηρούν τη

βλαστικότητα τους για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα – 35 χρόνια ή και περισσότερο και αποτελούν πηγή μόλυνσης (Haseman, 1961). Έχει βρεθεί ότι για να θανατωθούν οι βλαστικές μορφές του βακτηρίου, απαιτούνται 60°C για διάστημα 15 λεπτών (Rose, 1969). Επιβιώνουν στην κυψέλη, στα μελισσοκομικά εργαλεία και στο περιβάλλον κάτω από αντίξοες συνθήκες δεδομένου ότι είναι ανθεκτικά στην ξήρανση, τη θέρμανση, τα χημικά και αντιβιοτικά μέσα (Υφαντίδης, 2011).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός για την Υγεία των Ζώων – World Organization for Animal Health (καθιερωμένο ακρωνύμιο OIE – Office International des Epizooties που ήταν η ονομασία του από το 1924 έως το 2003 οπότε και μετονομάστηκε) έχει εντάξει την Αμερικάνικη Σηψιγονία την λίστα ασθενειών του. Η λίστα αυτή περιλαμβάνει ασθένειες οι οποίες ορίζονται ως εύκολα μεταδιδόμενες και οι οποίες θεωρούνται κοινωνικοοικονομικές ή/και σημαντικές για τη δημόσια υγεία μεταξύ των κρατών και θεωρούνται ότι είναι σημαντικές για το διεθνές εμπόριο των ζώων και των προϊόντων που παράγονται από τα ζώα αυτά. (<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014/>).

Η Αμερικάνικη Σηψιγονία μπορεί να εξαπλωθεί εντός του μελισσιού ή από τα γειτονικά μελίσσια μέσω της χρήσης μολυσμένου μελισσοκομικού υλικού ή μετακίνησης μολυσμένου κεριού ή μελιού από το μελισσοκόμο ή/και τις μέλισσες, κατά τη διάρκεια μιας λεηλασίας (Fries et al., 2006).

Το βακτήριο μολύνει τις προνύμφες μέσω της τροφής τους. Στην ουσία η ασθένεια μεταδίδεται από τις καθαρίστριες μέλισσες, οι οποίες στην προσπάθειά τους να απομακρύνουν τις άρρωστες προνύμφες μολύνονται και όταν αργότερα θα αναλάβουν χρέη τροφού ως παραμάνες, θα μεταφέρουν το μόλυσμα στην τροφή των προνυμφών (Shimanuki, 1980 & 1983). Οι σπόροι βλαστάνουν στο στομάχι του εξελισσόμενου εντόμου, μετακινούνται στη σωματική κοιλότητα, πολλαπλασιάζονται και σπορογονούν. Προνύμφες μεγαλύτερες από τρεις ημέρες προσβάλλονται δυσκολότερα δεδομένου ότι μεγάλος αριθμός σπόρων του βακτηρίου, απομακρύνονται από το σώμα των προνυμφών με τα περιττώματά τους (Θρασυβούλου, 2012).

Δεδομένου ότι τα προσβεβλημένα μελίσσια είναι συνήθως αδύναμα και λεηλατούνται ευκολότερα, η ασθένεια μεταφέρεται σε γειτονικά υγιή μελίσσια. Παρόμοια, παράγοντες που εξασθενούν το μελίσι, όπως είναι η απώλεια συλλεκτριών μελισσών λόγω φυτοφαρμάκων, η μη παραγωγική βασίλισσα και η διακοπή νεκταροέκκρισης, ευνοούν την εξάπλωση της ασθένειας. Επίσης, μετάδοση

της ασθένειας μπορεί να γίνει από τις παραπλανημένες μέλισσες, με την αγοραπωλησία προσβεβλημένων μελισσιών, με το μέλι και με τη σμηνοουργία. Τέλος, σημαντικό κομμάτι στην μετάδοση της ασθένειας, αποτελούν οι μελισσοκομικοί χειρισμοί (μολυσμένα εργαλεία, ανταλλαγή πλαισίων, συνενώσεις κυψελών, τοποθέτηση μελισσιών σε μολυσμένες κυψέλες, τροφοδοσίες) (Matheson A., 1992).

2.1. Παθογένεση

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι οργανισμοί με μικροσκοπικό μέγεθος που στερούνται την ύπαρξη οργανωμένου πυρήνα και ανήκουν στο βασίλειο των Προκαρυωτικών. Η ταξινόμηση των βακτηρίων έχει υποστεί σημαντική αναθεώρηση κατά το διάστημα των δύο τελευταίων δεκαετιών. Η βασική μονάδα της βακτηριακής ταξινόμησης είναι το είδος, το οποίο μπορεί να οριστεί ως μια ομάδα στελεχών που έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά και ακολουθεί το υποείδος που αποτελεί μικρότερη ομάδα της ταξινόμησης των ειδών (Alipri, 1999).

Τα σπόρια αντιπροσωπεύουν τη μολυσματική μορφή της νόσου. Οι προνύμφες μολύνονται με την κατανάλωση σπορίων που υπάρχουν στα τρόφιμα τους. Σύμφωνα με τον Woodrow (1942), εκατομμύρια σπόρια χρειάζονται για να μολύνουν μία προνύμφη μεγαλύτερη των 2 ημερών, αλλά προνύμφες κάτω των 24 ωρών μπορούν να μολυνθούν με λιγότερα από 10 σπόρια (Bailey and Lee, 1962; Kai-Kuang Ho and Yue-Wen Chen, 2001). Επίσης, βάση της έρευνας του Sturtevant (1932), προνύμφες μεγαλύτερες των 4 – 5 ημερών μπορεί να θεωρηθούν απολύτως ανθεκτικές αφού για να μολυνθούν απαιτούνται περίπου 10^7 σπόρια (Bailey and Lee, 1962; Kai-Kuang Ho and Yue-Wen Chen, 2001).

Τα σπόρια βλασταίνουν στον αυλό του εντέρου, αλλά οι μαστιγοφόροι ράβδοι τους για να πολλαπλασιαστούν μεταναστεύουν στην περιτροφική μεμβράνη διεισδύοντας στο επιθήλιο του εντέρου. Οι βλαστικοί ράβδοι εισέρχονται στα κύτταρα του εντέρου με φαγοκυττάρωση. Μετά τη λύση του προσβεβλημένου κυττάρου, τα βακτήρια εισέρχονται στην αιματοκήλη του ξενιστή. Οι ράβδοι πολλαπλασιάζονται άφθονα στην αιμόλεμφο, και στη συνέχεια αρχίζουν να σποριώνονται με αποτέλεσμα η προνύμφη να πεθαίνει από συστηματική βακτηριαμία (Davidson, 1973). Όσο και όπου διαρκεί ακόμη η δράση του 10-υδροξυ-2-δεκαενοϊκού οξέος (συστατικό του βασιλικού πολτού με αντιβακτηριδιακές

ιδιότητες – Bachanová et al, 2002), οι πρώτες βλαστικές μορφές του βακτηρίου καταστρέφονται (Υφαντίδης, 2011).

Βλάστηση των σπορίων συμβαίνει σε ένα pH περίπου 6,6 και μία θερμοκρασία 34° C υπό μικροαερόφιλες συνθήκες (5-10% CO₂ στον αέρα). Βλαστικά κύτταρα είναι σε θέση να πολλαπλασιάζονται στο έντερο της προνύμφης, διότι σε αυτό το στάδιο τα βακτήρια είναι αερόβια και ευκίνητα με αποτέλεσμα να μεταναστεύουν στο επιθήλιο, να διεισδύουν μέσα στην κοιλότητα του σώματος και να πολλαπλασιάζονται στην αιμόλεμφο όπου επικρατούν αερόβιες συνθήκες (Alipri, 1999).

Σύμφωνα τους Bailey & Ball (1991), η βλάστηση των σπορίων είναι βραδύτερη σε μεγαλύτερες προνύμφες από ότι σε νεαρές διότι οι βλαστικοί ράβδοι δεν έχουν το χρόνο να φθάσουν το επιθήλιο και να εισβάλλουν στους ιστούς, προτού εκκενωθούν με τα περιεχόμενα του εντέρου στα κόπρανα. Όταν τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται στους ιστούς προνυμφών πριν τη νύμφωση, οι μολυσμένες προνύμφες πεθαίνουν γρήγορα. Οι προνύμφες 13-14 ημερών περιέχουν σπόρια σε όλους τους ιστούς τους (Alipri, 1999).

Μια υγιής προνύμφη, αφού εκκολαφτεί μετά την τρίτη μέρα από το αυγό, έχει γαλακτερή εμφάνιση και μεγαλώνοντας γεμίζει το βάθος του κελιού. Μετά την έκτη ημέρα τα κελιά σφραγίζονται και οι προνύμφες μεταμορφώνονται σε νύμφες. Οι νύμφες στην αρχή έχουν ασπρουδερό χρωματισμό και με την πάροδο του χρόνου αποκτούν το χαρακτηριστικό χρωματισμό των μελισσών. Ο υγιής καλυμμένος γόνος είναι συμπαγής στην εμφάνισή του και υπάρχουν ελάχιστα άδεια κελιά, ενώ τα καλύμματα του υγιούς γόνου είναι κοίλα και έχουν το φυσιολογικό χρώμα του κεριού και ευχάριστη οσμή (Θρασυβούλου, 2012).

Αντίθετα, μετά την προσβολή του γόνου από Αμερικάνικη Σηψιγονία το σώμα της προνύμφης έρχεται σε ρήξη και τα περιεχόμενα του σώματος της αυξάνουν το ιξώδες τους, με αποτέλεσμα η φυσιολογικά άσπρη προνύμφη να γίνεται σκούρα καφέ και να κατακάθεται στον πυθμένα του κελιού. Ο γόνος είναι διάσπαρτος στην κηρήθρα και τα καλύμματα του γόνου είναι κυρτά και ενίοτε έχουν μικρές τρύπες, ενώ το χρώμα τους δεν είναι φυσιολογικό και δεν έχουν ευχάριστη μυρωδιά. Καθώς ο καιρός περνάει, η νεκρή προνύμφη αποξηραίνεται και σχηματίζει ένα λέπι το οποίο προσκολλάται στη βάση του κελιού (Shimanuki, 1980). Αξιοσημείωτο είναι ότι ένα μόνο λέπι μπορεί να περιέχει περίπου 2500 εκατομμύρια σπόρια του βακτηρίου (Alipri, 1999).



Εικόνα 2. Στάδια μετατροπής της άσπρης προνύμφης σε λέπι, μετά την προσβολή της από Αμερικάνικη Σηψιγονία.

2.2. Κλινική διάγνωση (μακροσκοπικά συμπτώματα)

Τα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας είναι ποικίλα και εξαρτώνται από τον γενότυπο, το στάδιο της νόσου και την ανθεκτικότητα που έχει το κάθε μελίσσι στην Αμερικάνικη Σηψιγονία (Genersch et al, 2005). Επιγραμματικά, τα τυπικά συμπτώματα που μπορεί να προδίδουν την ύπαρξη της ασθένειας είναι (Shimanuki, 1980 & 1983):

1. το χρώμα των κηρήθρων αλλοιώνεται και γίνεται βαθύ καφέ

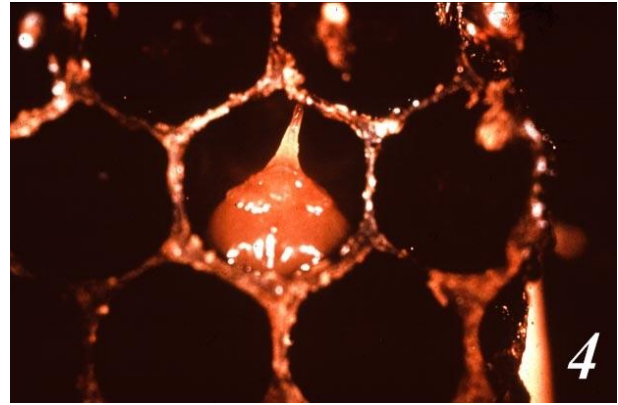
2. ο γόνος είναι διάσπαρτος και τα καλύμματα του σφραγισμένου γόνου βυθίζονται ή δημιουργούν μία μικρή τρύπα



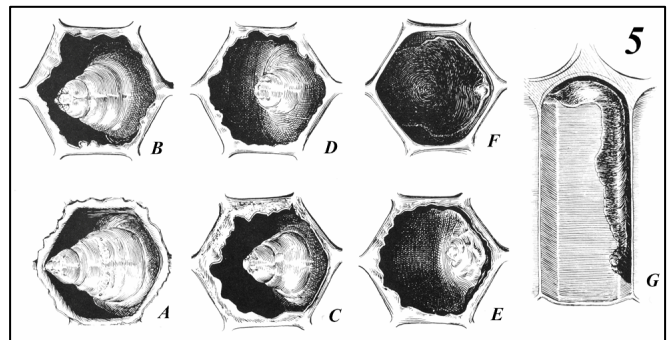
3. στα σφραγισμένα κελιά ο γόνος σαπίζει και αν βυθίσουμε μία οδοντογλυφίδα μέσα στο κελί και την τραβήξουμε προς τα έξω θα δούμε ότι έχει δημιουργηθεί μία σκουρόχρωμη ιξώδης, κολλώδης και ελαστική ίνα που μπορεί να φτάσει σε μήκος έως και 2 – 2,5 cm



4. μερικές νεκρές προνύμφες οι οποίες προσβλήθηκαν σε μεγαλύτερη ηλικία και έχουν σχηματισμένα τα στοματικά τους μέρη, παρουσιάζονται με την προβοσκίδα χαρακτηριστικά προσκολλημένη στην επάνω εσωτερική επιφάνεια του κελιού



5. μετά από καιρό, ο νεκρός γόνος αποξηραίνεται και σχηματίζει ένα λέπι το οποίο είναι προσκολλημένο στα τοιχώματα του κελιού και το οποίο δεν απομακρύνεται εύκολα από τις μέλισσες



6. η μυρωδιά ψαρόκολλας που αναδύεται από τον προσβεβλημένο γόνο.

2.3. Εργαστηριακή διάγνωση (προσδιορισμός του παθογόνου)

Σύμφωνα με τους Shimanuki & Knox – 1991, η σωστή διάγνωση της κάθε ασθένειας των μελισσών εξαρτάται από το δείγμα το οποίο εξετάζεται (Alipri, 1999). Στην περίπτωση που θέλουμε να μελετήσουμε ασθένειες του γόνου, το δείγμα θα πρέπει να είναι περίπου 10 x 10 cm και θα πρέπει να περιέχει όσα περισσότερα κελιά γίνεται, με νεκρές ή αλλοιωμένες ως προς το χρώμα προνύμφες, να μην περιέχει μέλι και τα δείγματα θα πρέπει να στέλνονται για ανάλυση μέσα σε ξύλινο ή χάρτινο κιβώτιο (Shimanuki, 1980). Η σωστή διατήρησή των δειγμάτων γίνεται στην κατάψυξη με αυτά να είναι τυλιγμένα χαλαρά σε χαρτί και όχι μέσα σε πλαστική σακούλα, αλουμινόχαρτο, κερωμένο χαρτί, γυαλί ή επικασσιτερωμένο κουτί, γιατί υλικά σαν και αυτά επιτρέπουν σε μύκητες να αναπτυχθούν με αποτέλεσμα να δυσκολεύεται ή και να καθιστάτε αδύνατη η διάγνωση (Alipri, 1999).

Η προσπάθεια ταυτοποίησης της Αμερικάνικης Σηψιγονίας ξεκίνησε στις αρχές του 1900, αλλά μεγάλη πρόοδος παρουσιάστηκε τα τελευταία 30 χρόνια, δεδομένου ότι είχαμε και την εξέλιξη της τεχνολογίας. Όλα αυτά τα χρόνια οι έρευνες

επικεντρώθηκαν στην κατανόηση του τρόπου εξάπλωσης της ασθένειας και χρησιμοποιήθηκαν διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού και ταυτοποίησης του βακτηρίου.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά καιρούς από τους ερευνητές, μπορούν να διαχωριστούν σε αυτές που χρειάζονται καλλιέργεια του βακτηρίου πριν την εξέταση του δείγματος και σε εκείνες όπου το δείγμα μπορεί να εξεταστεί απευθείας από την κυψέλη. Οι τεχνικές αυτές περιλαμβάνουν μεθόδους μικροβιολογικού χαρακτήρα, αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), αναλύσεις βιοχημικού προφίλ, τεχνικές που βασίζονται στα αντισώματα και εξέταση των δειγμάτων με μικροσκόπιο (OIE, 2014; De Graaf et al, 2013; De Graaf et al, 2006a).

Οι μικροβιολογικές τεχνικές γίνονται με καλλιέργεια δείγματος σε κατάλληλο υπόστρωμα και το δείγμα μπορεί να προέρχεται από γόνο, μέλι, κερι, γύρη ή και ενήλικη μέλισσα. Τα μέσα καλλιέργειας που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς για αυτό το σκοπό είναι:

- PLA – *Paenibacillus larvae* agar (Schuch et al, 2001)
- MYPGP agar – Mueller-Hinton broth, yeast extract, potassium phosphate, glucose and pyruvate (Dingmann & Stahly, 1983)
- BHIT agar – brain–heart infusion medium supplemented with thiamine (Gochnauer, 1973)
- J-agar (Gordon et al., 1973)
- CSA agar – Columbia sheep agar (Hornitzky & Karlovskis 1989)

Οι μοριακές τεχνικές βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR – polymerase chain reaction) και κατά καιρούς έχουν καταγραφεί διάφορα πρωτόκολλα για την ταυτοποίηση του βακτηρίου *Paenibacillus larvae*. Η πρώτη αναφορά για την ταυτοποίηση του *P. larvae* έγινε από τους Govan et al. (1999) και βασίστηκε στο 16S rRNA γονίδιο, ενώ οι Dobbelaere et al. (2001) περιέγραψαν μια παρόμοια εφαρμογή, δημιουργώντας ένα πιο απλουστευμένο πρωτόκολλο. Αρκετές δοκιμές έγιναν για τον καθορισμό των υποειδών του βακτηρίου *P. larvae subsp. larvae* και *P. larvae subsp. pulvifaciens* με βάση αυτή την τεχνική, χωρίς όμως κάποιο ιδιαίτερο αποτέλεσμα (De Graaf et al., 2006a). Ένα επίσης αξιόλογο πρωτόκολλο θεωρείται αυτό των Lauro et al. (2003) το οποίο επιτρέπει την απευθείας

ανάλυση μελιού ή δειγμάτων κυψέλης. Αυτό το τεστ είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στο DNA του *P. larvae* και μπορεί κατά συνέπεια να ταυτοποιήσει το *P. larvae* σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ακόμα και κάτω από εκείνα για τα οποία η νόσος δεν θεωρείται σημαντική.

Το είδος *P. larvae* μπορεί επίσης να ταυτοποιηθεί και με βάση το βιοχημικό του προφίλ το οποίο απαρτίζεται από οξέα, γλυκόζη και τρεχαλόζη, και όχι από οξέα αραβινόζης και ξυλόζης (Gordon et al., 1973). Τα βιοχημικά τεστ που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς, βασίζονται στην υδρόλυση της καζεΐνης του γάλακτος (Shuch et al., 2001). Όταν πρόκειται για εγκαταλειμμένες κηρήθρες, οι οποίες παρουσιάζουν ενδείξεις ότι ο γόνος τους είχε προσβληθεί από κάποια σήψη, για να βεβαιωθούμε ότι πρόκειται για Αμερικάνικη Σηπιγονία, η πιο απλή μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί είναι το τεστ του Holst το οποίο είναι γνωστό από το 1946. Η εξέταση βασίζεται σε πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία παράγει το βακτήριο της Αμερικάνικης Σηπιγονίας. Το λέπι ή τα τρίμματα του άρρωστου γόνου τοποθετούνται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 3-4 ml νερού και στο οποίο έχει διαλυθεί 1% αποβουτυρωμένη σκόνη γάλακτος. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται σε θερμοθάλαμο 37 °C και αν το παθογόνο αίτιο είναι το βακτήριο της Αμερικάνικης Σηπιγονίας το αιώρημα θα γίνει διαυγές σε 10-20 λεπτά, αλλιώς θα παραμείνει θολό (OIE, 2004).



Εικόνα 3. Τεστ του Holst.

Διάφορες τεχνικές, που βασίζονται στα αντισώματα, έχουν αναπτυχθεί για την διάγνωση της Αμερικάνικης Σηπιγονίας. Σε ένα ανοσολογικό τεστ, τα αντισώματα αντιδρούν με το αντιγόνο του βακτηρίου μέσα από μία διπλή διαδικασία διάχυσης, αφήνοντας χαρακτηριστικές γραμμές (precipitin lines) (Peng & Peng, 1979). Σε ένα

τεστ ανοσοφθορισμού (Immunofluorescence) τα αντισώματα συνενώνονται με μία φθορίζουσα χρωστική και τα στελέχη του *Paenibacillus larvae* μπορεί να αναγνωριστούν ως λαμπερά φθορίζοντα βακτήρια σε ένα σκοτεινό φόντο (Otte, 1973). Το 1990 έγινε και χρήση της τεχνικής της ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) από τους Olsen et al. χρησιμοποιώντας ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά με το βακτήριο, ενώ ο πιο πρόσφατος και πιο εύκολος τρόπος ταυτοποίησης της Αμερικάνικης Σηψιγονίας είναι το AFB Diagnostic Test Kit (Vita, Hants, UK). Η μοναδικότητα όλων αυτών των διαγνωστικών μεθόδων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ιδιαιτερότητα των πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων που χρησιμοποιούνται (De Graaf et al., 2006).

