
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. LXII (2)

SECTIO DD

2007

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych
Akademii Rolniczej w Lublinie
ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin,
e-mail: marek.chmielewski@ar.lublin.pl

KATARZYNA OLEŚ-BIZOŃ, MARIA TERESA ZOŃ

**Wpływ immunostymulatorów naturalnych
na odporność hemocytarną zimujących pszczół robotnic,
Apis mellifera L. (Apidae)**

The influence of immunestimulators of natural origin on haemocytic response
of wintering worker honey bees, *Apis mellifera* L. (Apidae)

Streszczenie. Chitozan i wyciąg z jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*), substancje pochodzenia naturalnego, są dobrymi stymulatorami odpowiedzi hemocytarnej u zimujących robotnic pszczoły miodnej. Zimujące rodziny podkarmiono jednorazowo 5 l syropu cukrowego z dodatkiem 5 mg chitozanu/l lub 5 mg wyciągu jeżówki/l. Wartość indeksu fagocytarnego w całym okresie badań w kontroli wahała się od 1,1 do 1,3 \pm 0,3 komórek bakteryjnych/hemocyt, u pszczół eksponowanych na chitozan od 1,5 \pm 0,1 do 3,5 \pm 0,2, a u pszczół eksponowanych na wyciąg jeżówki od 1,3 \pm 0,6 do 3,1 \pm 0,5 komórek bakteryjnych/hemocyt. Wartość indeksu fagocytarnego wzrosła statystycznie istotnie ($p < 0,05$) w okresie od 17 listopada do 2 lutego 2003 r. (grupa A, okres 1–6) w porównaniu z grupą B (17 luty – 15 marca 2004) i grupy C (29 marca, okres 10).

Słowa kluczowe: pszczoła miodna, zimowanie, indeks fagocytarny, chitozan, wyciąg z jeżówki

WSTĘP

Stres, skażenie środowiska, zakażenie, inwazja pasożytów i drapieżców, oddziałujące na owady we wszystkich stadiach ich rozwoju osobniczego, wykształciły struktury i efektywne mechanizmy umożliwiające przywrócenie zaburzonej homeostazy ustroju. Wśród tych mechanizmów istotną rolę odgrywa odporność przeciwważna, która broni organizm przed kolonizacją przez drobnoustroje i pasożyty [Dunn 1986, Gliński i Kostro 2001]. W odporności przeciwważnej decydujące znaczenie mają mechanizmy obronne, zarówno wrodzone jak i nabyte, likwidujące patogeny lub powodujące ich izolację w zakażonym organizmie.

Na odporność pszczoły miodnej supresyjnie wpływa skażenie środowiska, niektóre chemioterapeutyki [Grzegorzczak 1995, Gliński i Grzegorzczak 1995, Gliński i in. 2003] inwazje pasożytnicze, szczególnie *Varroa destructor* [Gliński i Kauko 2000, Gliński i Jarosz 2001]. Skutkiem tego jest rozwój posocznicy bakteryjnych, będących przyczyną masowego padania pszczół. Zakażenia wywołane przez *Pseudomonas apisepticus* [Papadopoulou-Karabela i in. 1992], *Hafnia alvei* i *Enterococcus faecalis* [Kauko i Gliński 1994, Kauko i in. 1996] rozwijają się u pszczół poddanych działaniu silnego stresu, w zatruciach chemicznych i w inwazjach pasożytów.

W celu zmniejszenia podatności na infekcje, podejmuje się próby sterowania odpornością przeciwwzakaźną z użyciem immunostymulatorów syntetycznych i pochodzenia naturalnego [Gliński i Wolski 1996, Oleś-Bizoń 2006]. Działaniem immunostymulującym cechują się niektóre substancje pochodzenia naturalnego (chitozan, wyciąg z jeżówki purpurowej) i substancje chemiczne (klotrimazol, lewamizol) [Buczek 1998, Gliński i Chmielewski 1996a, b, Gliński i in. 2000, 2001, Gliński 2001].

Jednym z czynników stresogennych są warunki hodowli oraz zmiany zachodzące w biologii rodziny związane z porą roku. Nasilenie odporności przeciwwzakaźnej pszczół robotnic w okresie zimowania jest mniejsze niż przed i po zimowaniu [Pliszczyński i in. 2006].

Celem badań była stymulacja odporności robotnic zimujących rodzin przy użyciu dwóch preparatów pochodzenia naturalnego: chitozanu oraz wyciągu z jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*), oceniona wielkością indeksu fagocytarnego.