Η μικροσκοπική εξέταση του δείγματος είναι η πιο συνηθισμένη τεχνική αναγνώρισης της ασθένειας. Ένα λέπι από νεκρή λάρβα τοποθετείται σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα και σκεπάζεται με μια σταγόνα νερού. Στη συνέχεια τρίβεται, έως ότου σχηματιστεί αιώρημα και μια σταγόνα από νιγκροσίνη (10% υδατικό διάλυμα νιγκροσίνης και 0,5% φορμαλδεΰδη ως συντηρητικό) τοποθετείται στο αιώρημα. Ακολουθεί η τοποθέτησή της καλυπτρίδας επάνω στην υγρή αυτή στρώση και το παρασκεύασμα εξετάζεται στο μικροσκόπιο (Υφαντίδης, 2011).

Όσον αφορά τον προσδιορισμό των πτητικών ουσιών που αναδύονται από ένα προσβεβλημένο μελίσσι με Αμερικάνικη Σηψιγονία, δεν υπάρχουν πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία. Μία προσπάθεια έγινε το 1969 από τον Gochpauer, άλλα λόγω της έλλειψης τεχνολογίας (Χρωματογραφία χάρτου) βρήκε μόνο ότι πρόκειται για κάποιες ενώσεις σουλφιδίου, χωρίς όμως να μπορεί να τις προσδιορίσει ακριβώς. Το 1980 ο Gochpauer πραγματοποίησε αρχικά καλλιέργεια του άρρωστου γόνου και πήρε εκχύλισμα το οποίο στη συνέχεια ανέλυσε εφαρμόζοντας την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας. Προσδιόρισε μετά από μεθυλίωση κάποιες ουσίες με χαρακτηριστική οσμή όπως: βαλερικό, ισοβαλερικό, βουτυρικό, 2-μεθυλοβουτανοϊκό και εξανοϊκό οξύ.

Γενικά, μεγάλη έρευνα στο κομμάτι το πτητικών για τις ασθένειες των μελισσών δεν έχει πραγματοποιηθεί. Το 2003 οι Nazzi et al. με χρήση SPME-GC-MS και με σκοπό την ανακάλυψη των οσμών που προκαλεί το άκαρι *Varroa destructor*, δημιουργώντας τεχνητά κελιά. Σε μία πιο πρόσφατη έρευνα που έγινε με τη μέθοδο GC-EAD (Gas chromatography-electroantennographic detection) για τα πτητικά γόνου που είχε προσβληθεί από το παθογόνο *Ascospheara apis*, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν αυτούσιο γόνου, ποσότητας 25 κελιών, από τα πλαίσια της κυψέλης

και ανίχνευσαν τις πτητικές ενώσεις: οξικός εστέρας της φαινυλοαιθανόλης, 2-φαινυλοαιθανόλη και βενζυλική αλκοόλη (Swanson et al., 2009).

Σχετικά με την πρωιμότητα του εντοπισμού της ασθένειας, στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για πρώιμο εντοπισμό των σπορίων του βακτηρίου σε μία κυψέλη, χωρίς να έχουν παρουσιαστεί τα κλινικά συμπτώματα της ασθένειας, εξετάζοντας δείγματα μελιού και κεριού, ύστερα από καλλιέργεια του βακτηρίου (Ohe, 1997; Ritter, 2003). Στο κομμάτι της έρευνας όμως για τον προσδιορισμό των πτητικών ουσιών ελάχιστη βιβλιογραφία υπάρχει. Όσον αφορά την Αμερικάνικη Σηψιγονία μόνο μια εργασία του Gochpauer υπάρχει κατά την οποία γινόταν χρήση μεγάλης ποσότητας (10 g γόνου), ενώ ο Swanson χρησιμοποίησε αυτούσιο το γόνο από 25 κελιά για τον προσδιορισμό πτητικών συστατικών που οφείλονταν σε προσβολή από Ασκοσφαίρωση.

2.4. Θεραπεία και προφύλαξη

Δεδομένου ότι η Αμερικάνικη Σηψιγονία θεωρείται μία αξιοσημείωτα επικίνδυνα μεταδιδόμενη ασθένεια, οι περισσότερες χώρες έχουν θεσπίσει νόμους που περιλαμβάνουν τους τρόπους αντιμετώπισής της.

Περίπου το 1950 ξεκίνησαν να χρησιμοποιούνται τα πρώτα αντιβιοτικά (oxytetracycline hydrochloride - OTC, sulfathiazole), για την καταπολέμηση της ασθένειας. Ωστόσο, με το πέρασμα των χρόνων διαπιστώθηκαν προβλήματα από τη χρήση τους, όπως το ότι δεν ήταν αποτελεσματικά ενάντια στα μολυσματικά σπόρια με αποτέλεσμα να καταστέλλουν μόνο τα κλινικά συμπτώματα και να καλύπτουν την ασθένεια, χωρίς όμως να την θεραπεύουν. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι τα αντιβιοτικά επηρεάζουν την ζωτικότητα του γόνου και την μακροζωία των μελισσών. Τέλος, βρέθηκε ότι υπολείμματα των χημικών τους ουσιών παραμένουν στο μέλι και επηρεάζουν την ποιότητα του και κατά συνέπεια την υγεία του ανθρώπου. Έτσι, δεδομένου και του ότι τα αντιβιοτικά προκαλούν ανθεκτικότητα με το πέρασμα των εφαρμογών τους, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αρκετό ενδιαφέρον από τους ερευνητές στο να βρουν νέες τεχνικές για την καταπολέμηση της ασθένειας, είτε γενετικά βρίσκοντας ανθεκτικότερες στην ασθένεια μέλισσες, είτε χρησιμοποιώντας ανταγωνιστικά βακτήρια ή κάνοντας χρήση φυσικών αντιβακτηριδιακών ουσιών όπως είναι αιθέρια έλαια φυτών ή πρόπολη (Genersch 2010).

Εάν η αρρώστια εντοπιστεί σε μικρά και αδύνατα μελίσσια, δηλαδή σε μελίσσια μικρότερα από 4 κηρήθρες πληθυσμό, τότε αυτά θανατώνονται το βράδυ, όταν ο πληθυσμός των συλλεκτριών μελισσών επιστρέψει στην κυψέλη. Η είσοδος της κυψέλης κλείνεται και το μελίσσι θανατώνεται με θειάφι το οποίο καίγεται μέσα στην κυψέλη σε ένα μεταλλικό δοχείο. Την επόμενη μέρα το νεκρό μελίσσι απομακρύνεται από τη θέση του, οι κηρήθρες και ο πληθυσμός καίγονται και η κυψέλη απολυμαίνεται προσεκτικά με φλόγιστρο ή καυστική σόδα (Θρασυβούλου, 2012).

Όταν η αρρώστια εντοπιστεί σε μερικά μόνο κελιά και σε περιορισμένο αριθμό κηρηθρών, απομακρύνονται οι προσβεβλημένες κηρήθρες και καταστρέφονται. Το μελίσσι στη συνέχεια τροφοδοτείται με ζαχαροζύμαρο, περιορίζεται ο χώρος του και επιθεωρείται προσεκτικά σε εβδομαδιαία διαστήματα. Εάν η ασθένεια επιμένει και εμφανιστεί σε μεγαλύτερο αριθμό κελιών τότε ο μελισσοκόμος καταφεύγει σε μετάγγιση ολόκληρου του μελισσιού σε καθαρή απολυμασμένη κυψέλη. Σε μετάγγιση θα καταφύγει κατευθείαν ο μελισσοκόμος σε δυνατό μελίσσι (>5 κηρήθρες πληθυσμό μελισσών) όταν η προσβολή εμφανιστεί σε μεγάλο αριθμό κελιών και κηρηθρών (Θρασυβούλου, 2012). Οι μέλισσες από το προσβεβλημένο δυνατό μελίσσι, μεταγγίζονται (τινάζονται) σε καθαρή κυψέλη η οποία έχει προηγουμένως απολυμανθεί με φλόγιστρο ή με καυστική σόδα. Όλες οι κηρήθρες του μελισσιού καίγονται και θάβονται τα υπολείμματα τους (Θρασυβούλου, 2012). Τα πλαίσια με το μέλι μπορούν να τρυγηθούν και το μέλι να υποστεί βρασμό. Τα σπόρια του βακτηρίου είναι αβλαβή για τον άνθρωπο, η τροφοδοσία όμως των μελισσιών με τέτοιο μέλι (βρασμένο) δεν συνίσταται, γιατί ένα ποσοστό των σπορίων του βακτηρίου μπορεί να διατηρήσει ακόμα τη μολυσματικότητα του. Στη νέα κυψέλη, δίνονται στις μέλισσες φύλλα κηρύθρας για να χτίσουν τις κυψέλες τους και τις αφήνουμε νηστικές για τουλάχιστον 48 ώρες έτσι ώστε να καταναλώσουν όλη την ποσότητα της τροφής που έχουν στο στομάχι τους. Με τον τρόπο αυτό μεγάλος αριθμός από τα σπόρια της αρρώστιας θα απομακρυνθεί με τα περιττώματά τους. Τις επόμενες μέρες τα μελίσσια τροφοδοτούνται με άφθονο σιρόπι. Τις πρώτες ημέρες τοποθετείται στο κέντρο της κυψέλης και μία κηρήθρα γόνου από ένα υγιές μελίσσι. Όταν κτιστούν οι πρώτες κηρήθρες και εμφανιστεί ο νέος γόνος η κηρήθρα αυτή απομακρύνεται. Η τροφοδοσία συνεχίζεται μέχρι να κτιστούν όλες οι κηρήθρες για περίπου μία εβδομάδα (Θρασυβούλου, 2012; Γκόρας, 2011).

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, μία από τις αιτίες της διάδοσης της ασθένειας είναι και οι ενέργειες των μελισσοκόμων. Έτσι, για σπάσει ο κύκλος της μετάδοσης της ασθένειας, θα πρέπει να είναι πολύ προσεκτικοί στον κάθε χειρισμό που κάνουν (Θρασυβούλου, 2012; Χαριζάνης, 1996):

1. Να μην ενσωματώνουν σμήνη, άγνωστης προέλευσης μέσα στο μελισσοκομείο και να εξετάζονται προσεκτικά τα μελίσσια πριν συνενωθούν, αγοραστούν ή μετακινηθούν.
2. Να μην ταΐζονται τα μελίσσια με άγνωστης προέλευσης μέλι ή γύρη.
3. Τα μελίσσια θα πρέπει να εξετάζονται τακτικά και να λαμβάνετε υπόψη οποιαδήποτε ανωμαλία παρατηρηθεί στα πλαίσια του γόνου, δεδομένου ότι όσο πιο γρήγορα γίνει αντιληπτή η ασθένεια, τόσο πιο εύκολα μπορούμε να την αντιμετωπίσουμε.
4. Να γίνετε προσεκτικός καθαρισμός και απολύμανση των εργαλείων που χρησιμοποιούνται, ειδικά μετά από χρήση τους σε μελίσσια που νοσούν.
5. Να μην αφήνετε εκτεθειμένο μέλι, γιατί οδηγεί τις μέλισσες σε λεηλασία.
6. Η διάταξη των κυψελών να είναι ακανόνιστη, ώστε να μειωθεί στο ελάχιστο η παραπλάνηση των μελισσών.
7. Τα άρρωστα μελίσσια να μην μεταφέρονται μαζί με τα άλλα στις ανθοφορίες, αλλά να παραμένουν στο μελισσοκομείο και να δέχονται θεραπευτικές επεμβάσεις.

3. Προσδιορισμός πτητικών συστατικών

Διάφορες τεχνικές απόσπασης πτητικών και ημιπτητικών συστατικών έχουν χρησιμοποιηθεί στο πέρασμα του χρόνου, χωρίς όμως καμία από αυτές να θεωρείται ιδανική για όλους τους τύπους δειγμάτων. Σήμερα, για την προκατεργασία του δείγματος που πρόκειται να αναλυθεί με αέριο χρωματογράφο, χρησιμοποιούνται τόσο αυτοματοποιημένες όσο και μη τεχνικές. Αναφορικά, αυτές οι τεχνικές είναι:

- i. Purge & Trap (dynamic headspace) – *Διάταξη παγίδευσης*
- ii. Static headspace – *Υπερκείμενης Φάσης*
- iii. SPE (Solid Phase Extraction) – *Εκχύλιση στερεάς φάσης*
- iv. SPME (Solid Phase Micro-Extraction) – *Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης*
- v. SFE (Supercritical Fluid Extraction) – *Εκχύλιση ρευστών υπερκρίσιμης κατάστασης*
- vi. LLE (Liquid-Liquid Extraction) – *Εκχύλιση υγρού-υγρού*
- vii. DTE (Direct Thermal Extraction) – *Άμεση θερμική εκχύλιση*

3.1. Περιγραφή της τεχνικής εκχύλισης με διάταξη παγίδευσης (Purge & Trap)

Το σύστημα Purge & Trap αποτελεί ένα ενόργανο σύστημα συλλογής και συγκέντρωσης των πτητικών συστατικών, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να αναλυθούν με ένα σύστημα GC ή GC-MS. Στην τεχνική διάταξης παγίδευσης το δείγμα τοποθετείται σε ειδικό γυάλινο υποδοχέα με τη μορφή πυκνού υδατικού διαλύματος και μέσα στο οποίο εμβαπτίζεται η απόληξη εισαγωγής του αερίου εκχύλισης.

Αδρανές αέριο συγκεκριμένης ροής διέρχεται μέσα από το διάλυμα και οι σχηματιζόμενες φυσαλίδες αποσπών τα πτητικά και ημιπτητικά συστατικά τα οποία συγκεντρώνονται στο κατάλληλο προσροφητικό ευθύγραμμης ή σπειροειδούς παγίδας. Κατά το επόμενο στάδιο η θερμοκρασία της παγίδας αυξάνεται με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των συστατικών, τα οποία δια μέσου θερμαινόμενης γραμμής μεταφοράς οδηγούνται στον εισαγωγέα του αερίου χρωματογράφου. Τέλος, η παγίδα θερμαίνεται σε υψηλότερη θερμοκρασία με σύγχρονη διέλευση αερίου προκειμένου το σύστημα να καθαριστεί.

3.2. Διαχωρισμός πτητικών συστατικών

Η αέρια χρωματογραφία (GC) αποτελεί μια ενόργανη τεχνική, κατά την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός ενός μίγματος πτητικών και ημιπτητικών ενώσεων σε συνάρτηση με το χρόνο συγκράτησής τους σε ένα κατάλληλο προσροφητικό μέσο. Μετά την εκχύλιση, τα συστατικά εισέρχονται στο χρωματογράφο και με τη βοήθεια του φέροντος αερίου μεταφέρονται στη στήλη, όπου και προσροφώνται. Η έκλυση τους πραγματοποιείται στη συνέχεια με αύξηση της θερμοκρασίας.

Η βασική της αρχή περιλαμβάνει την εξαέρωση του δείγματος σε θερμαινόμενο εισαγωγέα, τον διαχωρισμό των συστατικών σε κατάλληλη στήλη και τέλος την ανίχνευση του κάθε συστατικού στον ανιχνευτή. Αναλυτικότερα, το δείγμα με τη βοήθεια του φέροντος αερίου μεταφέρεται μέσω του εισαγωγέα στη στήλη, όπου και τα συστατικά του προσροφώνται στη στατική φάση. Η απόσπασή τους από αυτή πραγματοποιείται στη συνέχεια με αύξηση της θερμοκρασίας. Τα λιγότερα δεσμευμένα και τα μικρότερου μοριακού βάρους αποσπώνται και εκλύονται γρηγορότερα, ενώ τα περισσότερα δεσμευμένα και τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους αργότερα. Στη συνέχεια και κατά την εξαγωγή τους από την στήλη, εισέρχονται στον κατάλληλο κατά περίπτωση ανιχνευτή δίνοντας έτσι το ανάλογο σήμα, ώστε τελικά να «οπτικοποιηθεί» με τη μορφή κορυφών ο απαιτούμενος διαχωρισμός.

3.3. Ανίχνευση – Ταυτοποίηση

Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με τη χρήση οργάνων που εκμεταλλεύονται ηλεκτρικές μεταβολές και αποδίδουν την παρουσία της κάθε χημικής ένωσης με τη μορφή κορυφής. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πτητικών στον άρρωστο γόνο ήταν Φασματογράφος Μάζας (M.S.: Mass Spectrometer). Πρόκειται για ένα γενικό ανιχνευτή με τον οποίο τα διαχωριζόμενα συστατικά όχι μόνο ανιχνεύονται, αλλά μπορούν και να ταυτοποιηθούν. Οι εξερχόμενες από τη στήλη ενώσεις εισέρχονται σε θάλαμο ιονισμού, όπου προσκρούμενες με ένα νέφος ηλεκτρονίων, ιονίζονται. Τα θραύσματα που προκύπτουν από τη σύγκρουση εισέρχονται σε μαγνητικό πεδίο που σχηματίζεται από τέσσερις ράβδους χρυσού και λόγω του διαφορετικού λόγου μάζας προς φορτίο, αυτά εκτελούν διαφορετικές τροχιές και εξέρχονται σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, με αποτέλεσμα να λαμβάνεται το φάσμα μάζας για καθεμία από αυτές

τις ενώσεις. Η αποτύπωση των ενώσεων δίνεται με τη μορφή κορυφών και η ταυτοποίηση των φασμάτων γίνεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικών βιβλιοθηκών στις οποίες υπάρχουν αποθηκευμένα τα φάσματα πρότυπων ενώσεων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Το πείραμα είχε ως στόχο της ανάπτυξη μια νέας τεχνικής ανίχνευσης της προσβολής του γόνου των μελισσών από το βακτήριο *Paenibacillus larvae*, μέσω του προσδιορισμού των πτητικών ουσιών που αναδύονται από τον προσβεβλημένο γόνο. Υπάρχουν αρκετές τεχνικές όσον αφορά την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό της Αμερικάνικης Σηψιγονίας, καμία όμως από αυτές δεν κάνει χρήση της πτητικής ιδιαιτερότητας της ασθένειας. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε σκόπιμο η ανάπτυξη και εφαρμογή μίας τέτοιας τεχνικής που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αυτούσια ή και συμπληρωματικά στις ήδη υπάρχουσες, τόσο στην περίπτωση προσδιορισμού ενός προσβεβλημένου δείγματος γόνου, όσο και στην εξέταση δειγμάτων μελιού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Διερεύνηση πτητικών ενώσεων – δεικτών της προσβολής από Αμερικάνικη Σηψιγονία

Η πειραματική διαδικασία της έρευνας ξεκίνησε με δείγματα προσβεβλημένων πλαισίων που είχαν σταλεί από μελισσοκόμους ή που προερχόταν από προσβεβλημένα μελίσσια του εργαστηρίου Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας του Α.Π.Θ.. Εξετάστηκαν δεκατρία δείγματα προσβεβλημένου γόνου και επτά δείγματα υγιούς γόνου.

2.1.1. Ανάπτυξη της μεθόδου προκατεργασίας των δειγμάτων

Για κάθε δείγμα αρχικά προσδιοριζόταν ο βαθμός προσβολής, η ένταση της δυσάρεστης οσμής και πραγματοποιούνταν η επιβεβαίωση του παθογόνου οργανισμού που προκάλεσε τη σήψη, με το AFT Diagnostic Test Kit (Vita). Για τον προσδιορισμό του πτητικό προφίλ κάθε δείγμα αναλύονταν με το σύστημα Purge & Trap – GC-MS.

Για τον προσδιορισμό του βαθμού προσβολής του δείγματος από τα πλαίσια που είχαν Αμερικάνικη Σηψιγονία καταμετρήσαν τουλάχιστον 150 κελία γόνου και σημειώνονταν ο αριθμός των προσβεβλημένων προνυμφών για να βρεθεί ο προσδιορισμός του βαθμού προσβολής (%) με βάση τη σχέση:

$$\text{βαθμός προσβολής} = \frac{\text{ΠΚ}}{\text{ΣΚ}} \times 100$$

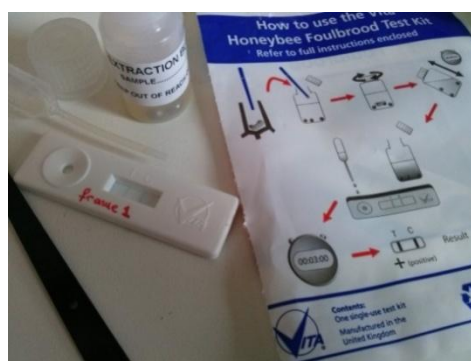
Όπου: ΠΚ= προσβεβλημένα κελιά

ΣΚ = σύνολο κελιών

Για την αποτίμηση της οσμητικής ανίχνευσης της προσβολής χρησιμοποιήθηκε η τεταρτοβάθμια κλίμακα:

έντονη > μέτρια > μέτρια-ελαφριά > ελαφριά

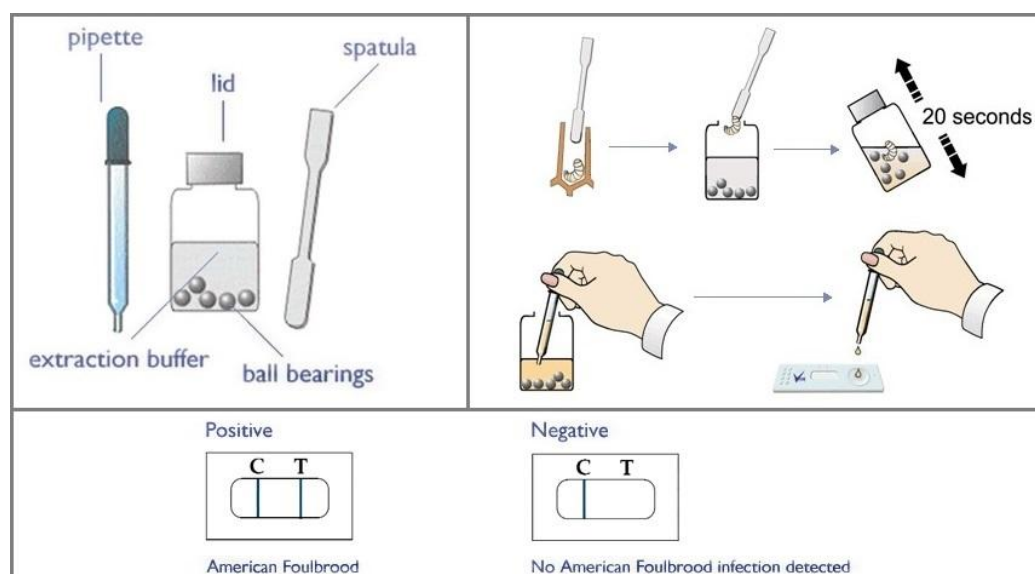
Η επιβεβαίωση του παθογόνου έγινε με το AFB Diagnostic Test Kit (Vita), το οποίο είναι ένα προϊόν ανίχνευσης της Αμερικάνικης Σηψιγονίας. Η τεχνική αυτή, μπορεί να λειτουργήσει σαν διαγνωστικό τεστ για τον έλεγχο ανίχνευσης της Αμερικάνικης Σηψιγονίας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τον μελισσοκόμο ακόμη και στο χώρο του μελισσοκομείου. Έχει δημιουργηθεί για λογαριασμό της εταιρείας Vita, από το τμήμα Foresight Diagnostics του Food and Environment Research Agency (FERA) της Υόρκης, UK, και έχει νομιμοποιηθεί από το National Bee Unit of (FERA), καθώς και άλλα διεθνή ινστιτούτα.



Εικόνα 4. Το περιεχόμενο της συσκευασίας ενός AFB Diagnostic Test Kit (Vita).

Για την δοκιμή ανίχνευσης, η προνύμφη που παρουσιάζει τα συμπτώματα, αφαιρείται από το κελί με τη βοήθεια σπάτουλας και τοποθετείται μέσα σε μπουκαλάκι που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) προκειμένου να γίνει η διαδικασία της εκχύλισης (extraction bottle). Γίνεται ανάδευση του μπουκαλιού για περίπου 20 sec, μέσα στο οποίο περιέχονται μικρά σφαιρίδια για καλύτερη ομογενοποίηση του δείγματος.

Με τη βοήθεια πιπέτας, λαμβάνεται μικρή ποσότητα υγρού και δύο σταγόνες μεταφέρονται στη υποδοχή του τεστ, το οποίο τοποθετείται σε οριζόντια θέση και με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην επιμολυνθεί το παράθυρο αποτελεσμάτων. Σε διάστημα τριών λεπτών, εμφανίζονται οι ενδείξεις - γραμμές δίνοντας το αποτέλεσμα. Αν υπάρχει μόνο μία γραμμή στο σημείο C (control line) το τεστ θεωρείται αρνητικό, αν υπάρχουν δύο γραμμές τόσο στο σημείο C όσο και στο σημείο T (test line) θεωρείται θετικό ως προς την προσβολή του δείγματος από Αμερικάνικη Σηψιγονία (<http://www.vita-europe.com/products/afb-diagnostic-test-kit/>).



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας πραγματοποίησης ενός AFB Diagnostic Test Kit (Vita).

Μετά την εφαρμογή των διαγνωστικών δοκιμών και του προσδιορισμού του βαθμού προσβολής τα δείγματα του προβεβλημένου γόνου, αλλά και τα δείγματα του υγιούς, αναλύονταν με το σύστημα Purge & Trap – GS-MS για τον προσδιορισμό του πτητικού τους προφίλ, χρησιμοποιώντας της ακόλουθη μεθοδολογία.

2.1.1.1. Εκχύλιση (Purge & Trap)

Η εκχύλιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με το σύστημα διάταξης παγίδευσης (Purge & Trap) του οίκου OI Analytical, μοντέλο 4560 (U.S.A.) και με τον αυτόματο δειγματολήπτη του οίκου OI Analytical, μοντέλο 4552 (U.S.A.). Το σύστημα ήταν εφοδιασμένο με γυάλινο φιαλίδιο χωρητικότητας 25ml και θερμαινόμενο υποδοχέα. Η παγίδευση των εκχυλιζόμενων συστατικών πραγματοποιήθηκε σε στήλη Texan 07.

2.1.1.2. Διαχωρισμός – Ανίχνευση – Ταυτοποίηση (GC – MS)

Για το διαχωρισμό των εκχυλιζόμενων συστατικών χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος του οίκου Agilent μοντέλο 6890 (U.S.A.) συνδεδεμένος μέσω θερμοστατούμενης γραμμής μεταφοράς με το σύστημα εκχύλισης. Ο διαχωρισμός των συστατικών πραγματοποιήθηκε σε στήλη HP-5MS (30 x 0,25mm, $d_f=0,25\mu\text{m}$). Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε με φασματογράφο μάζας της ίδιας εταιρίας, μοντέλο 5973. Η επεξεργασία και η ολοκλήρωση των χρωματογραφημάτων έγινε με το πρόγραμμα MSD ChemStation, ενώ η ταυτοποίηση των κορυφών με την ταυτόχρονη χρήση της ηλεκτρονικής βιβλιοθήκης Nist98 και τη χρήση προτύπων στις περιπτώσεις χαρακτηριστικών ενώσεων-δεικτών. Σε όλες τις περιπτώσεις οι ζυγίσεις έγιναν με ζυγό της εταιρείας Kern, μοντέλο 770 (Germany), ενώ οι απαιτούμενες αναδεύσεις πραγματοποιήθηκαν με μηχανικό αναδευτήρα της εταιρείας Heidolph, μοντέλο Reax Control (Germany). Για τους προσδιορισμούς των πτητικών συστατικών χρησιμοποιήθηκε νερό το οποίο αρχικά αποστάχθηκε με συσκευή απόσταξης της εταιρείας Brand μοντέλο Monotest 3000 (Germany) και στη συνέχεια υπέστη περαιτέρω καθαρισμό με τη χρήση της συσκευής παραγωγής υπερκάθαρου νερού της εταιρείας Millipore, μοντέλο Simplicity 185 (France). Η ακριβής μέτρηση μικροόγκων πραγματοποιήθηκε με πιπέττες της εταιρείας Eppendorf (Germany) ρυθμιζόμενου όγκου 10-100 μL και 100-1000 μL . Η παρασκευή των πτητικών διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε σε απαγωγό της εταιρείας Faster, μοντέλο Chemfee S/M (Italy).

Για την εκχύλιση και το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε αέριο He υψηλής καθαρότητας (99,999%) κατάλληλο για αεριοχρωματογραφικούς προσδιορισμούς.



Εικόνα 6. Όργανα μέτρησης πτητικών: Αυτόματος δειγματολήπτης (OI Analytical, 4552), Purge & Trap (OI Analytical, 4560) και GC-MS (Agilent, 6890).

2.1.2. Συγκριτική μελέτη πτητικών του υγιούς και προσβεβλημένου γόνου

Απουσία προηγούμενων δημοσιευμένων στοιχείων μεθοδολογίας για την ανάλυση του προσβεβλημένου γόνου με την τεχνική Purge & Trap – GC-MS. πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές δοκιμές για τον καθορισμό της ποσότητας του προσβεβλημένου γόνου και των συνθηκών χρωματογραφικής ανάλυσης.

Για την προκατεργασία των δειγμάτων, πριν υποστούν ανάλυση, δοκιμάστηκαν οι ακόλουθοι παράμετροι:

- Γόνος (20 προνύμφες)
- Υδατικό διάλυμα γόνου: i) 15 προνύμφες (~0.6 g), ii) 20 προνύμφες (~0.8 g), iii) 25 προνύμφες (~1 g), iv) 30 προνυμφών (1.2 g). Σε όλες τις περιπτώσεις η αραίωση γινόταν με 10 ml υπερκάθαρο νερό.

Οι συνθήκες ανάλυσης έγιναν με θερμοκρασία εισαγωγής 220 °C, η ροή του φέροντος αερίου (He) ήταν 1 ml/min και η ανίχνευση των διαχωρισμένων συστατικών πραγματοποιήθηκε σε φασματογράφο μάζας ο οποίος λειτουργούσε κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες: θερμοκρασία interface 280 °C, θερμοκρασία πηγής ιονισμού 230 °C, θερμοκρασία τετράπολου 150 °C και δυναμικό ιονισμού +70eV. Δοκιμάστηκαν δύο θερμοκρασιακά προγράμματα:

α) 40 °C (διατήρηση για 5 min), με ρυθμό 1 °C/min αύξηση στους 55 °C, με ρυθμό 3 °C/min αύξηση στους 120 °C, με ρυθμό 10 °C/min αύξηση στους 230 °C και με ρυθμό 20 °C/min αύξηση στους 280 °C (διατήρηση για 5 min).

β) 40 °C (διατήρηση για 5 min), με ρυθμό 1 °C/min αύξηση στους 45 °C (διατήρηση για 5 min), με ρυθμό 1 °C/min αύξηση στους 55 °C (διατήρηση για 5 min), με ρυθμό 3 °C/min αύξηση στους 120 °C, με ρυθμό 10 °C/min αύξηση στους 230 °C και με ρυθμό 20 °C/min αύξηση στους 280 °C (διατήρηση για 5 min).

Μετά τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία.

2.1.2.1. Προκατεργασία δείγματος

Δείγμα γόνου από περίπου 25 κελιά, βάρους 1g, λαμβάνονταν από τα προσβεβλημένα πλαίσια τοποθετούταν στα φιαλίδια του δειγματολήπτη και αραιώνονταν με 10 ml υπερκάθαρου νερού.



Εικόνα 7. Παραλαβή προσβεβλημένου γόνου και τοποθέτηση στο φιαλίδιο του δειγματολήπτη.

Ακολουθούσε μηχανική ανάδευση του παραπάνω δείγματος για 30-60 sec. Στο φιαλίδιο προσθέτονταν μεταλλικό σπείραμα για την αποφυγή ενδεχόμενου αφρισμού και μαγνητάκι προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανάδευση κατά την διάρκεια της εκχύλισης και να επιτευχθεί ομοιογενής απόσπαση των πτητικών συστατικών. Το δείγμα μεταφερόταν στο σύστημα Purge & Trap για να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση.

2.1.2.2. Εκχύλιση δείγματος

Η εκχύλιση του δείγματος πραγματοποιήθηκε στο σύστημα διάταξης παγίδευσης, με βάση της κάτωθι συνθήκες:

- i. Προθέρμανση: 40 °C για 2 λεπτά
- ii. Εκχύλιση: 40 °C για 40 λεπτά
- iii. Απομάκρυνση υγρασίας: 2 λεπτά
- iv. Θερμική εκρόφηση: 7 λεπτά
- v. Καθαρισμός παγίδας: 10 λεπτά

2.1.2.3. Αεριοχρωματογραφική ανάλυση

Το προσυγκεντρωμένο στην στήλη Tenax του συστήματος Purge & Trap εκχύλισμα μεταφερόταν με θερμική εκρόφηση στον αέριο χρωματογράφο όπου ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση επιτυγχανόταν με βάση το θερμοκρασιακό πρόγραμμα των συνθηκών ανάλυσης: β (παράγραφος 2.1.2.).

Οι οργανικές πτητικές ενώσεις που αποσπάστηκαν από τον προσβεβλημένο γόνο συγκρίθηκαν με αυτές του υγιούς προκειμένου να εκτοπιστούν οι χαρακτηριστικές ενώσεις που εμφανίζονται μόνο στα δείγματα των προνυμφών με Αμερικάνικη Σηψιγονία.

2.1.3. Μελέτη πτητικών ενώσεων – δεικτών σε μέλι συλλεγόμενο από προσβεβλημένο με AFB μελίσσι

Σε περιπτώσεις πλαισίων με προσβεβλημένο γόνο που περιείχαν μέλι, το προϊόν εξήχθη με στράγγιση και αναλύθηκε με το σύστημα Purge & Trap – GC-MS, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη των ενώσεων – δεικτών που είχαν εντοπιστεί στον προσβεβλημένο γόνο. Το δείγμα μελιού 10g, αραιωμένο με 3g υπερκίθου νερού, τοποθετούταν στα φιαλίδια του δειγματολήπτη του Purge & Trap. Ακολουθούσε μηχανική ανάδευση του παραπάνω διαλύματος για 30-60 sec και έπειτα στο φιαλίδιο προσθέτονταν μαγνητάκι για την ομοιογενή απόσπαση των πτητικών συστατικών, καθώς και μεταλλικό σπείραμα για την αποφυγή ενδεχόμενου αφρισμού (Τανανάκη, 2006).

2.2. Ανάπτυξη μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού των πτητικών ενώσεων – δεικτών

2.2.1. Καμπύλες αναφοράς

Για τις χημικές ενώσεις που βρέθηκαν αποκλειστικά στα δείγματα του προσβεβλημένου γόνου (Δισουλφίδιο του Διμεθυλίου, Τρισουλφίδιο του Διμεθυλίου, 2-ενδεκανόνη) και απουσίαζαν από αυτά των υγιών, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ποσοτική τους αποτίμηση.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- i. Dimethyl disulfide >99% $C_2H_6S_2$
 - ◆ Δισουλφίδιο του διμεθυλίου, από την εταιρεία Merck-Schuchardt-Germany
- ii. Dimethyl trisulfide 98% CH_3SSSCH_3
 - ◆ Τρισουλφίδιο του διμεθυλίου, από την εταιρεία Alfa Aesar-Germany
- iii. 2-undecanone 98% $CH_3(CH_2)_8COCH_3$
 - ◆ 2-ενδεκανόνη, από την εταιρεία Alfa Aesar-Germany
- iv. Acetone >99% CH_3COCH_3
 - ◆ Ακετόνη, από την εταιρεία Merck-Schuchardt-Germany

Για την κατασκευή των καμπυλών αναφορά παρασκευάστηκαν τα διαλύματα παρακαταθήκης των παρακάτω συγκεντρώσεων:

- Dimethyl disulfide: 9.940ppm
- Dimethyl trisulfide: 9.633ppm
- 2-undecanone: 10.5056ppm

Από τα διαλύματα παρακαταθήκης, δημιουργήθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις τα παρακάτω διαλύματα εργασίας ($\mu\text{g}/\text{kg}$), προκειμένου να κατασκευαστούν οι κατάλληλες καμπύλες αναφοράς:

2.5 – 12.5 – 37.5 – 75 – 125 – 250

Από την ανάλυση των δειγμάτων, σημειώθηκαν τα εμβαδά των κορυφών των λαμβανόμενων χρωματογραφημάτων, και με την βοήθεια του προγράμματος Excel

κατασκευάστηκαν οι γραμμικές εξισώσεις της μορφής: $y = a * x + b$, για κάθε ουσία και υπολογίστηκε ο συντελεστή συσχέτισης (R^2).

2.2.2. Επικύρωση της μεθόδου

Για την επικύρωση της μεθόδου προσδιορίστηκε η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου στο επίπεδο των 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ με ανάλυση του ίδιου δείγματος πέντε φορές την ίδια μέρα και σε πέντε διαφορετικές μέρες αντίστοιχα. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν με βάση τις καμπύλες αναφοράς, η ανάκτηση και η σχετική τυπική απόκλιση (RSD).

2.2.3. Υπολογισμός συγκέντρωσης των ενώσεων – δεικτών στα δείγματα

Από τις καμπύλες αναφοράς και με βάση τις εξισώσεις της μορφής: $y = a * x + b$ της κάθε ένωσης, υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων δεικτών στα δείγματα προσβεβλημένου γόνου και μελιού, βάση της σχέσης:

$$C = \frac{x * g \text{ διαλύματος}}{g \text{ δείγματος}} \text{ (ng/g)}$$

Όπου: C = συγκέντρωση

x = η συγκέντρωση του διαλύματος γόνου από την καμπύλη αναφοράς

2.3. Εργαστηριακή διερεύνηση των ποσοτικών αλλαγών των πτητικών ενώσεων – δεικτών

Δύο πλαίσια που έφεραν επιβεβαιωμένα συμπτώματα Αμερικάνικης Σηψιγονίας (οργανοληπτικά, AFB Diagnostic Test Kit (Vita), πτητικές ενώσεις), παρέμειναν για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σκοπός αυτής της δοκιμής ήταν να διερευνηθεί η πιθανή ποσοτική αύξηση των πτητικών ενώσεων – δεικτών, σε αυτό το χρονικό διάστημα.

Τα πλαίσια τοποθετήθηκαν σε κάθετη στάση για αποφυγή της απώλειας δείγματος και για την αποφυγή δημιουργίας μυκήτων από συσσώρευση υγρασίας κατά την επαφή τους με τον πάγκο.



Εικόνα 8. Τοποθέτηση και στήριξη των πλαισίων σε κάθετη θέση, για την παραμονή τους σε συνθήκες περιβάλλοντος για μία εβδομάδα.

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία παραλαβής δείγματος και ανάλυσης τους με Purge & Trap – GC-MS. Η σύγκριση έγινε βάση των συγκεντρώσεων (C) που έδωσε η κάθε ένωση και υπολογίστηκε το ποσοστό της αύξησης τους, με βάση τη σχέση:

$$\text{αύξηση} = \frac{\text{τελικό} - \text{αρχικό}}{\text{αρχικό}} \times 100$$

2.4. Πρακτική εφαρμογή της μεθόδου ανίχνευσης των ενώσεων – δεικτών στο μελισσοκομείο

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ανίχνευση των τριών πτητικών συστατικών που θεωρήθηκαν χαρακτηριστικές της Αμερικάνικης Σηψιγονίας πραγματοποιήθηκε στο μελισσοκομείο του Εργαστηρίου Μελισσοκομίας του Α.Π.Θ. η ακόλουθη πειραματική διαδικασία. Επιλέχθηκαν τρία υγιή ισοδύναμα μελίσσια από τα οποία αρχικά λήφθηκε υγιείς γόνος, ως μάρτυρας, (ελέγχθηκαν με βάση τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, καθώς και με το AFB Diagnostic Test Kit (Vita)), και έπειτα οι κυψέλες επιμολύνθηκαν με τον προσβεβλημένο γόνο. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε με κομμάτια επιβεβαιωμένου προσβεβλημένου γόνου με το βακτήριο *Paenibacillus larvae*, διαστάσεων 5x10 cm.



Εικόνα 9. Τοποθέτηση μολυσμένου γόνου, 5x10 cm.

Από κάθε μελίσει αφαιρέθηκαν δύο πλαίσια που περιείχαν μέλι, με σκοπό τη δημιουργία συνθηκών καταπόνησης του μελισσιού, ώστε να επιταχυνθεί ο ρυθμός προσβολής. Από τα πλαίσια αυτά, λήφθηκε ποσότητα μελιού για να αναλυθεί ως προς το προφίλ των πτητικών του συστατικών και να διερευνηθεί η παρουσία των πτητικών ενώσεων – δεικτών της Αμερικάνικης Σηψιγονίας. Από τα επιμολυσμένα μελίσσια, δείγματα γόνου και μελιού λαμβάνονταν ανά διάστημα μίας εβδομάδας κατά της παρακάτω ημερομηνίες: 20/8/2014 (ημέρα επιμόλυνσης – μάρτυρας), 27/8/2014, 3/9/2014, 10/9/2014, 18/9/2014, 25/9/2014, 3/10/2014, 10/10/2014. Σε

κάθε δειγματοληψία γινόταν επίσης καταμέτρηση του πληθυσμού, του γόνου και των τροφών των μελισσιών. Η τελευταία δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε διάστημα ενάμιση μήνα από την ημέρα της επιμόλυνσης. Στο πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος ήταν εμφανή τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της ασθένειας, χρονικό διάστημα παρόμοιο με πείραμα επιμόλυνσης μελισσιών με AFB και το οποίο πραγματοποιήθηκε στον ίδιο χώρο, προγενέστερα (Γκόρας, 2011).



Εικόνα 10. Δειγματοληψία γόνου.

Στο τέλος του πειράματος και προκειμένου τα μελίσσια να διασωθούν και να ξεχειμωνιάσουν, πραγματοποιήθηκε συνένωση και μεταφορά τους σε κυψέλη με κτισμένα πλαίσια από υγιή μελίσσια, με την προοπτική, σε αυτή την κυψέλη, την άνοιξη να εφαρμοστεί η μέθοδος της μετάγγισης. Όλα τα προσβεβλημένα πλαίσια καταστράφηκαν (κάηκαν), ενώ οι κυψέλες απολυμάνθηκαν.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Διερεύνηση πτητικών ενώσεων – δεικτών της προσβολής από Αμερικάνικη Σηφιγονία

Για τα δεκατρία δείγματα του προσβεβλημένου γόνου προσδιορίστηκε ο βαθμός προσβολής, η ένταση της δυσάρεστης οσμής και έγινε η επιβεβαίωση του παθογόνου οργανισμού που προκάλεσε τη σήψη, με το AFB Diagnostic Test Kit (Vita).

Πίνακας 1. Η ποσότητα του γόνου που χρησιμοποιήθηκε από κάθε δείγμα, ο βαθμός προσβολής του δείγματος, η ένταση της οσμής του και το αποτέλεσμα του AFB Diagnostic Test Kit (Vita).

δείγμα	Ποσότητα γόνου (g)	βαθμός προσβολής (%)	Ένταση οσμής	AFT Diagnostic Test Kit
Δείγμα AFB 1 (15 γόννοι)	0,64	100,00	έντονη	Θετικό
Δείγμα AFB 2 (20 γόννοι)	0,85	100,00	έντονη	Θετικό
Δείγμα AFB 3 (25 γόννοι)	1,10	100,00	έντονη	Θετικό
Δείγμα AFB 4	1,42	81,81	μέτρια	Θετικό
Δείγμα AFB 5	1,17	73,00	μέτρια	Θετικό
Δείγμα AFB 6	0,82	70,00	μέτρια	Θετικό
Δείγμα AFB 7*	0,70	100,00	ελαφριά	Θετικό
Δείγμα AFB 8	1,15	81,00	μέτρια-ελαφριά	Θετικό
Δείγμα AFB 9	1,19	58,00	μέτρια-ελαφριά	Θετικό
Δείγμα AFB 10	1,20	44,70	μέτρια-ελαφριά	Θετικό
Δείγμα AFB 11	1,57	25,00	μέτρια	Θετικό
Δείγμα AFB 12	1,12	63,70	μέτρια	Θετικό
Δείγμα AFB 13	1,62	12,20	μέτρια	Θετικό
Μέσος όρος	1,12	69,95		
Τυπική απόκλιση	0,31	28,95		

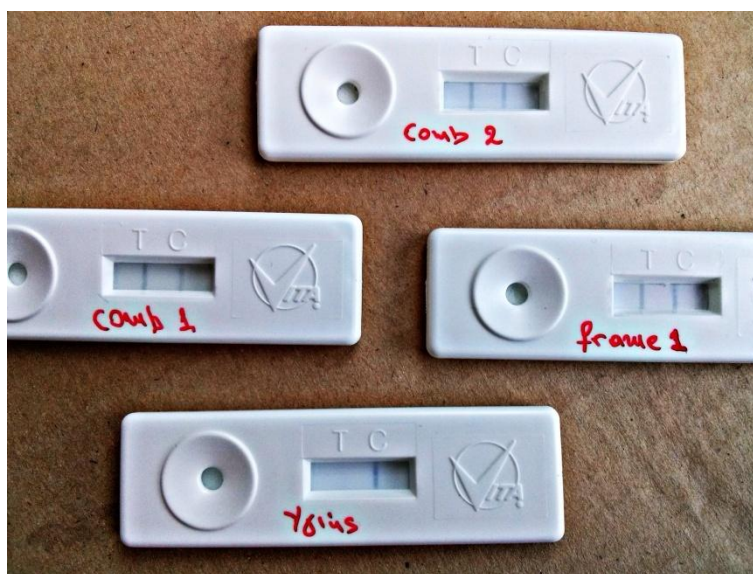
*Πλαίσιο που είχε και προσβολή από κηρώσκορο και πλήρη απουσία υγιούς γόνου.

Η ποσότητα του κάθε δείγματος προέρχονταν από 25 κελία (~1g). Η διακύμανση στην ποσότητα των γραμμαρίων οφείλεται στο γεγονός ότι η προνύμφες

βρισκόταν σε διαφορετικό στάδιο σήψης τους. Κάποιες ήταν στην αρχή με ελαφρώς συμπυκνωμένη μορφή ακόμα, γεγονός που προσέδιδε μεγαλύτερο βάρος στο δείγμα, κάποιες ήταν σε προχωρημένο στάδιο αποσύνθεσης με μορφή κολλώδους ίνας και κάποιες σε τελικό στάδιο αποσύνθεσης με μορφή ενυδατωμένου λεπιού, το οποίο δεν έδιδε ιδιαίτερο βάρος στο δείγμα. Για τα δείγματα από υγιή γόνο χρησιμοποιούνταν ο ίδιος αριθμός κελιών (25), αλλά λόγω της συμπαγής δομής των υγιών προνυμφών το βάρος τους ανέρχονταν περίπου στα 2,3g.

Ο μέσος όρος του βαθμού προσβολής ήταν περίπου 70%. Η οσμή που αναδύοταν μπορούμε να πούμε ότι σχετίζεται με το βαθμό προσβολής, αλλά όχι απόλυτα. Τα πρώτα τρία δείγματα που είχαν έντονη οσμή και 100% προσβολή, σε όλα τα κελιά του δείγματος περιέχονταν γόνος με παρόμοιο στάδιο σήψης και συγκεκριμένα με μορφή κολλώδους ίνας, στάδιο που προσέδιδε εντονότερη οσμή. Τα υπόλοιπα δείγματα περιείχαν γόνο σε διαφορετικό στάδιο σήψης τους (από ελαφρώς σκουρόχρωμη προνύμφη έως και ενυδατωμένο λέπι), στάδια κατά τα οποία η οσμή της σήψης δεν είχε αναδειχθεί ακόμα ή είχε αρχίσει να μειώνεται λόγω μετατροπής της ιξώδους ίνας σε λέπι.

Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν μακροσκοπικά για την ύπαρξη του παθογόνου που προκαλεί την Αμερικάνικη Σηψιγονία, βρέθηκαν θετικά κατά την εξέταση τους με το AFB Diagnostic Test Kit (Vita), ενώ τα δείγματα του υγιούς γόνου αρνητικά.

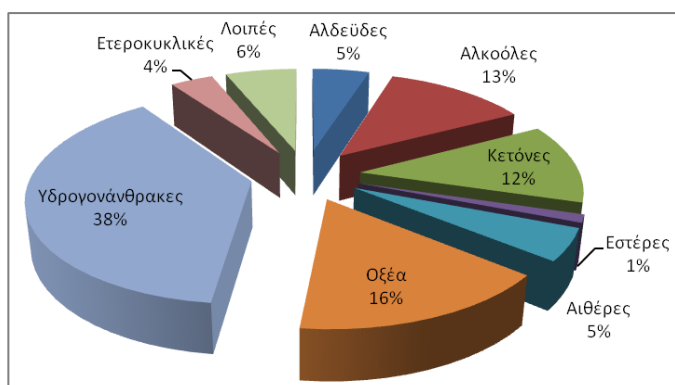


Εικόνα 11. Αντιπροσωπευτικό δείγμα χρήσης του AFB Diagnostic Test Kit (Vita) στα δείγματα.

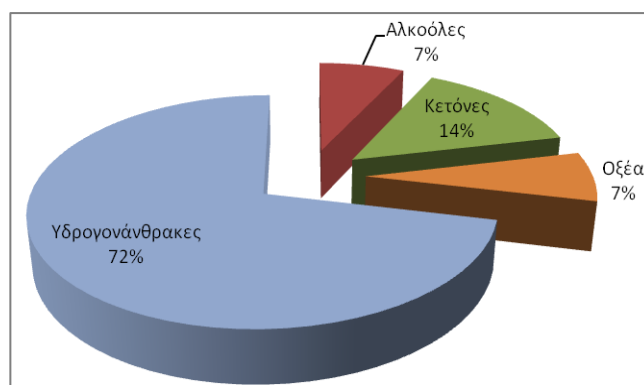
Κάθε δείγμα έδωσε μεγάλο αριθμό πτητικών ενώσεων. Μέσα σε αυτό το πλήθος, υπήρχαν και κάποιες ενώσεις που ήταν σε πολύ μικρό ποσοστό και μπορεί να αλληλεπικαλύπτονταν μεταξύ με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η ταυτοποίηση τους. Στην περίπτωση αυτή, η συγχώνευση ή ο διαχωρισμός αυτών, έγινε βάση τα θραύσματα που έδινε η κάθε κορυφή και του χρόνου κατακράτησης της κάθε ένωσης (Retention time – R.T.).

Έγινε καταγραφή, σε πίνακες, των ενώσεων που έδινε το κάθε δείγμα και ακολούθησε μελέτη και σύγκριση όλων με σκοπό να διαχωριστούν αυτές που παρουσιάζονται μόνο στον άρρωστο γόνο (παράρτημα: πίνακας 1), αυτές που παρουσιάζονται μόνο στον υγιή (παράρτημα: πίνακας 2) και αυτές που παρουσιάζονται τόσο στον υγιή όσο και στον προσβεβλημένο γόνο (παράρτημα: πίνακας 3).

Όλες οι ενώσεις, κατηγοριοποιήθηκαν στους πίνακες σύμφωνα με την χημική ομάδα στην οποία ανήκουν. Βάση αυτής της κατηγοριοποίησης προήλθαν τα διαγράμματα 1 και 2 στα οποία παρατηρούμε τα ποσοστά την κάθε χημικής ομάδας, και πως αυτά μεταβάλλονται από την παρουσία του βακτηρίου. Οι ενώσεις που απαντώνται μόνο στον προσβεβλημένο γόνο κατατάσσονται σε αρκετές ομάδες, ενώ εκείνες που υπάρχουν ταυτόχρονα και στον υγιή γόνο, ανήκουν κατά το πλείστον στην ομάδα των υδρογονανθράκων ή θεωρήθηκαν δύσκολο να ταυτοποιηθούν ακριβώς διότι ήταν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (< 0,1%). Οι μη ταυτοποιημένες ενώσεις δεν συμπεριελήφθησαν στα διαγράμματα, δεδομένου ότι επρόκειτο για μοναδιαία δείγματα και με πολύ μικρό ποσοστό εμφάνισης.

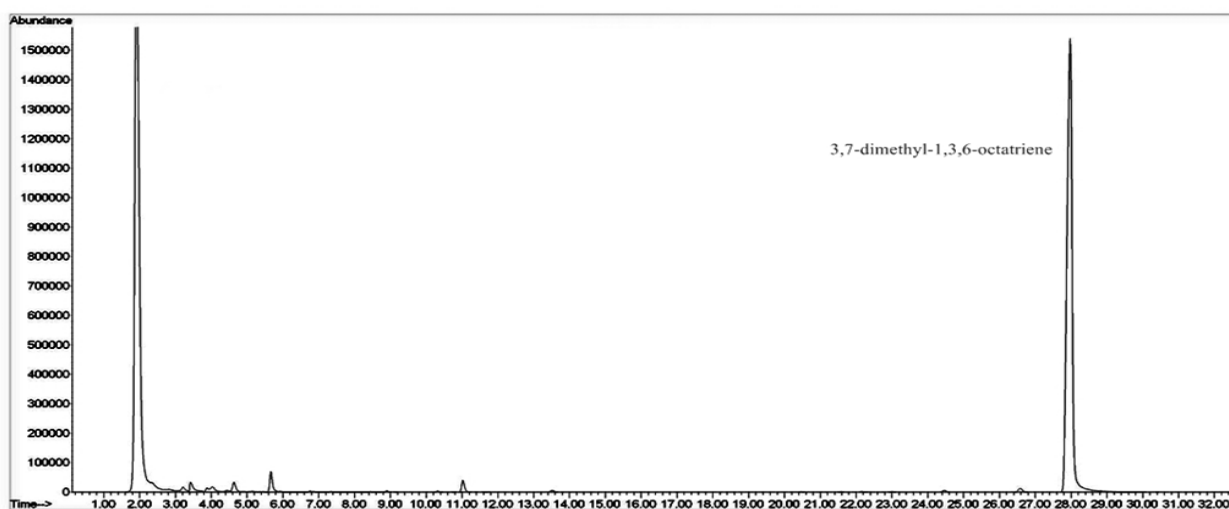


Διάγραμμα 1. Το ποσοστό της κάθε χημικής ομάδας που παρουσιάζονται στον άρρωστο γόνο.

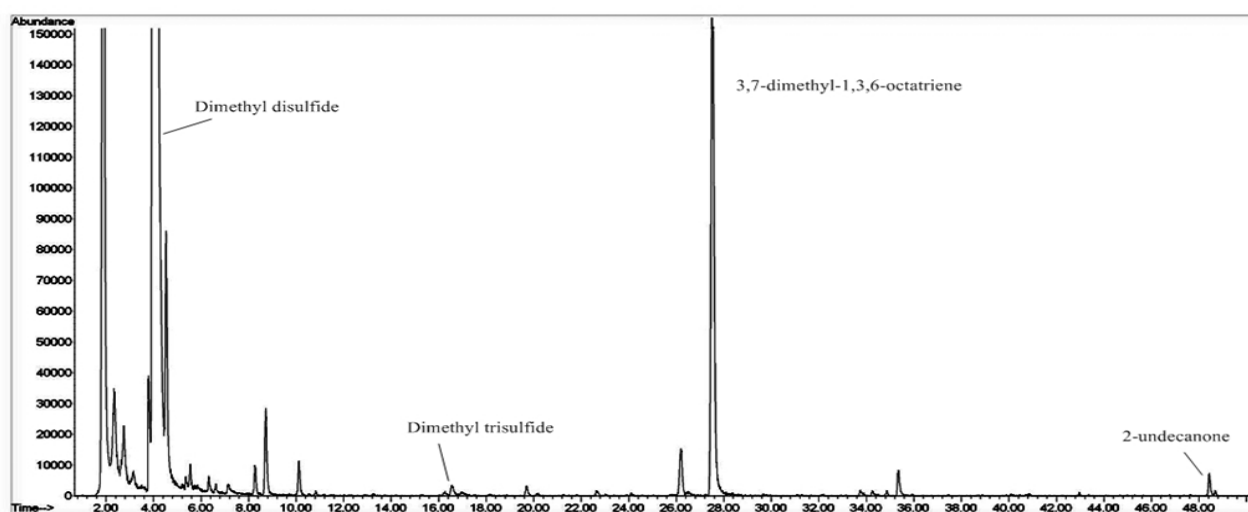


Διάγραμμα 2. Το ποσοστό της κάθε χημικής ομάδας που παρουσιάζονται και σε υγιή και προσβεβλημένο γόνο.

Από τον πίνακα 3 του παραρτήματος, παρατηρούμε ότι τα ποσοστά των κοινών ενώσεων είναι μεγαλύτερα στα δείγματα των προσβεβλημένων γόνων και αισθητά μικρότερα στα δείγματα των υγιών. Εξαίρεση αποτελεί η ένωση 3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene που έχει πολύ μεγαλύτερα ποσοστά, γεγονός το οποίο οφείλεται στο ότι η ένωση αυτή αποτελεί φερομόνη του γόνου (Maisonpasse et al., 2009). Το ίδιο μικρά είναι και τα ποσοστά των ενώσεων που παρουσιάζονται μόνο στην υγιή γόνο (παράρτημα, πίνακας 2). Γενικά, τα δείγματα που προέρχονταν από υγιή γόνο, παρουσίαζαν λίγες ενώσεις (14 έως 22) με μια από τις σημαντικότερες να είναι το 3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene.



Εικόνα 12. Χρωματογράφημα ενός δείγματος υγιούς γόνου.



Εικόνα 13. Χρωματογράφημα ενός δείγματος γόνου προσβεβλημένου από Αμερικάνικη Σηψιγονία.

Ο πίνακας 1 του παραρτήματος περιλαμβάνει τις ενώσεις που εντοπίστηκαν στον προσβεβλημένο γόνο και από το σύνολο των ενώσεων που η παρουσία τους υπάρχει στα περισσότερα δείγματα, εξαιρέθηκαν: η δεκανάλη (decanal) που απαντάται στο μέλι (Τανανάκη, 2006) και η 3-μεθυλοβουτανάλη (3-methyl-butanol) που ήταν δύσκολο να διακριθεί από την ισομερή της 2-μεθυλοβουτανάλη (2-methyl-butanol) που επίσης παρουσιαζόταν σε όλα τα δείγματα. Κατά συνέπεια, οι κύριες ενώσεις που εμφανίζονταν στα δείγματα του προσβεβλημένου γόνου και όχι του υγιούς και θα μπορούσαν να θεωρηθούν δείκτες της προσβολής του γόνου από την Αμερικάνικη Σηψιγονία ήταν:

i. **Δισουλφίδιο του διμεθυλίου (DMDS)**

– *Dimethyl disulfide*, $C_2H_6S_2$

ii. **Τρισουλφίδιο του διμεθυλίου (DMTS)**

– *Dimethyl trisulfide*, CH_3SSSCH_3

iii. **2-ενδεκανόνη**

– *2-undecanone*, $CH_3(CH_2)_8COCH_3$

Οι ενώσεις αυτές έχουν ξαναβρεθεί όλες μαζί σε έρευνα αναζήτησης πτητικών και σε άλλα είδη βακτηρίων, όπως είναι το *Pseudomonas aeruginosa* και κάποια άλλα είδη του γένους αυτού (Labows et al., 1980), καθώς και στο άρωμα που αναδύει η μαύρη (*Tuber melanosporum*) και η λευκή (*Tuber magnatum*) τρούφα (Pelusio et al., 1995; Diaz et al., 2003).

Το Δισουλφίδιο του Διμεθυλίου (DMDS) είναι μία υγρή εύφλεκτη οργανική ένωση, αποτελεί την απλούστερη μορφή οργανικού δισουλφιδίου και σχετίζεται με την ανεπιθύμητη οσμή του σκόρδου. Το DMDS μαζί με το DMTS και το Σουλφίδιο του Διμεθυλίου (dimethyl sulfide), έχουν επιβεβαιωθεί ως πτητικές ενώσεις που αναδύονται από το φυτό *Helicodiceros muscivorus*, το οποίο επιτυγχάνει την επικονίαση του προσελκύνοντας μύγες που έλκονται από τη μυρωδιά του χαλασμένου κρέατος (Angioy et al., 2003).

Το Τρισουλφίδιο του Διμεθυλίου (DMTS) είναι μία υγρή εύφλεκτη οργανική ένωση και αποτελεί την απλούστερη μορφή οργανικού τρισουλφιδίου. Έχει την μυρωδιά σήψης και είναι ανιχνεύσιμο σε επίπεδα τόσο χαμηλά όσο 1 ppt. Η ένωση έχει ανιχνευτεί σε πτητικά που αναδύονται από μαγειρεμένα φυτά του είδους *Allium* (σκόρδο, κρεμμύδι, πράσο) και του είδους *Brassica* (λάχανο, κουνουπίδι, μπρόκολο)

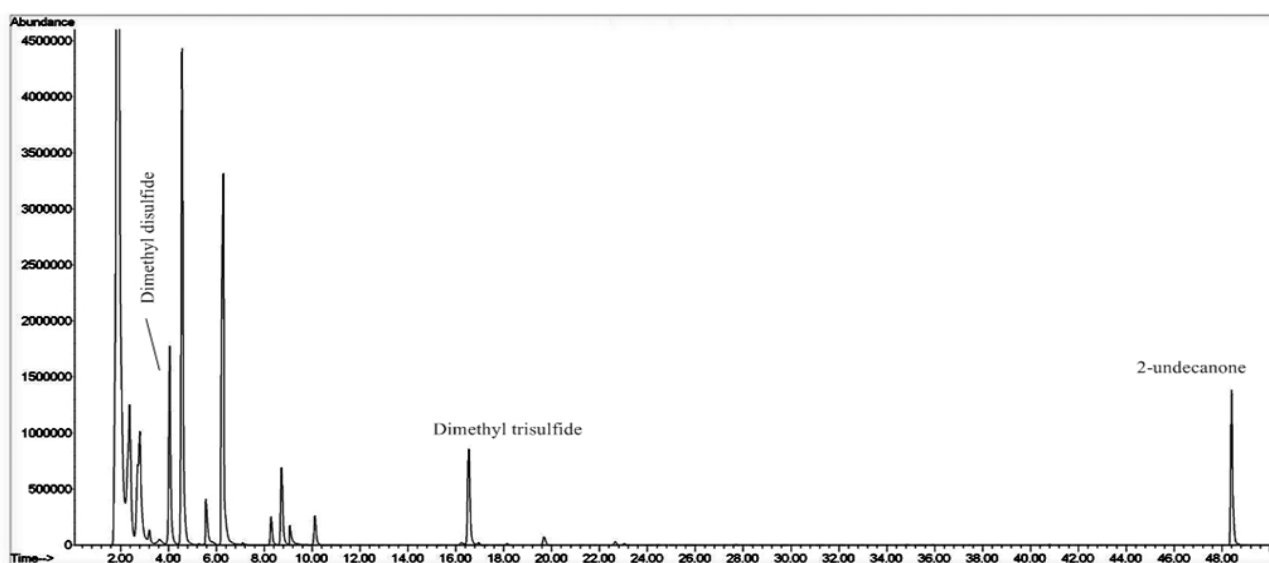
(Schutte & Teranishi, 1974). Επίσης, έχει βρεθεί σε «παλαιωμένα» τρόφιμα, όπως είναι τα ωριμασμένα τυριά (Limburger, blue cheese, Camembert, cheddar), οι παλαιωμένες μπύρες, τα κρασιά, το ουίσκι, προϊόντα γάλακτος και γενικά είδη στα οποία περιέχονται μικροοργανισμοί. Αποτελεί προϊόν βακτηριακής αποσύνθεσης, συμπεριλαμβανομένων και των πρώτων σταδίων της ανθρώπινης αποσύνθεσης, και προκαλεί την χαρακτηριστική οσμή των πληγών από μυκητιάσεις και καρκίνο του ανθρώπινου σώματος (Shirasu et al., 2009; Berger et al., 1999).

Η 2-ενδεκανόνη, σε υγρή μορφή μπορεί είτε να παρασκευαστεί, είτε να εξαχθεί από το έλαιο των φυτών *Ruta graveolen* - *Ruta chalepensis* (απήγανος) όπου βρίσκεται σε ποσοστό πάνω από 70% (Gorduant & Reinhard, 1972; Mejri et al., 2010). Στη φύση απαντάται σε μικρές συγκεντρώσεις στην μπανάνα, στα τριφύλλια, το ginger, τις φράουλες και στις άγριες τομάτες (*Lycopersicon sp*). Λόγω της δυσάρεστης οσμής της, η 2-ενδεκανόνη, χρησιμοποιήθηκε σαν εντομοαπωθητικό ή απωθητικό για ζώα, για παράδειγμα, συγκέντρωση 1-2% αυτής της ουσίας βρίσκεται στα απωθητικά για γάτες ή σκύλους. Έρευνα από το North Carolina State University έχει δείξει ότι μπορεί να είναι ένα χρήσιμο εντομοαπωθητικό (BioUD[®] παρασκευασμένο από φύλλα και βλαστούς *Lycopersicon hirsutum*), αποτελεσματικό όσο και το DEET, ή και περισσότερο (Bissinger et al. 2011).

3.2. Καμπύλες αναφοράς και επικύρωση μεθόδου

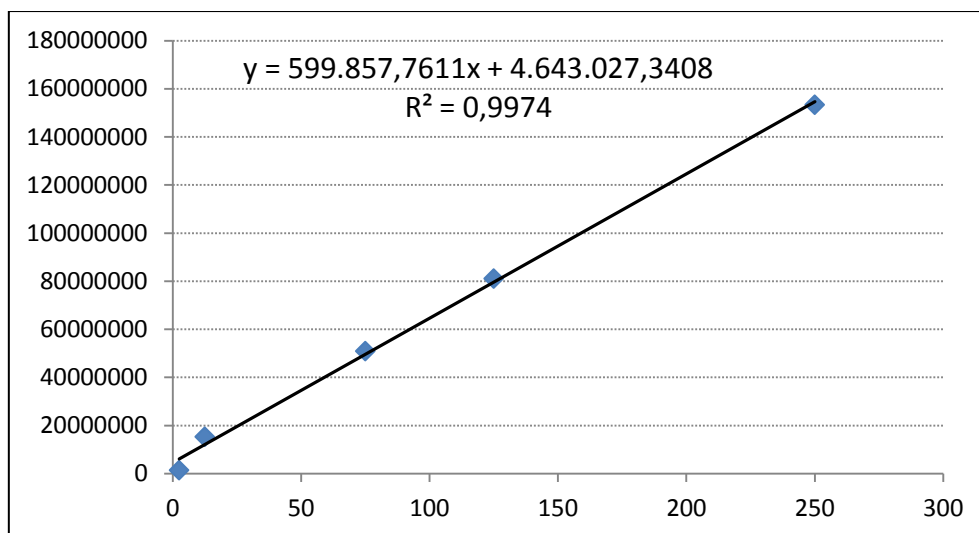
3.2.1. Καμπύλες αναφοράς

Με βάση τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν από την ανάλυση των διαλυμάτων εργασίας κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς για κάθε πτητική ένωση – δείκτη.

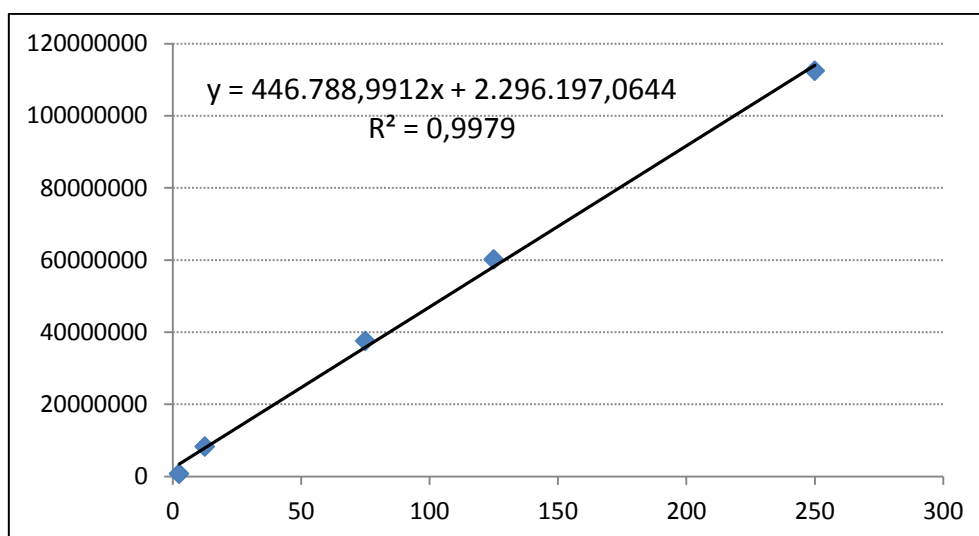


Εικόνα 14. Χρωματογράφημα των πρότυπων ενώσεων – δεικτών, για κατασκευή των καμπυλών αναφοράς.

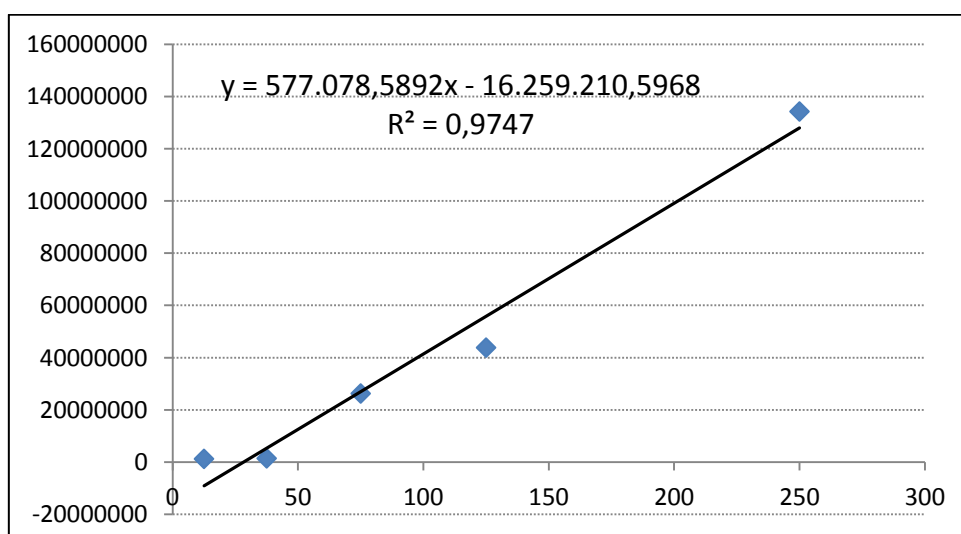
Η γραμμικότητα των καμπυλών αναφοράς για τα δυο σουλφίδια ήταν από 2,5 έως 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ενώ για την 2-ενδεκανόνη από 12,5 έως 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Οι συντελεστές συσχέτισης των καμπυλών αναφοράς κυμάνθηκε από 0,9747 έως 0,9979, γεγονός που αποδεικνύει την ικανοποιητική γραμμικότητα της μεθόδου για τις προαναφερθείσες περιοχές (διαγράμματα 3 - 5).



Διάγραμμα 3. Καμπύλη αναφοράς της ένωσης – δείκτη: Δισουλφίδιο του Διμεθυλίου (Dimethyl disulfide)



Διάγραμμα 4. Καμπύλη αναφοράς της ένωσης – δείκτη: Τρισουλφίδιο του Διμεθυλίου (Dimethyl trisulfide)



Διάγραμμα 5. Καμπύλη αναφοράς της ένωσης – δείκτη: 2-ενδεκανόνη (2-undecanone)

3.2.2. Επικύρωση της μεθόδου

Για την επικύρωση της μεθόδου προσδιορίστηκε η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου στο επίπεδο των 100 µg/kg με ανάλυση του ίδιου δείγματος πέντε φορές την ίδια μέρα και σε πέντε διαφορετικές μέρες αντίστοιχα. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν με βάση τις καμπύλες αναφοράς, η ανάκτηση και η σχετική τυπική απόκλιση (RSD).

Πίνακας 2. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας των καμπυλών αναφοράς

n = 5	Επαναληψιμότητα		Αναπαραγωγιμότητα	
	Ανάκτηση (%)	RSD	Ανάκτηση (%)	RSD
Δισουλφίδιο του Διμεθυλίου	117,8	19,2	108,6	21,7
Τρισουλφίδιο του Διμεθυλίου	105,8	21,4	100,2	14,0
2-ενδεκανόνη	121,7	9,6	94,9	19,2

Και για τις τρεις ενώσεις τα αποτελέσματα έδωσαν ικανοποιητική ακρίβεια με τις τιμές τις ανάκτησης στην περίπτωση της επαναληψιμότητας να κυμαίνονται από 105,8 έως 121,7 και στην περίπτωση της αναπαραγωγιμότητας από 94,9 έως 108,6. Από τις τιμές των RSD διαπιστώθηκε επίσης ικανοποιητική επαναληψιμότητα (9,6% - 21,4%) και αναπαραγωγιμότητα (14% - 21,7%).

3.3. Εργαστηριακή διερεύνηση των ποσοτικών αλλαγών των πτητικών ενώσεων – δεικτών

Από τα δύο μολυσμένα πλαίσια που είχαν αφεθεί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εξετάστηκε το ποσοστό αύξησης των πτητικών ενώσεων – δεικτών, σύμφωνα με τις συγκεντρώσεις τους.

Ως new frame χαρακτηρίζονται οι πρώτες μετρήσεις και ως old frame οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν μετά από μία εβδομάδα.

Πίνακας 3. Παρουσίαση της ποσότητας γόνου που χρησιμοποιήθηκε, του βαθμού προσβολής, της έντασης της οσμής και του αποτελέσματος του AFB Diagnostic Test Kit (Vita) στα πλαίσια που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ποσοτική αύξησης της ασθένειας

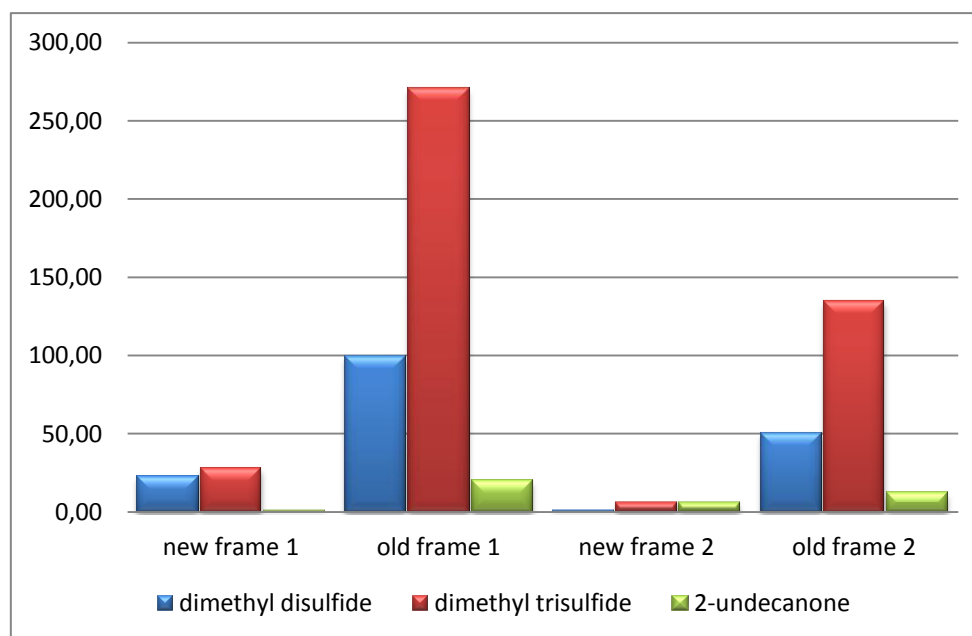
δείγμα	Ποσότητα γόνου (g)	βαθμός προσβολής (%)	Ένταση οσμής	AFT Diagnostic Test Kit
new frame 1	1,14	43	μέτρια	Θετικό
new frame 2	0,97	59	μέτρια	Θετικό
old frame 1	1,18	43	έντονη	Θετικό
old frame 2	1,19	59	έντονη	Θετικό

Ο βαθμός προσβολής ήταν ικανοποιητικός και η ένταση της οσμής ανάλογη του βαθμού προσβολής, όπως συνέβαινε και στα πρώτα δείγματα που εξετάστηκαν για την εύρεση των πτητικών ενώσεων – δεικτών της ασθένειας. Κατά τη διάρκεια της μίας εβδομάδας που αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, η σήψη προχώρησε και όλες οι προσβεβλημένες προνύμφες είχαν μετατραπεί σε ιζώδης ίνα ή ακόμη και σε λέπι. Συνέπεια αυτής της προχωρημένης σήψης ήταν να αυξηθεί και η οσμή που προκαλεί το βακτήριο *Paenibacillus larvae*.

Μετά την ανάλυση των δειγμάτων με το Purge & Trap – GC-MS, υπολογίστηκε η συγκέντρωση της κάθε ένωσης – δείκτη στα δείγματα και υπολογίστηκε το ποσοστό αύξησης της παρουσίας τους. Η αύξηση που παρατηρήθηκε ήταν μεγάλη, ειδικά στα ποσοστά των σουλφιδίων που ξεπέρασε σε ποσοστό το 3800%, γεγονός που επιβεβαιώνει την προχωρημένη σήψη, καθώς οι πτητικές αυτές ενώσεις αναφέρονται ως παράγωγα σήψης (Labows et al., 1980).

Πίνακας 4. Συγκέντρωση της κάθε ουσίας στο «νέο» και «παλιό» πλαίσιο, με υπολογισμό του ποσοστού αύξησης της συγκέντρωσης

C	new	old	Αύξηση %	new	old	Αύξηση %
	frame 1 (ng/g)	frame 1 (ng/g)		frame 2 (ng/g)	frame 2 (ng/g)	
dimethyl disulfide	22,83	99,12	334,08	1,29	50,51	3816,78
dimethyl trisulfide	28,15	270,80	862,05	5,93	134,61	2170,17
2-undecanone	1,19	20,39	1619,37	5,82	12,47	114,32



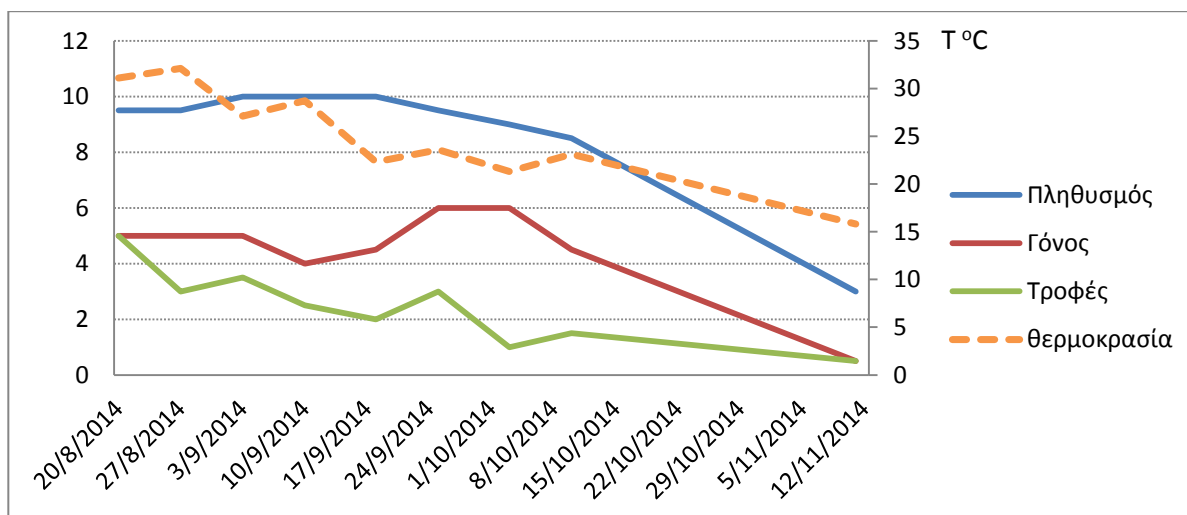
Διάγραμμα 6. Απεικόνιση της αύξησης της συγκέντρωσης των πτητικών ενώσεων – δεικτών στα δύο δείγματα

3.4. Πρακτική εφαρμογή της μεθόδου ανίχνευσης των πτητικών ενώσεων – δεικτών

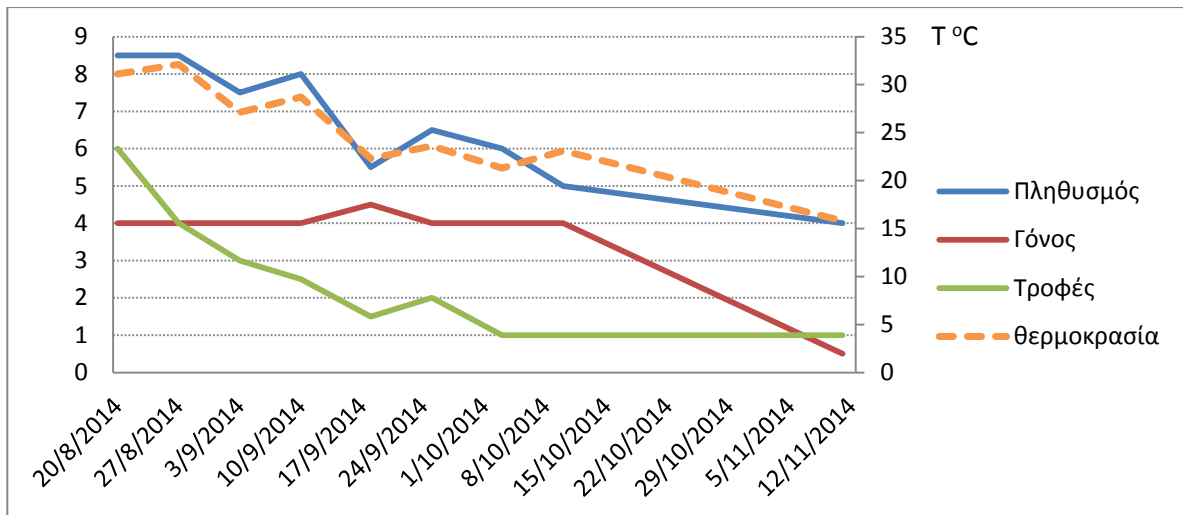
Κατά τη διάρκεια κάθε δειγματοληψίας γόνου και μελιού, γινόταν παράλληλα καταμέτρηση του πληθυσμού, του γόνου και των τροφών που υπήρχαν σε κάθε κυψέλη, και σημειώνονταν το σύνολο των πλαισίων του κάθε παράγοντα (μέγιστος αριθμός πλαισίων: 10). Στον παράγοντα «τροφές» συμπεριλαμβανόταν, μαζί, το μέλι και η γύρη. Η δειγματοληψία του γόνου και του μελιού σταμάτησε στις 10/10/2014, αλλά επειδή η μετάγγιση των μελισσιών σε μία υγιή κυψέλη καθυστέρησε λόγω των καιρικών συνθηκών (συνεχής βροχοπτώσεις), καταμετρήθηκε ο πληθυσμός τους και την ημέρα τις μετάγγισης: 11/11/2014.

Οι ημερομηνίες των δειγματοληψιών ήταν: 20/8/2014 (ημέρα επιμόλυνσης – μάρτυρας), 27/8/2014, 3/9/2014, 10/9/2014, 18/9/2014, 25/9/2014, 3/10/2014, 10/10/2014 και η κωδικοί των κυψελών του μελισσοκομείου που εργαστηρίου μελισσοκομίας ήταν: 17, 8, 9.

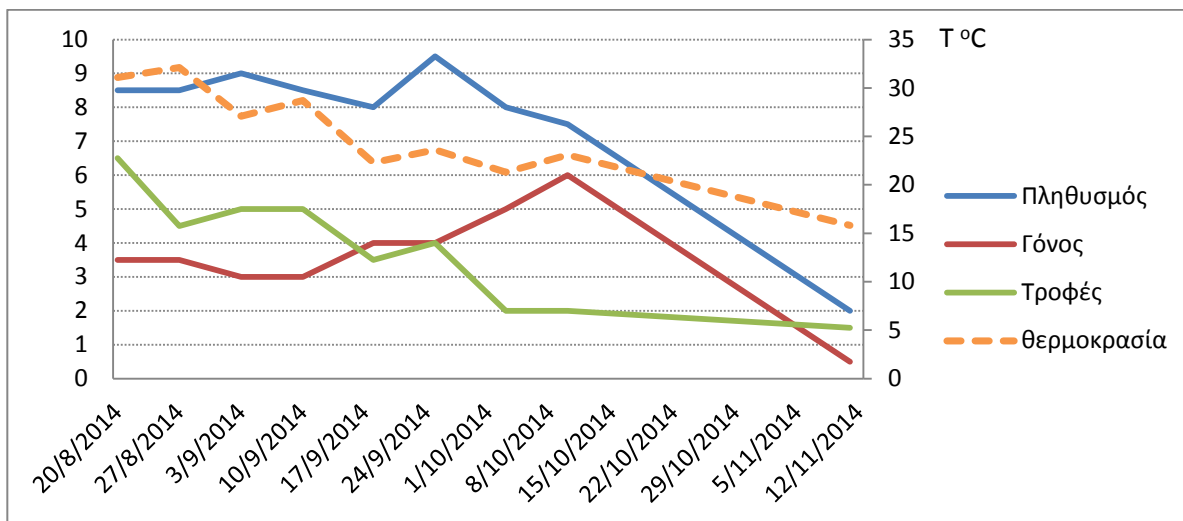
Στα γραφήματα δίνεται και η μέγιστη θερμοκρασία ($T^{\circ}\text{C}$) ημέρας για την περιοχή, όπως αυτή καταγράφηκε στο <http://penteli.meteo.gr/meteosearch/default.asp> (παράρτημα, πίνακας 5).



Διάγραμμα 7. Παρακολούθηση μεταβολής πληθυσμού, γόνου και τροφών στην κυψέλη 17 σε συνάρτηση με την θερμοκρασία περιβάλλοντος.



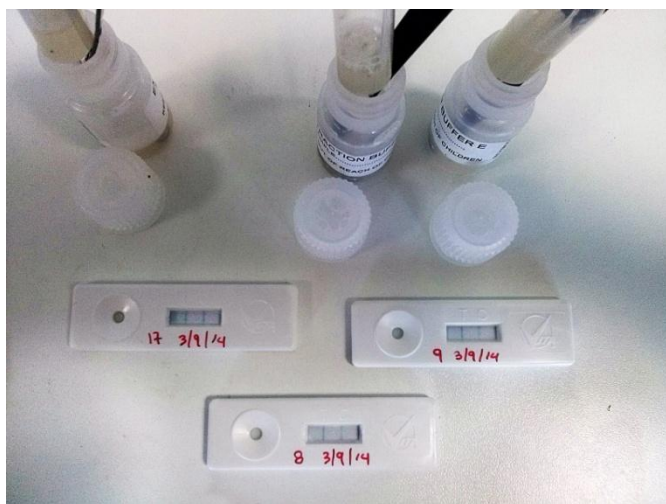
Διάγραμμα 8. Παρακολούθηση μεταβολής πληθυσμού, γόνου και τροφών στην κυψέλης 8 σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Διάγραμμα 9. Παρακολούθηση μεταβολής πληθυσμού, γόνου και τροφών στην κυψέλης 9 σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Από τα παραπάνω διαγράμματα της κάθε κυψέλης, είναι φανερό πως όσο πλησιάζουμε στη φθινοπωρινή περίοδο ο πληθυσμός αρχίζει να μειώνεται και η παραγωγή του γόνου να ακολουθεί σχεδόν την ίδια πορεία. Η πτώση της θερμοκρασίας ήταν αναμενόμενη για την εποχή και συνοδευόταν από σχετικά αυξημένη υγρασία με βροχοπτώσεις, συνυπολογίζοντας όμως και το γεγονός ότι εκείνη τη χρονική στιγμή στο περιβάλλον δεν απαντάται πληθώρα γύρης και νέκταρος, επακόλουθο ήταν η απότομη μείωση των τροφών εντός της κυψέλης, οι οποίες καταναλώθηκαν μέχρι μηδενικού σημείου. Στις παραπάνω μειώσεις όμως θα πρέπει να συνυπολογίσουμε και την ύπαρξη του βακτηρίου εντός της κυψέλης.

Κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών, παρατηρήθηκαν διάφορα παροδικά συμπτώματα στην εμφάνιση των κυψελών. Στις 3/9/2014, όπου είχε πραγματοποιηθεί η δεύτερη παραλαβή δειγμάτων γόνου και μελιού, σε κάθε κυψέλη παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά 3-4 κελάκια με τρύπα στο κάλυμμα τους. Αυτά εξετάστηκαν με το AFB Diagnostic Test Kit (Vita) και βρέθηκαν θετικά σε Αμερικάνικη Σηψιγονία.



Εικόνα 15. Εξέταση των δειγμάτων στις 3/9/2014 με το AFB Diagnostic Test Kit (Vita)

Μια εβδομάδα αργότερα (10/9/2014), όπου πραγματοποιήθηκε η τρίτη λήψη δειγμάτων γόνου και μελιού, ο βαθμός προσβολής δεν αυξήθηκε πολύ στην κυψέλη 17, λίγο πιο εμφανή ήταν τα συμπτώματα στην κυψέλη 8, ενώ στην κυψέλη 9 η προσβολή ήταν λίγο πιο προχωρημένη. Κατά το πέρασμα των επόμενων εβδομάδων, η εικόνα ήταν περίπου ίδια σε όλες τις κυψέλες, χωρίς ιδιαίτερη μακροσκοπική αύξηση της προσβολής. Εμφανή συμπτώματα της ασθένειας σε πιο ικανοποιητικό επίπεδο παρατηρήθηκαν στις 25/9/2014, διάστημα σχεδόν ενός μήνα από την ημέρα προσβολής τους.

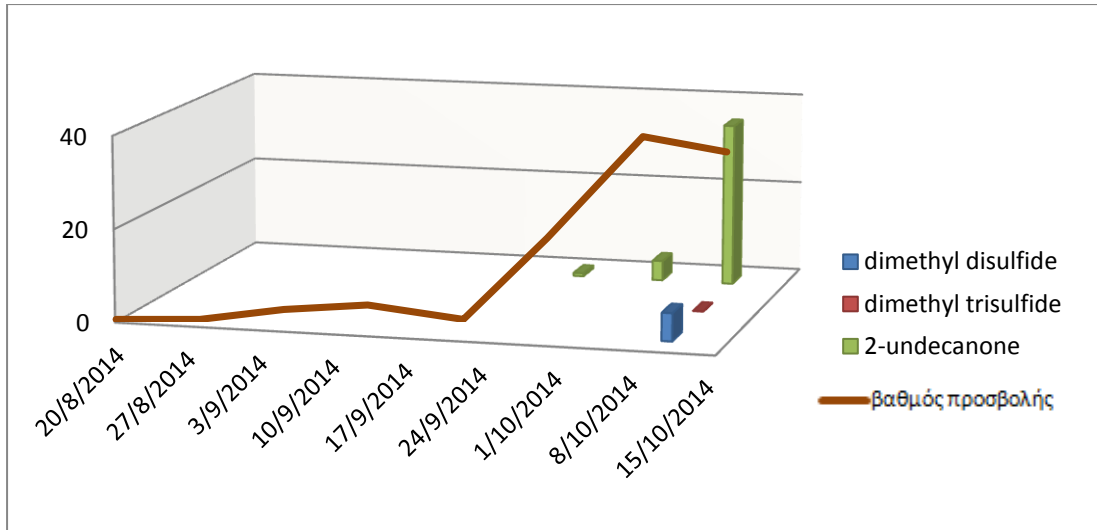
Στις 3/10/2014 στην κυψέλη 17 παρατηρήθηκαν πολλά κελιά που δεν είχαν κλείσει και η προνύμφη είχε χρώμα ελαφρώς κίτρινο, δείγμα που μπορεί να σηματοδοτούσε την ύπαρξη Ευρωπαϊκής Σηψιγονίας. Πάρθηκε δείγμα για να εξεταστεί με το AFB Diagnostic Test Kit (Vita), αλλά βρέθηκε θετικό σε Αμερικάνικη Σηψιγονία.



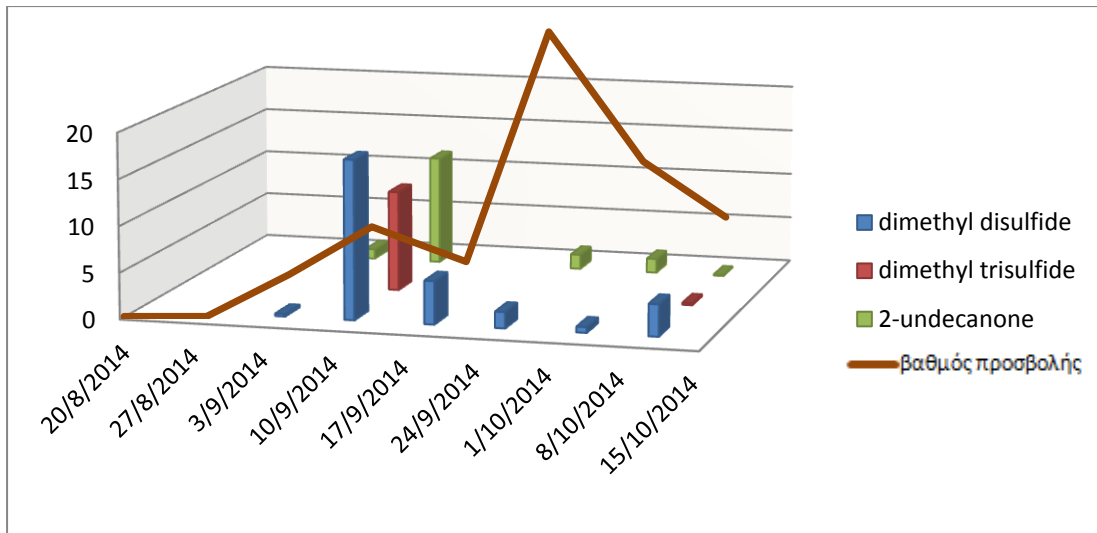
Εικόνα 16. Τα φαινοτυπικά συμπτώματα που παρατηρήθηκαν στις 3/10/2014 και η ταυτοποίησή τους με το AFB Diagnostic Test Kit (Vita)

Στις 10/10/2014 έγινε η τελευταία παραλαβή δειγμάτων από τις επιμολυσμένες κυψέλες. Δείγμα μελιού δεν παραλήφθηκε αυτή τη φορά, δεδομένου ότι δεν υπήρχε μέσα στις κυψέλες, όπως είχε συμβεί και κατά την προηγούμενη δειγματοληψία (3/10/2014).

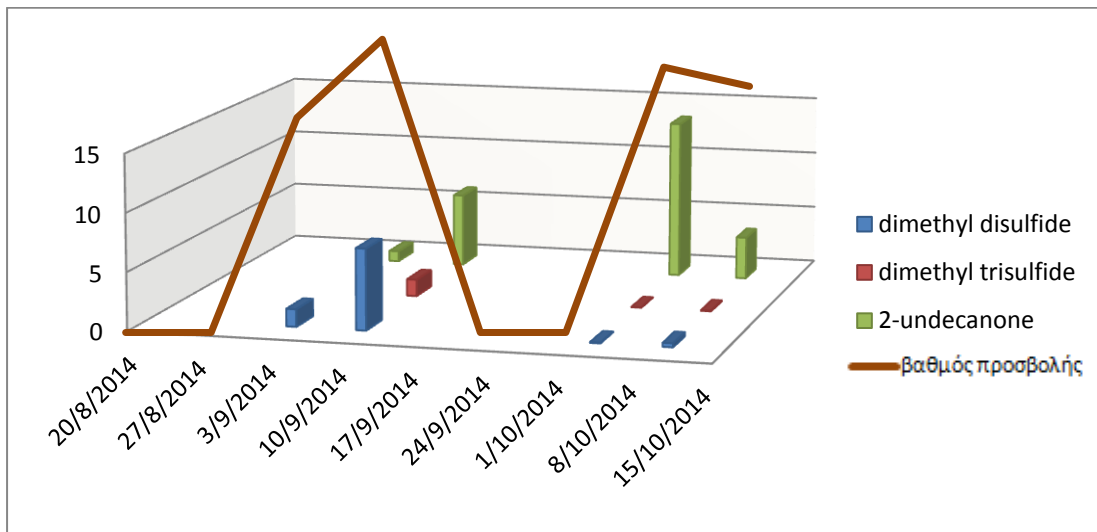
Από την εξέταση των δειγμάτων με το σύστημα Purge & Trap – GC-MS, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις τις κάθε ουσίας στα δείγματα (παράρτημα, πίνακας 4) και δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα γραφήματα για την κάθε κυψέλη. Η κυψέλη 17 άργησε πολύ να δώσει σημάδια προσβολής, πιθανότατα γιατί, από την αρχή, ήταν πιο «δυνατό» μελίσει σε σχέση με τα άλλα δύο. Στις κυψέλες 8 και 9 φαίνεται ότι η προσβολή τους έγινε σχετικά νωρίς (από τις 10/9/2014) και μάλιστα με ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό συγκέντρωσης των ενώσεων – δεικτών. Για τις επόμενες δύο εβδομάδες ακολουθεί πτώση της συγκέντρωσης, έως και μηδενικού σημείου (κυψέλη 9), ενώ μετέπειτα παρουσιάζονται ξανά οι πτητικές ενώσεις – δείκτες της ασθένειας.



Διάγραμμα 10. Συγκέντρωση των ενώσεων – δεικτών και του βαθμού προσβολής, στην κυψέλη 17



Διάγραμμα 11. Συγκέντρωση των ενώσεων – δεικτών και του βαθμού προσβολής, στην κυψέλη 8 (στην ημερομηνία 10/9/2014 η ένωση dimethyl disulfide απεικονίζεται με διαίρεση 10^3).



Διάγραμμα 12. Συγκέντρωση των ενώσεων – δεικτών και του βαθμού προσβολής, στην κυψέλη 9 (στην ημερομηνία 10/9/2014 η ένωση dimethyl disulfide απεικονίζεται με διαίρεση 10^2).

Όπως φαίνεται, στις 3/9/2014 όπου είχαν παρατηρηθεί τα πρώτα μακροσκοπικά συμπτώματα της ασθένειας σε μεμονωμένα κελιά, έχουμε και την πρώτη εμφάνιση των πτητικών ενώσεων – δεικτών. Στο μεσοδιάστημα που παρατηρούμε την κάμψη της παρουσίας των πτητικών ενώσεων – δεικτών, παρατηρούμε ότι υπάρχει και μία ελαφριά αύξηση του γόνου σε όλες τις κυψέλες (διαγράμματα 7, 8, 9).

Συγκρίνοντας τα δεδομένα που προήλθαν κατά τις ίδιες ημερομηνίες από την παρακολούθηση των μακροσκοπικών συμπτωμάτων της ασθένειας και την εξέταση των δειγμάτων με το σύστημα Purge & Trap – GC-MS, παρατηρούμε ότι αυτά ταυτίζονται. Κατά την περίοδο που ήταν εμφανή τα συμπτώματα της ασθένειας (10/9/2014) έχουμε και την εμφάνιση των πτητικών ενώσεων – δεικτών στα δείγματα γόνου. Αντίστοιχα τις επόμενες δύο εβδομάδες που δεν μπορούσαν να παρατηρηθούν σε αρκετό βαθμό τα συμπτώματα μακροσκοπικά, παρατηρούμε και αντίστοιχη μείωση των ποσοστών των πτητικών ενώσεων – δεικτών. Αντίστοιχα, το ίδιο συμβαίνει και κατά τις δύο τελευταίες εβδομάδες των μετρήσεων, όπου τα συμπτώματα της ασθένειας ήταν και στις τρεις κυψέλες εμφανή και η παρουσία των πτητικών ενώσεων – δεικτών σημειώθηκε σε όλα δείγματα του γόνου.

Υπάρχει αρκετή διακύμανση στις συγκεντρώσεις της κάθε ουσίας. Τα αποτελέσματα από την κυψέλη 17 παρουσιάζουν μία πιο ομαλή εμφάνιση των πτητικών ενώσεων – δεικτών σε συνάρτηση με το βαθμό προσβολής, ίσως γιατί το μελίτσι στην κυψέλη αυτή ήταν πιο «δυνατό» από την αρχή και άργησε να εμφανίσει συμπτώματα προσβολής. Αντίθετα, στην κυψέλη 8 παρουσιάζονται κάποιες δυσαναλογίες του βαθμού προσβολής με την εμφάνιση των πτητικών ενώσεων – δεικτών. Στις 1/10/2014 εμφανίζεται ένας μεγάλος βαθμός προσβολής, ενώ παράλληλα υπάρχει μειωμένη εμφάνιση των πτητικών ενώσεων – δεικτών..

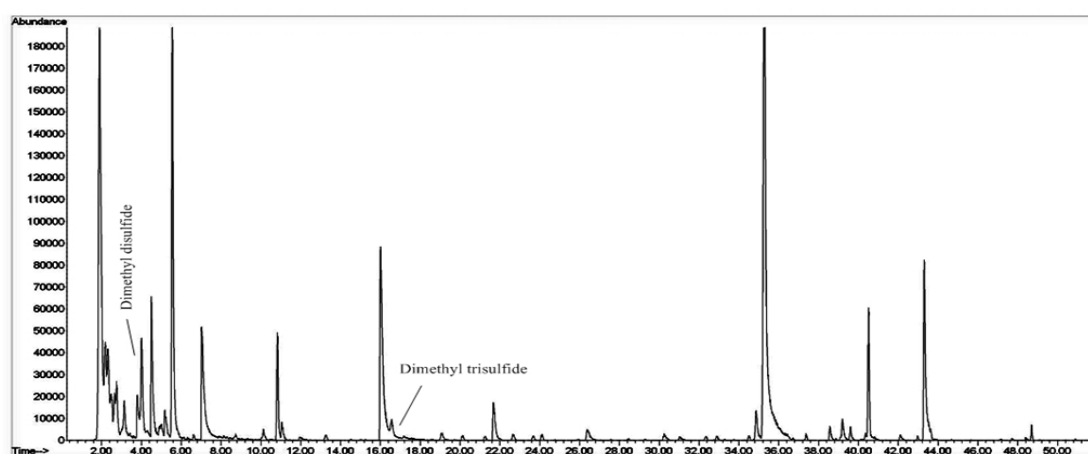
Συγκρίνοντας τα διαγράμματα που αφορούν την πορεία του πληθυσμού, τη συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων – δεικτών και του βαθμού προσβολής της κυψέλης 9 (διαγράμματα 9 και 12), κατά τις ημερομηνίες 18/9/2014 & 25/9/2014, παρατηρούμε ότι εκείνη τη χρονική περίοδο υπήρξε μία ελαφριά άνοδος στην ποσότητα του γόνου με ταυτόχρονη απουσία προσβεβλημένων κελιών γόνου (μηδέν βαθμός προσβολής). Παράλληλα παρατηρήθηκε και μία πολύ μικρή αύξηση στην ποσότητα των αποθηκευμένων τροφών στη κυψέλη, καθώς στη φύση υπήρχε διαθέσιμη γύρη και νέκταρ για να συλλέξουν οι μέλισσες με σκοπό να φαίνονται σημάδια ανάκαμψης της κυψέλης. Στις επόμενες δύο εβδομάδες, παρατηρείται

μεγάλη αύξηση στην ποσότητα του γόνου και καθοδική πορεία στην ποσότητα των τροφών της κυψέλης. Δεδομένου της πτώσης της θερμοκρασίας και γενικά των δυσμενέστερων καιρικών συνθηκών με απουσία γύρης και νέκταρος στο περιβάλλον, επακόλουθο ήταν η μείωση των τροφών και κατά συνέπεια η απότομη και ραγδαία μείωση του γόνου που ακολούθησε.

Γενικά, ο παράγοντας του περιβάλλοντος (καιρικές συνθήκες, εποχή του έτους – διαθεσιμότητα τροφών), μαζί με το γεγονός ότι υπήρχε στις κυψέλες και η παρουσία του βακτηρίου *Paenibacillus larvae*, οδήγησε στην απότομη εξασθένηση των μελισσιών μετά από τις 10/10/2014.

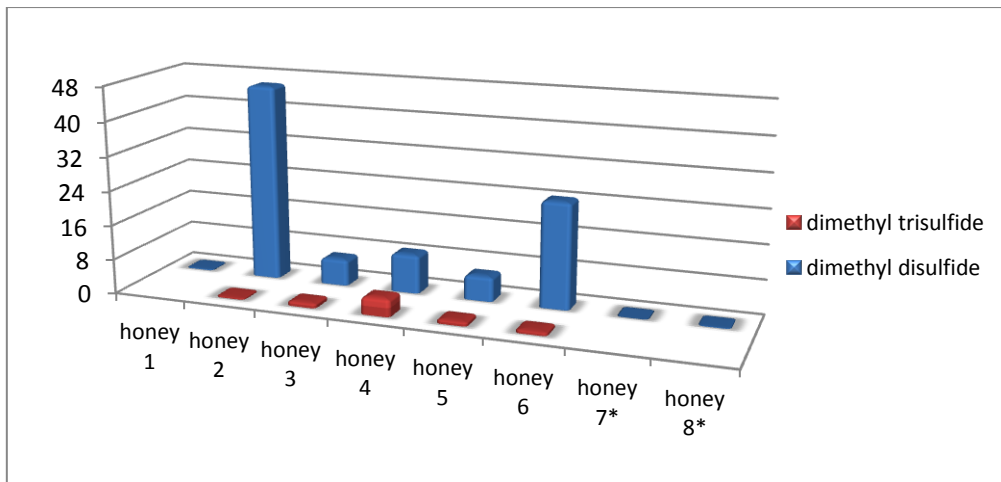
3.5. Ανάλυση δειγμάτων μελιού από ασθενή μελίτσια

Αρχικά εξετάστηκαν έξι (6) δείγμα μελιού τα οποία στάλθηκαν στο εργαστήριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας του Α.Π.Θ. από μελισσοκόμους και περιέχονταν στα ίδια πλαίσια με γόνο που είχε προσβληθεί από Αμερικάνικη Σηψιγονία. Σε όλα τα δείγματα υπήρχε η παρουσία της πτητικής ένωσης – δείκτη Δισουλφίδιο του Διμεθυλίου (dimethyl disulfide), στα περισσότερα παρουσιάστηκε και η ένωση Τρισουλφίδιο του Διμεθυλίου (dimethyl trisulfide), αλλά σε κανένα η 2-ενδεκανόνη.



Εικόνα 17. Χρωματογράφημα ενός δείγματος μελιού που προήλθε από μελίτσια με προσβολή Αμερικάνικης Σηψιγονίας.

Από τη διαδικασία της επιμόλυνσης των κυψελών με μολυσμένο γόνο, εξετάστηκαν και τα δείγματα μελιού που λαμβάνονταν από τις κυψέλες, παράλληλα με την εβδομαδιαία δειγματοληψία του γόνου. Από τις τρεις κυψέλες που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση, κατά την εξέταση των δειγμάτων μελιού μόνο στην κυψέλη 9 παρουσιάστηκε η πτητική ένωση Δισουλφίδιο του Διμεθυλίου, σε διάστημα ενός μήνα από την ημέρα της επιμόλυνσης (20/8/2014 – 18/9/2014), καθώς και στο δείγμα μελιού που παραλήφθηκε την επόμενη εβδομάδα (25/9/2014). Κατά τις επόμενες δύο δειγματοληψίες (3/10/2014, 10/10/2014), δεν εντοπίστηκε ποσότητα αποθηκευμένου μελιού σε καμία από τις κυψέλες.



Διάγραμμα 13. Συγκέντρωση των πτητικών ενώσεων – δεικτών σε δείγματα μελιού.

* Τα δείγματα honey 7 & 8 προέρχονται από το πείραμα επιμόλυνσης της κυψέλης 9, κατά τις ημερομηνίες 18/9/2014 & 25/9/2014, αντίστοιχα.

Όπως διαπιστώνεται από το διάγραμμα 13, οι συγκεντρώσεις του Δισουλφιδίου του Διμεθυλίου είναι αρκετά αυξημένες στα δείγματα 2 έως 6 και ταυτόχρονα, σε αυτά τα δείγματα, έχουμε και την παρουσία του Τρισουλφιδίου του Διμεθυλίου. Αντίστοιχα, στα δείγματα 1, 7 & 8 η συγκέντρωση του Δισουλφιδίου του Διμεθυλίου είναι σχεδόν μηδενική και η πτητική ένωση – δείκτης Τρισουλφίδιο του Διμεθυλίου απουσιάζει.

Σε μικροβιολογική έρευνα που έγινε σε δείγματα μελιών που προέρχονταν από μελίσσια με προσβολή από Αμερικάνικη Σηψιγονία, βρέθηκε ότι δεν περιείχαν όλα τα δείγματα μελιού σπόρια του βακτηρίου. Πιθανή αιτία αυτού του αποτελέσματος θεωρήθηκε το γεγονός ότι μελί αυτό που εξετάστηκε (είτε ήταν σφραγισμένο, είτε όχι) μπορεί να αποθηκεύτηκε στις κυψέλες πριν ακόμα προσβληθεί το μελίσσι ή όταν το μελίσσι ήταν ακόμα σε πολύ πρώιμο στάδιο προσβολής (Nordstrom et al., 2000).

Παρόμοιο είναι και το συμπέρασμα που έχουμε και από την εξέταση των πτητικών ενώσεων – δεικτών στα δείγματα μελιού που προήλθαν από μελίσσια με προσβολή από Αμερικάνικη Σηψιγονία. Όπως περιγράφηκε παραπάνω για το διάγραμμα 9, κατά τις ημερομηνίες 18/9/2014 & 25/9/2014 όπου ανιχνεύτηκε η παρουσία του Δισουλφιδίου του Διμεθυλίου στο μέλι (δείγματα: honey 7 & 8), είχαμε μία μικρή αύξηση στην ποσότητα των αποθηκευμένων τροφών στη κυψέλη, δηλαδή στη φύση υπήρχε διαθέσιμη γύρη και νέκταρ για να συλλέξουν οι μέλισσες. Κατά συνέπεια, το μέλι που αποθηκεύτηκε εκείνη τη χρονική περίοδο, είχε τη δυνατότητα να απορροφήσει τα πτητικά συστατικά από το περιβάλλον της κυψέλης.

Συγκρίνοντας όλα τα αποτελέσματα που έδωσαν τα δείγματα του μελιού, με το συμπέρασμα των Nordstrom et al. (2000) και τα δεδομένα του πειράματος επιμόλυνσης, διαπιστώνουμε και στις δυο περιπτώσεις την μερική ανίχνευση του παράγοντα που οφείλεται στην προβολή από το βακτήριο. Αναλυτικότερα, στα δείγματα 7 και 8 που γνωρίζαμε το διάστημα προσβολής και το ποσοστό προσβολής τους, διακρίνουμε την παρουσία του Δισουλφιδίου του Διμεθυλίου σε μικρή συγκέντρωση, ενώ στα δείγματα 2 έως 6 που είχαν προέλθει από πλαίσια με εμφανή συμπτώματα Αμερικάνικης Σηψιγονίας, βρεθήκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις Δισουλφιδίου του Διμεθυλίου και Τρισουλφιδίου του Διμεθυλίου. Με βάση τα ποιοτικά και ποσοστικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων μελιού, διαπιστώνουμε ότι υπάρχει δυνατότητα εντοπισμού αυτών, ακόμη και σε ένα προϊόν της μέλισσας, ειδικότερα όταν η προσβολή είναι μεγάλη.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων – δεικτών σε προσβεβλημένο από Αμερικάνικη Σηψιγονία γόνο μελισσών αποτέλεσε δύσκολο έργο, δεδομένου ότι δεν βρέθηκε στη βιβλιογραφία καμία πρόσφατη έρευνα με το συγκεκριμένο θέμα. Λόγω αυτής της έλλειψης, χρειάστηκε να αναπτυχθεί μία μέθοδος κατάλληλη για την ανίχνευση, αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό, των πτητικών ενώσεων στο γόνο. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των πτητικών ενώσεων που αναδύονται από το γόνο που έχει προσβληθεί με το βακτήριο *Paenibacillus larvae*, θα μπορούσε να αποτελέσει μία νέα μέθοδο, συμπληρωματική στις μέχρι τώρα γνωστές, για τον προσδιορισμό και την ταυτοποίηση της ασθένειας.

Από την ανάλυση των προσβεβλημένων και μη γόνων, ανιχνεύτηκαν, συγκεντρωτικά, 98 ενώσεις που παρουσιάστηκαν μόνο στα δείγματα του προσβεβλημένου γόνου, 26 ενώσεις που ήταν κοινές στα δείγματα υγιούς και προσβεβλημένου γόνου και 7 ενώσεις που εμφανίστηκαν μόνο στα υγιή δείγματα του γόνου. Από όλες αυτές τις ενώσεις, τρεις ήταν εκείνες στην παρουσία των οποίων θα μπορούσε να αποδοθεί η δυσάρεστη οσμή των προνυμφών, από τη δράση του βακτηρίου της Αμερικάνικης Σηψιγονίας. Αυτές ήταν: το Δισουλφίδιο του Διμεθυλίου, το Τρισουλφίδιο του Διμεθυλίου και η 2-ενδεκανόνη. Η παρουσία των ενώσεων αυτών ως προϊόντα δράσης του βακτηρίου *Paenibacillus larvae* στο γόνο των μελισσών ενισχύεται και από πληροφορίες της βιβλιογραφίας, καθώς έχουν εντοπιστεί και σε άλλους οργανισμούς που προσβάλλονται από βακτήρια και τους προκαλούν σήψη. Στοιχείο επιβεβαιώσεως αποτέλεσε επίσης το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις τους αυξανόταν, καθώς αυξανόταν και η σήψη. Ακολούθησε η επιμόλυνση τριών υγιών κυψελών με σκοπό να μελετηθεί η δυνατότητα ανίχνευσης τους στην κυψέλη, καθώς και η πορεία της συγκέντρωσης τους συγκριτικά με τα φαινοτυπικά συμπτώματα της ασθένειας.

Η επιμόλυνση των κυψελών πραγματοποιήθηκε με κομμάτια κηρήθρας που περιείχαν προσβεβλημένο γόνο, ενώ η συλλογή των δειγμάτων γινόταν ανά διαστήματα μίας εβδομάδας. Από την ανάλυση των δειγμάτων του γόνου με το σύστημα Purge & Trap – GC-MS, η εμφάνιση των πτητικών ενώσεων – δεικτών στα δείγματα συνέπεσε χρονικά με την μακροσκοπική παρατήρηση των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών της ασθένειας. Επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση των συγκεντρώσεων στο πέρασμα του χρόνου, με μικρές ανομοιομορφίες στην παρουσία και

συγκέντρωση των ενώσεων, λόγω των κλιματικών συνθηκών. Κατά συνέπεια, μπορούμε να πούμε ότι μια κυψέλη νοσεί από Αμερικάνικη Σηψιγονία, προσδιορίζοντας το πτητικό προφίλ του γόνου, χωρίς όμως αυτή η πληροφορία να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πρόωρο εντοπισμό της ασθένειας, εφόσον οι πτητικές ενώσεις που χαρακτηρίζουν την ύπαρξη του βακτηρίου, εμφανίζονται σε πιο προχωρημένο στάδιο σήψης του γόνου, όπου κάποια από τα συμπτώματα της ασθένειας έχουν παρατηρηθεί ήδη μακροσκοπικά.

Σχετικά με την ανίχνευση των ίδιων πτητικών ενώσεων – δεικτών στο μέλι, η έρευνα ξεκίνησε από τα αρχικά πλαίσια στα οποία συνυπήρχαν μολυσμένος γόνος και μέλι, και συμπληρώθηκε έπειτα από την εξέταση των δειγμάτων μελιού που λαμβάνονταν εβδομαδιαίως από το πείραμα επιμόλυνση των τριών κυψελών. Το αποτέλεσμα, από τις αναλύσεις όλων των παραπάνω δειγμάτων μελιού, ήταν ότι στο μέλι εμφανίζονται μόνο οι ενώσεις: Δισουλφίδιο του Διμεθυλίου και Τρισουλφίδιο του Διμεθυλίου και όχι η 2-ενδεκανόνη. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία αυτών, καθώς και η ποσότητα της συγκέντρωσής τους, εξαρτάται από τη χρονική στιγμή που το μέλι αυτό αποθηκεύτηκε στις κηρήθρες. Αν το μέλι αποθηκεύτηκε και σφραγίστηκε πριν το μελίτσι προσβληθεί ή όταν η προσβολή ήταν ακόμα σε πολύ αρχικό στάδιο, τότε έχουμε απουσία των πτητικών ενώσεων – δεικτών, ή έχουμε πολύ μικρή εμφάνιση στη συγκέντρωσή τους. Αντίθετα, αν το μέλι αποθηκευτεί σε χρονική στιγμή που η ασθένεια είναι εμφανώς προχωρημένη, οι πτητικές ιδιότητες του βακτηρίου μεταφέρονται και στο μέλι.

Το αποτέλεσμα όλων αυτών των πρώτων δοκιμών, θα μπορούσε να αποτελέσει έναυσμα για μία νέα έρευνα σχετικά με το ρυθμό αύξησης της ασθένειας σε συνάρτηση με την ένταση των πτητικών ενώσεων – δεικτών που αναδύει.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alippi A.M. (1999) Bacterial diseases. In: Colin M.E. (ed.), Ball B.V. (ed.), Kilani M.(ed.). Bee disease diagnosis. Zaragoza: CIHEAM, p.31
<http://om.ciheam.org/om/pdf/b25/99600235.pdf>
- Angioy A. M., Stensmyr C. M., Urru I., Puliafito M., Collu I., Hansson S. B. (2003). Function of the heater: the dead horse arum revisited. *The Royal Society*, 271: S13–S15
- Ash, C., Priest, F.G., Collins, M.D., (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64: 253–260.
- Bachanová K., Klauđiny J., Kopernický J., Šimútha J. (2002). Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 33: 259–269.
- Bailey, L. and Lee, D.C. (1962). *Bacillus larvae*: its cultivation in vitro and its growth in vivo. *J. Gen. Microbiol.*, 29: 71 1-717.
- Berger C., Kyan A. J., Molimard P., Martin N., Spinnler E. H. (1999). Production of Sulfur Flavors by Ten Strains of *Geotrichum candidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(12): 5510-5514.
- Bissinger B. W., Apperson C. S., Watson D.W., Arellano C., Sonenshine D. E., Roe R. M. (2011). Novel field assays and the comparative repellency of BioUD[®], DEET and permethrin against *Amblyomma americanum*. *Medical and Veterinary Entomology* 25: 217–226.
- Corduan G., Reinhard E. (1972). Synthesis of volatile oils in tissue cultures of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 11:917 - 922.
- Davidson, E.W. (1973). Ultrastructure of AFB disease pathogenesis in larvae of the worker bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 21: 53-61.
- De Graaf D.C., Alippi A.M., Antúnez K., Aronstein K.A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D.W., Evans J.D., Foster L.J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K.D., Nguyen B.K., Poppinga L., Spivak M., Van Engelsdorp D., Wilkins S. & Genersch E. (2013). Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *J. Apicult. Res.*, 52 (1), 1-26.

- De Graaf, D.C., De Vos, P., Heyndrickx, M., Van Trappen, S., Peiren, N., Jacobs, F.J., (2006). Identification of *Paenibacillus* larvae to the subspecies level: an obstacle for AFB diagnosis. *J. Invertebr. Pathol.* 91:115–123.
- De Graaf, D.C., Alippi, A.M., Brown, M., Evans, J.D., Feldlaufer, M., Gregorc, A., Hornitzky, M., Pernal, S.F., Schuch, D.M., Titera, D., Tomkies, V., Ritter, W., (2006a). Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Lett. Appl. Microbiol.* 43: 583–590.
- Diaz P., Ibanez I., Senorans J. F., Reglero G. (2003). Truffle aroma characterization by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1017: 207–214.
- Dingmann D.W. & Stahly D.P. (1983). Medium promoting sporulation of *Bacillus* larvae and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(4), 860–869.
- Dobbelaere, W; De Graaf, D C; Peeters, J E; Jacobs, F J (2001). Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus* larvae subsp. larvae) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie* 32: 363-370.
- Epilobee (2014). A pan-European epidemiological study on honey, European Union Reference Laboratory for honeybee health (EURL). http://www.ilfattoalimentare.it/wp-content/uploads/2014/04/bee-report_en1.pdf
- FAO (2006). Honey bee diseases and pests: a practical guide, W. Ritter & P. Akwatanakul. Agricultural and Food Engineering Technical Report No. 4. ISSN 1814-1137. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0849e/A0849e00.pdf>
- Fries I. and Camazine S. (2001). Implication of horizontal and vertical pathogen transmission for honey epidemiology. *Apidologie* 32: 199 – 214.
- Fries I., Lindstrom A. and Korpela S. (2006). Vertical transmission of American foulbrood (*Paenibacillus* larvae) in honey bees (*Apis mellifera*). *Vet. Microbiol.* 114: 269 – 274.
- Genersch E., Ashiralieva A. & Fries I. (2005). Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus* larvae subsp. larvae, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honey bees. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, (11): 7551–7555.

- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikäinen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I., (2006). Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 501–511.
- Genersch, E., (2010). American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S10–S19.
- Gochnauer, T A. (1969). Gel filtration of extract from larvae with American foul brood diseases. *J. apic. Res.* 8: 23-28.
- Gochnauer T.A. (1973). Growth, protease formation, and sporulation of *Bacillus larvae* in aerated broth culture. *J. Invertebr. Pathol.*, 22: 251–257.
- Gochnauer, T A., Shearer, D A (1981). Volatile acids from honeybee larvae infected with *Bacillus larvae* and from a culture of the organism. *J. Apicul. Res.* 20(2): 104-109.
- Gordon R.E., Haynes W.C. & Pang C.H.N. (1973). The genus *Bacillus*. *Agriculture Handbook N° 427*, USDA, Washington D.C., e-book: pp: 109-126. http://www.google.gr/books?hl=el&lr=&id=erL29sLL5nEC&oi=fnd&pg=PA109&dq=gordon+1973+the+genus+bacillus&ots=XHUEoZyhKm&sig=HPCWdAIVXUCrZVvKOV-HgiGgLJw&redir_esc=y#v=onepage&q=gordon%201973%20the%20genus%20bacillus&f=false
- Govan, V.A., Allsopp, M.H. and Davison, S. (1999) A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*. *Appl Environ Microbiol* 65: 2243–2245.
- Haseman L. (1961). How long can spores of American foulbrood live? *Amer. Bee J.*, 101: 298 – 299.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., de Vos, P., Logan, N.A., Ali, N., Berkeley, R.C.W., (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White, 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 270-279.

- Hornitzky M.A.Z. & Karlovskis S. (1989). A culture technique for the detection of *Bacillus* larvae in honeybees. *J. Apicult. Res.* 28:118–120.
- Kai-Kuang Ho and Yue-Wen Chen (2001). Susceptibility of the Asian honey bee (*Apis cerana*) to American Foulbrood (*Paenibacillus larvae* larvae), In proceedings of 37th International Apicultural Congress, 28 Oct – 1 Nov 2001, Durban, South Africa.
- Katznelson, H. (1950). *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. *J. Bacteriol* 59: 153–155.
- Labows N. J., McGinley J. K., Webster F. G., Leyden J. J. (1980). Headspace analysis of volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 12 (4): 521-526.
- Lauro, F.M., Favaretto, M., Covolo, L., Rassa, M. and Bertoloni, G. (2003) Rapid detection of *Paenibacillus larvae* from honey and hive samples with a novel nested PCR protocol. *Int J Food Microbiol* 81: 195–201.
- Maisonnasse A., Lenoir J-C., Costagliola G., Beslay D., Choteau F., Crauser D., Becard J-M., Plettner E., Le Conte Y. (2009). A scientific note on E- β -ocimene, a new volatile primer pheromone that inhibits worker ovary development in honey bees. *Apidologie* 40: 562–564
- Mejri J., Abderrabba M., Mejri M. (2010). Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. *Industrial Crops and Products* 32: 671–673.
- Matheson A. (1992). Strategies for prevention and control of American foulbrood. *American Bee Journal* 132: 399-402, 471-475, 534-537, 547.
- Nazzi F., Vedova D. G., D'Agaro M. (2003). A semiochemical from brood cells infested by *Varroa destructor* triggers hygienic behavior in *Apis mellifera*. *Apidologie* 35: 65-70.
- Nordstrom S., Forsgren E., Fries I. (2002). Comparative diagnosis of American Foulbrood using samples of adult honey bees and honey. *Journal of Apicultural Science* 46 (2): 5-12.
- Ohe v. d., W. (1997) – Efficient prophylactic measures against American foulbrood by bacteriological analysis of honey for spore contamination. *Am. Bee J.*, 137(8): 603-606.

- OIE. (2004). American foulbrood. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.9.2. World Organization for Animal Health, Office International des Epizooties, Paris, France. <http://www.oie.int/doc/ged/d6448.pdf>
- OIE (2014). American foulbrood. In: OIE Manual of Diagnosis Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014, Chapter 2.2.2. World Organization for Animal Health, Office International des Epizooties, Paris, France. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.02_AMERICAN_FOULBROOD.pdf
- Olsen P.E., Grant G.A., Nelson D.L. & Rice W.A. (1990). Detection of American foulbrood disease of the honeybee, using a monoclonal antibody specific to *Bacillus larvae* in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Microbiol.*, 36: 732–735. (abstract) <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m90-124#.VGiE1sscTrc>
- Otte E. (1973). Contribution to the laboratory diagnosis of American foulbrood of the honey bee with particular reference to the fluorescent antibody technique. *Apidologie*, 4 (4): 331–339.
- Pelusio F., Nilsson T., Montanarella L., Tilio R., Larsen B., Facchetti S., Madsen J. O. (1995). Headspace Solid-Phase Microextraction Analysis of Volatile Organic Sulfur Compounds in Black and White Truffle Aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 2138-2143.
- Peng Y.S. & Peng K.Y. (1979). A study on the possible utilization of immunodiffusion and immunofluorescence techniques as diagnostic methods for American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*), *J. Invertebr. Pathol.*, 33: 284-289.
- Ritter W. (2003). Early detection of American foulbrood by honey and wax analysis. *Apiacta* 38: 125-130.
- Rose R. I. (1969). *Bacillus larvae* isolation, culturing and vegetative thermal death point. *J. Invertebr. Pathol.* 14 (3): 411-414.
- Schuch, D.M.T., Madden, R.H. and Sattler, A. (2001). An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* spores in honey. *J Apic Res* 40: 59-64.
- Schutte L. & Teranishi R. (1974). Precursors of sulfur-containing flavor compounds, *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 4:4, 457-505.

- Shimanuki H. (1980). Diseases and Pests of Honey Bees. Beekeeping in the United States, Agriculture handbook number 335, Revised October 1980, p. 118-128.
- Shimanuki H. (1983). Identification and control of honey bee diseases. United States department of agriculture. Farmers' bulletin number 2255, p. 1-7.
- Shirasu M., Nagai S., Hahashi R., Ochiai A., Touhara K. (2009). Dimethyl Trisulfide as a Characteristic Odor Associated with Fungating Cancer Wounds. Biosci. Biotechnol. Biochem., 73 (9): 2117–2120,
- Swanson J.A.I., Torto B., Kells S. A., Mesce K. A., Tumlinson L.H., Spivak M. (2009). Odorants that induce Hygienic behavior in honeybees: Identification of Volatile compounds in Chalkbrood-Infected honeybee larvae. L Chem Ecol 35: 1108-1116.
- White, G.F., 1906. The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. USDA, Bureau of Entomology, Technical Series. 14: 1–50.
- Woodrow, A.W. (1942). Susceptibility of honeybee larvae to individual inoculations with spores of Bacillus larvae. J. Econ. Entomol., 35: 892-895.
- Γκόρας Γ. (2011). Επιπτώσεις του χρόνου αντικατάστασης των κηρήθρων στην ανάπτυξη, υγιεινή και παραγωγικότητα των μελισσών του είδους *Apis mellifera*. Διδακτορική διατριβή – Βιβλιοθήκη Σχολής Γεωπονίας Α.Π.Θ., σελ 11-12.
- Θρασυβούλου Θ. Ανδρέας (2012). Πρακτική Μελισσοκομία. Εκδόσεις: Μελισσοκομική Επιθεώρηση, σελ 107-119.
- Ευρωπαϊκή επιτροπή (2010). Ανακοίνωση της επιτροπής προς το ευρωπαϊκό κοινοβούλιο και το συμβούλιο για την υγεία των μελισσών, Βρυξέλλες, 6.12.2010. COM (2010) 714.
http://ec.europa.eu/food/archive/animal/liveanimals/bees/docs/honeybee_health_communication_el.pdf
- Τανανάκη Χ. (2006). Μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν τα πτητικά συστατικά των μελιών που προέρχονται από μελίτωμα. Διδακτορική Διατριβή – Βιβλιοθήκη Σχολής Γεωπονίας Α.Π.Θ., σελ. 57-61.
- Τανανάκη Χ. (2013). Πανεπιστημιακές σημειώσεις για το μάθημα «Μεθοδολογία Χημικών Αναλύσεων στα οπωροκηπευτικά» (Αέρια χρωματογραφία & Μέθοδοι εκχύλισης). Εργαστήριο Μελισσοκομίας – Σηροτροφίας Α.Π.Θ., σελ 1-16.

- Υφαντίδης Δ. Μιχαήλ (2011). Παθήσεις του Μελισσιού – Μη Συμβατικές Μέθοδοι Αντιμετώπισης τους. Εκδόσεις: Μελισσοκομική Επιθεώρηση, Νίκος Πάππας, σελ 3-65 & 78-93.
- Χαριζάνης Χρ. Πασχάλης (1996). Μέλισσα και Μελισσοκομική Τεχνική. Εκδόσεις: Γιαχούδη – Γιαπούλη, σελ 213-235.
- <http://www.vita-europe.com/products/afb-diagnostic-test-kit/>
- <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2014/>
- <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/27e.pdf>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Πτητικές ενώσεις που εντοπίστηκαν μόνο στον προσβεβλημένο γόνο (οι τιμές αφορούν την περιεκτικότητα επί του συνόλου).

όνομα/ percentage	R.T.*	Δείγμα AFB 1 (15 γόνοι)	Δείγμα AFB 2 (20 γόνοι)	Δείγμα AFB 3 (25 γόνοι)	Δείγμα AFB 4	Δείγμα AFB 5	Δείγμα AFB 6	Δείγμα AFB 7	Δείγμα AFB 8	Δείγμα AFB 9	Δείγμα AFB 10	Δείγμα AFB 11	Δείγμα AFB 12	Δείγμα AFB 13
(%) βαθμός προσβολής		100	100	100	81,81	73	70	100	81	58	44,7	25	63,7	12,2
Οσμή		έντονη	έντονη	έντονη	μέτρια	μέτρια	μέτρια	ελαφριά	μέτρια-ελαφριά	μέτρια-ελαφριά	μέτρια-ελαφριά	Μέτρια	μέτρια	Μέτρια
Αλδεΐδες														
3-methyl-butatal	2,697	0,375	0,379	0,165	4,491	0,34	0,542	0,283	0,247	0,346	0,124			
Heptanal	11,24		0,039		0,193				0,29				0,403	
Decanal	43,497	0,184	0,363	0,745	1,467	1,388	1,689	0,569	2,137	0,565	0,692	0,808	8,477	1,215
2-methyl-pentanal	52,067				0,049									
Αλκοόλες														
(S)-2-methyl-1-butanol	3,956												6,12	
2-heptanol	11,306													0,428
(S)-4-methyl-1-hexanol	15,479	0,089	0,113	0,208				0,414						
1-octen-3-ol	18,141							0,235						
2-nonyl-1-ol / (E)-2-nonenal / cis-1-methyl-9-oxabicyclo[6.1.0]nonane / 2- decyl-1-ol	18,974							0,222	0,409	0,347	0,35			
trifluoroacetyl-a-terpineol	24,813		0,139	0,072										
2-ethyl-1-hexanol	25,799	0,124	0,163	0,305	0,139		0,552					0,3	0,238	0,083
cis-tetrahydro-5-methyl- furfuryl alcohol	29,16				0,182									
1-octanol	32,321												0,455	0,153
phenylethyl alcohol	36,327			0,208										
Κετόνες														
4-hydroxy-2-butanone	2,396	1,816												
2-hydroxy-3-pentanone	6,106				0,612				0,213	0,227				
2-heptanone / 4-methyl-2- hexanone / 5-methyl-2- hexanone	10,559	0,093	0,198					0,842	0,1		0,142	0,183		0,295
2-octanone	19,216							0,504						
3-nonanone	19,45			0,133										
6-methyl-5-hepten-2-one / 5- methylene-9-decen-2-one	20,429	0,042			0,354	0,306	0,363						0,115	
2-decanone	31,864					0,14								
2-coumaranone	44,774											1,258	1,024	0,118
2-undecanone	48,616	0,133	0,561	0,672	1,06	1,202	0,697	0,233	0,422	0,932	0,271		0,089	
4-methyl-2-heptanone	51,764				0,038									
Εστέρες														
Ethylacetate	2,384							11,194						
Αιθέρες														
ethoxy-ethene	2,127			1,666										
dimethyl disulfide	4,094					14,898	3,226		1,511	1,268	2,48			
n-butyl ether / isobutyl ether	9,971											1,499		2,477
dimethyl trisulfide	16,44	0,084	0,312	0,281	0,283	0,721	2,066	1,025	0,576	0,555	0,831		0,123	
Οξέα														
propyl-propanedioic acid	2,561			8,145								15,112		12,347
ethylester 2-methyl-propanoic acid	4,487			0,299										0,423
2-methyl-propanoic acid	5,017			0,513			2,148							0,841

1,2,3-propanetriylester-2,2dimethyl-pentanoic acid	5,036		0,125											
2-methyl-propanoic acid	5,053			0,228										
ethylester butanoic acid	5,836	0,256	0,431	1,246										
butanoic acid	6,025			0,363										
ethylester 2-methyl-butanoic acid	8,106	0,445	0,19	0,273									0,077	
ethylester 3-methyl-butanoic acid / 3-methyl-pentanoic acid	8,298	0,187	0,204	0,314									0,094	
3-methyl-butanoic acid	9,109			0,189									0,999	0,137
hexanoic acid / 2-methyl-hexanoic acid	9,296			0,495			1,776							0,112
2-methyl-butanoic acid	10,279	1,361	0,878	9,468			14,683	3,491	2,515			3,502	6,004	1,902
1-methylethyl-3-methyl-butanoic acid	10,877													0,129
Υδρογονάνθρακες														
3-methyl-1,4-heptadiene	6,37												0,392	
ethylbenzene	8,438	0,12	0,278	0,383			0,382							
bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene / styrene	10,183	0,103	0,205				1,993	3,392				4,525		9,679
a-methylstyrene	18,835											0,821		1,487
4-isothiocyanato-1-butene	19,364			0,139										
1,2,3-trimethyl-benzene / 1,2,4-trimethyl-benzene	19,862	0,123	0,264	0,175	0,287			0,423	0,111	0,33			0,056	0,041
Ocimene	20,336					1,98								
(1S)-6,6-dimethyl-2-methylene-bicyclo(3.1.1)heptane	21,993													1,301
1,1'-(methylenebis(oxy))bis-butane / 1,1'-(methylenebis(oxy))bis-propane	30,197											0,133	0,099	0,121
tert-butyl-benzene	30,955									0,11				
1,2-dihydro-naphthalene	31,075						0,297	0,37						
1-ethenyl-4-methoxy-benzene	31,226						0,226				0,056			
Azulene	32,606					0,14					0,652	1,169		
2,3,6,7-tetramethyl-octane	32,972						0,194							
5-Iodo-nonane	33,6						0,32							
2,4,6-trimethyl-decane	34,207						0,187							
3-propoxy-1-propene	34,527				0,157									
5-cyclohexyl-undecane	37,687											0,115		
2,3,5-trimethyl-decane / 5-ethylidodecane	39,273					0,217	0,253							
1-methylene-1H-indene/naphthalene	40,955	0,279	0,493	0,409	0,662		0,275	0,208	0,373					0,828
N,N-diethyl-1,4-benzenediamine	42,288											0,168		
dodecane / 2,4-dimethyl-hexane / 2,6,10-trimethyl-dodecane	43,153	0,129	0,224	0,163	0,049		0,054	0,103	0,116	0,271	0,091			
2-methoxy-4-methyl-1-(1-methylethyl)-benzene	45,16				0,214							0,023		
2,3-dihydro-4,7-dimethyl-1H-indene	45,887											0,603		0,473
pentamethyl-benzene	47,275											1,143		0,862
tridecane / 1-methyl-naphthalene	48,848	0,15	0,229	0,23	0,195								0,05	0,012
2,7-dimethyl-naphthalene	53,09											0,138		
tetradecane / 3,3-dimethyl-hexane	53,299	0,139	0,132	0,119	0,068			0,376	0,692	1,181				

1,8-dimethyl-naphthalene	53,405				0,008							0,212		0,053
1,8-dimethyl-naphthalene	53,83											0,047		0,117
pentadecane / 2-methyl-undecane / 6-ethyl-2-methyl-decane	55,739			0,019	0,129			0,114	0,298					
Ετεροκυκλικές														
Pyrrrole	4,417											0,134	0,432	0,294
Furfural	7,248				0,129									
tetramethyl-pyrazine	27,166						1,695							
Μη ταυτοποιημένες (πιθανές ενώσεις)														
2-methyl-butanal / butanedial / 2-methylpropylester formic acid	2,809	0,27	0,513	0,469		0,467	0,711	0,517	0,182	0,358		0,521		
2,3-pentanedione / hexane / 2-methyl-3-pentanone	3,151				2,228		2,014	1,027		1,271	1,07			
methyl-2-O-benzyl-D-arabinofuranoside / 2-methyl-1,5-hexadien-3-yne	4,602				0,952					1,127	0,778			
6-deoxy-1-mannose / 2-methyl-propanoic acid / DL-arabinose / N-(cyanomethyl)formamide	5,484		0,142	1,432				0,216				0,345		
4-hydroxy-3-hexanone / (2,3,3-trimethyloxiranyl)methanol	5,759				1,139					0,381				
(1-methylethyl)-benzene / 1-ethyl-4-methyl-benzene / 1-methyl-4-[(2-propenyloxy)methyl]-benzene / benzoate thiophene-2-ol	16,208	0,06	0,115	0,089	0,274				0,207	0,21	0,136		0,072	
1,2,4-trimethyl-benzene / acetophenone / 1,3,5-trimethyl-benzene	17,051		0,051		0,054				0,087	0,366	0,044			0,033
lilac aldehyde C / cis-1-methyl-9-oxalocyclo[6.1.0]nonane / 2-decyn-1-ol / (E)-7,11-dimethyl-3-methylene-1,6,10-dodecatriene	20,453		0,074	0,083								0,165		0,135
2-methoxy-1,3,5-trimethyl-benzene / (1R)-7,7-dimethyl-4-methylene-bicyclo[4.1.0]heptan-3-one	27,964								0,062	0,055	0,041			
3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol / 3,7-dimethyl-1,6-octadien / o-diecycl-hydroxylamine	28,185						0,392		0,691	0,49	0,606			
3-O-acetyl-exo-1,2,0-ethylidene-a-D-erythrofurranose / decamethyl-cyclopentasiloxane	32,26						0,2				0,056		0,13	
1,2,3,5-tetramethyl-benzene / 1,2,4,5-tetramethyl-benzene / 2-isopropylidene-5-methylhex-4-enal	36,207	0,053	0,087						0,061			0,118		
4-ethyl-1,2-dimethyl-benzene / 2,3-dihydro-4-methyl-1H-indene / 1-methyl-4-(2-propenyl)-benzene / 2,6-dimethyl-2,4,6-octatriene	37,718	0,047	0,112	0,102	0,081									0,014
4-ethyl-1,2-dimethyl-benzene / 2,3-dihydro-5-methyl-1H-indene / 1-methyl-indan	38,594	0,054	0,115	0,075	0,04									
1,2,3,4-tetrahydro-naphthalene / 2-phenylethylester-2,2-dimethyl-propanoic acid	39,429	0,036	0,071		0,018									
3-methylheptylacetate / 2-ethylhexylester acetic acid	39,943	0,066	0,145	0,069			0,313							
1-ethylidene-1H-indene / 1-methyl-naphthalene / 2-methyl-naphthalene	47,844	0,151	0,248	0,208	0,043		0,106			0,111	0,08	3,852		2,372

Λοιπές														
3-methyl-furan / 2- methyl-furan	2,415				1,178	4,94	15,053		1,313	2,13	0,918			
Digitoxose	3,11		0,129											
acetyl valenyl	7,35					0,13					0,096			
methyl salicylate	33,607						0,06		0,125	0,095	0,178		0,122	0,046
Estragole	42,738	0,98	1,224	0,517			0,046							

*R.T.: Retention time

Πίνακας 2. Πτητικές ενώσεις που εντοπίστηκαν μόνο στον υγιή γόνο.

όνομα/percentage	R.T.	Υγιής γόνος 1	Υγιής γόνος 2	Υγιής γόνος 3	Υγιής γόνος 4	Υγιής γόνος 5	Υγιής γόνος 6	Υγιής γόνος 7
N-tert-butylethylamine	2,207						1,008	
beriserazide	2,367							0,493
S-methyl3-methylbutanethioate	14,455				0,227			
β-mycene / β-pinene	20,459	0,021	0,031	0,049	0,025	0,02		0,056
1-[2,4-bis(trimethylsiloxy) phenyl]-2-[(4-trimethylsiloxy) phenyl]propan-1-one/ octamethyl-cyclotetrasiloxane	23,01			0,015		0,026		
3-carene	28,869			0,175				
1,2-cyclononadiene	39,071							0,049

Πίνακας 3. Πτητικές ενώσεις που εντοπίστηκαν στον προσβεβλημένο και υγιή γόνο

όνομα/ percentage	R.T.*	Δείγμα AFB 1 (15 broods)	Δείγμα AFB 2 (20 broods)	Δείγμα AFB 3 (25 broods)	Δείγμα AFB 4	Δείγμα AFB 5	Δείγμα AFB 6	Δείγμα AFB 7	Δείγμα AFB 8	Δείγμα AFB 9	Δείγμα AFB 10	Δείγμα AFB 11	Δείγμα AFB 12	Δείγμα AFB 13	Υγιής γόνος 1	Υγιής γόνος 2	Υγιής γόνος 3	Υγιής γόνος 4	Υγιής γόνος 5	Υγιής γόνος 6	Υγιής γόνος 7
Αλδεΐδες																					
Αλκοόλες																					
1-pentanol / 3-methyl-1-butanol	3,913	11,931	19,556	35,811		5,125	5,796	13,637				1,377		3,449			0,089				
Κετόνες																					
Acetone	1,923	70,21	41,627	5,74	0,927	3,92	3,28	14,81	10,311	8,083	4,498	1,125	0,763	1,277	48,848	51,996	33,75	51,493	48,721	37,555	7,694
2-nonanone / 3-propoxy-1-propanone	34,502	0,311	0,549	0,384		0,618	0,424	1,242	0,351	0,465	0,436	0,259	0,33	0,078				0,019	0,127	0,624	0,012
Εστέρες																					
Αιθέρες																					
Οξέα																					
hydrazide benzoic acid / methyl ester benzoic acid	34,049				0,109				0,212	0,111	0,086	0,188	0,208	0,837	0,07	0,09	0,085	0,069	0,072	0,135	0,031
Υδρογονάνθρακες																					
Octane	5,66	0,678	0,855	2,005		1,119	1,11		0,533	0,533	0,783	2,581	3,659	3,697	0,27	0,306	0,464	0,46	1,068	1,12	0,399
o-xylene / 1,3-dimethylbenzene / p-xylene	8,882	0,451	1,265	0,845	0,068	0,658	3,511	5,403		1,573	0,461	1,414			0,118	0,093	0,068	0,07	0,068	0,139	
p-xylene / 1,3-dimethylbenzene / o-xylene	10,299	0,279	0,53		0,324	1,774	4,795	2,599	0,291	0,298	0,272				0,066	0,052	0,048	0,06	0,049	0,173	0,049
Nonane	11,005	0,125	0,245		0,255	1,452	1,327	0,58	1,006	0,327	0,609	3,246	4,49	5,088	0,08	0,157	0,438	0,18	0,698	0,502	0,427
Decane	21,562									0,209	0,13	0,945	0,039	0,092					0,013		
a-pinene / 1R-a-pinene / 1,3,3-trimethyltricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane / (±)-2,6,6-trimethylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene / 1S-a-pinene / dihydroderiv4-methyl-1-(1-methylethyl)bicyclo[3.1.0]hexane	13,423	0,144	0,591	0,547	1,74	1,963	1,053	0,448	1,321	1,732	1,082	2,331	0,704	1,647	0,121	0,41	0,335	0,05	0,097		0,141
4-methyl-1-[1-methylethyl]bicyclo[3.1.0]hex-2-ene / 1,2-diethenyl-3,4-dimethylcyclobutane / β-pinene	17,45		0,036		0,667	0,235	0,132		0,066		0,067	0,078	0,055	0,139		0,017					

(E)-3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene / 1S-a-pinene	26,547	0,638	2,54	2,766	9,986	6,079	2,732	0,703	6,786	9,557	8,892	2,262	5,235	1,545	0,246	0,336	0,473	0,279	0,267	1,1	0,694
(Z)-3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene / 3,7-dimethyl-1,3,7-octatriene	27,966	3,07	12,214	13,812	52,324	33,371	14,018	3,573	50,156	55,609	64,229	34,555	26,451	28,266	49,072	45,33	61,915	45,219	27,971	52,652	87,746
undecane / 3,5-dimethyl-octane	35,142	0,048	0,085	0,21	0,132			0,176			0,096	1,038	0,402	0,532			0,032	0,01	0,066		0,04
Ετεροκυκλικές																					
Μη ταυτοποιημένες (πιθανές ενώσεις)																					
2-isothiocyanato-butene / tolycaine / (±)-2-amino-4-methyl-1-pentanol	2,236				0,994	1,216			0,654	0,29	0,496										0,153
3-methoxy-propanal / 2-methylpropylester formic acid / 1-amino-2-propanol	2,827												0,596	0,267						0,219	
amyl nitrite / 2-methyl-3-pentanone / heptane	3,204		0,175	0,652		1,763			1,195			1,244	2,463	1,937		0,077	0,151		0,254	0,447	0,302
3-isopropoxyalarine / 3-methyl-thietane / 1,2-dimethoxy-ether / 3-hydroxy-2-butanone / ethylester propanoic acid / 5-(methylamino)-1,5,3,4-thiaziazole / methyl-diethanolamine	3,425		0,145	0,578		1,083	1,08	0,38	2,063				4,778	5,195			0,053	0,935	0,533	2,497	0,898
3-methyl-3-buten-1-ol / 2,2-dimethyl-oxetane	3,845				7,284	1,745	0,605	0,816	1,663	3,043	2,796	0,949				0,05	0,067	0,073	0,156	0,94	0,186
1-methyl-1H-pyrrole / 2-methyl-2-(1-methylethyl)-oxirane / cis-4-methyl-cyclohexanol / 4-methyl-5-hexen-2-ol	4,026											2,684		4,595		0,089		0,223	0,38	0,994	
toluene / 2-propenylidene-cyclobutene / 2-methyl-1,5-hexadien-3-yne	4,633	2,571	5,156	3,283		6,486	18,973	9,37	1,979			0,291	0,242	0,202	0,907	0,824	1,722	0,52	0,596	0,341	0,596
octanal / 3-carene	22,14	0,178	0,404	0,73	1,452		1,639	0,473	2,91	0,522	0,403	1,45	6,526	0,034					0,035		

1-methyl-4-(1-methylethyl)-benzene / 1-(4-methylphenyl)-ethanone / 1-ethyl-2,4-dimethyl-benzene / tert-butyl-benzene	24,006			0,038	0,051									0,034			0,026			
D-limonene / trans-1,2-bis(1-methylethenyl)-cyclobutane / limonene / acetate-1-methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexanol / (S)-1-methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexene	24,447	0,119	0,215	0,298	0,434	0,501	0,836	1,46	0,375	0,553	0,434	0,54	0,166	0,272	0,108	0,111	0,2	0,06	0,109	
4-(1-methylethyl)-benzenemethanol / 4-acetoxy-3-methoxystyrene / methylcarbonate3-methyl-5-(1-methylethyl)-phenol	34,794			0,041	0,071								0,023							0,011
nonanal / 2-nonen-1-ol	35,613	0,944	1,724	1,204	5,151	1,948	2,726	1,535	3,821	2,006	2,022	1,36	7,201	1,317	0,049	0,03	0,026	0,027	0,076	0,024
Λοιπές																				

Πίνακας 4. Βαθμός προσβολής και συγκεντρώσεις από τα δείγματα αγρού

Ημερομηνία	Κυψέλη 17				Κυψέλη 8				Κυψέλη 9			
	βαθμός προσβολής	dimethyl disulfide	dimethyl trisulfide	2-undecanone	βαθμός προσβολής	dimethyl disulfide	dimethyl trisulfide	2-undecanone	βαθμός προσβολής	dimethyl disulfide	dimethyl trisulfide	2-undecanone
20/8/2014	0				0				0			
27/8/2014	0				0				0			
3/9/2014	1,7				4,52	0,27		1,07	13,15	1,50		0,91
10/9/2014	2,5				9,63	17188,09	10,88	11,88	17,95	695,39	1,44	6,34
18/9/2014	0				5,88	4,65			0			
25/9/2014	14,09			0,66	30,61	1,74		1,60	0			
3/10/2014	31,67			4,36	16,67	0,61		1,55	16,24	0,05	0,02	13,68
10/10/2014	29,03	5,98	0,06	35,48	10,66	3,43	0,20	0,13	15,075	0,33	0,06	3,67

Πίνακας 5. Δεδομένα από την παρακολούθηση της πορείας της κυψέλης κατά τη διάρκεια της επιμόλυνση.

Ημερομηνία	Κυψέλη 17			Κυψέλη 8			Κυψέλη 9			Υψηλότερη Θερμοκρασία ημέρας °C
	Πληθυσμός	Γόνος	Τροφές	Πληθυσμός	Γόνος	Τροφές	Πληθυσμός	Γόνος	Τροφές	
20/8/2014	9,5	5	5	8,5	4	6	8,5	3,5	6,5	31,10
27/8/2014	9,5	5	3	8,5	4	4	8,5	3,5	4,5	32,10
3/9/2014	10	5	3,5	7,5	4	3	9	3	5	27,10
10/9/2014	10	4	2,5	8	4	2,5	8,5	3	5	28,70
18/9/2014	10	4,5	2	5,5	4,5	1,5	8	4	3,5	22,30
25/9/2014	9,5	6	3	6,5	4	2	9,5	4	4	23,60
3/10/2014	9	6	1	6	4	1	8	5	2	21,30
10/10/2014	8,5	4,5	1,5	5	4	1	7,5	6	2	23,10
11/11/2014	3	0,5	0,5	4	0,5	1	2	0,5	1,5	15,80