MATERIAŁ I METODY

Wpływ chitozanu i wyciągu z jeżówki purpurowej badano na robotnicach pszczoły miodnej *Apis mellifera L.* pochodzących z zimującej pasieki. Każdy z preparatów badano w 10 rodzinach; 10 rodzin nieeksponowanych na immunomodulator stanowiło kontrolę. Próbkę pszczół robotnic, liczące od 50 do 100 osobników/ μ l, pobierano do badań w odstępach 2-tygodniowych w 2003 i 2004 r. w terminach podanych w tabeli 1.

Tabela 1. Okresy pobierania próbek pszczół robotnic do badań z zimujących rodzin
Table 1. Periods and data of sampling

	Okres badania/Sampling period									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Data	17.11.	01.12.	17.12.	06.01.	19.01.	02.02.	17.02.	01.03.	15.03.	29.03
Data	03	03.	03	04	04	04	04	04	04	04

Okres zimowania

Wintering

W rodzinie zimującej zastosowano: Chitosal Apis Liquid (Vet-Agro Sp.z o.o. Lublin) o zawartości 4 mg substancji czynnej/ml, w którym substancją czynną jest chitozan – pochodna chityny, złożona z 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukozy (GlcNAc) i 2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranozy w 1% roztworze kwasu salicylowego – oraz wyciąg z jeżówki purpurowej (Extractum Echinaceae aqua siccum, Phytopharm).

Preparaty stosowano jako dodatek do ostudzonego syropu cukrowego (1:1), którym dokarmiono pszczoły w pierwszej dekadzie sierpnia i września, jednorazowo w dawce 5 mg substancji czynnej/ml. W 10 rodzinach zastosowano chitozan (grupa C), w 10 wyciąg z jeżówki purpurowej (grupa E), a 10 rodzin dokarmianych na zimę tylko syropem stanowiło grupę kontrolną (grupa K).

Wartość indeksu fagocytarnego i działanie ochronne oznaczono w grupach liczących około 100 robotnic z 10 rodzin, dla każdego preparatu, po 24-godzinnej aklimatyzacji.

W trakcie badań pszczoły utrzymywano w klateczkach w temperaturze 29°C i wilgotności względnej 85% i karmiono ciastem miodowo-cukrowym [Wiesner i in. 1998]. Hemolimfę pobierano z zatoki grzbietowej do probówek Eppendorfa na łaźni lodowej, co zapobiegało melanizacji hemolimfy.

Wyniki poddano analizie statystycznej (test χ^2 przy $p \leq 0,05$) wartość odchylenia standardowego obliczono wg programu Microsoft Excel 7.0 a.

Hemolimfę pobraną w ilości 10 μ l z zatoki grzbietowej do silikonowanych probówek po aklimatyzacji lub po 48 i 72 godzinach po indukcji bakteryjnej mieszano z taką samą ilością 18-godzinnej zawiesiny hodowli bulionowej *E. coli* D31 (pH 7,2, inkubacja 32°C). Mieszaninę inkubowano przez 30 min. w temperaturze pokojowej, delikatnie wstrząsając co 10 minut. Z każdej próbki wykonano na odfuszczonych szkiełkach pięć rozmazów krwi, które po wybarwieniu odczynnikami oglądano pod immersją w mikroskopie świetlnym o powiększeniu 1250 razy. W preparatach z rozmazu hemolimfy liczono komórki bakteryjne pochłonięte przez 50 fagocytów. Z tych danych obliczono średnia liczbę bakterii sfagocytowanych przez jeden hemocyt robotnicy pszczoły miodnej. W wynikach podano wartości średnie i odchylenia standardowe dla danego okresu badania i dla badanego preparatu.

WYNIKI

Średnie wartości indeksu fagocytarnego u zimujących robotnic pszczoły miodnej w okresie zimowania zależały od eksponowania na chitozan lub na wyciąg z jeżówki.

Tabela 2. Wartość indeksu fagocytarnego (komórki bakteryjne/hemocyt; $x \pm SD$) u zimujących robotnic *Apis mellifera* L. eksponowanych na chitozan i wyciąg z jeżówki
Table 2. Phagocytic index (bacteria cells/haemocyte; $x \pm SD$) in wintering worker bees, *Apis mellifera* L., exposed to chitosan and Echinaceae extract

Preparat Preparation	Okres badania/Sampling period									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Chitozan (c) Chitosan	3,2 $\pm 0,3$	3,3 $\pm 0,4$	3,5 $\pm 0,2$	3,2 $\pm 0,5$	3,3 $\pm 0,2$	2,4 $\pm 0,2$	1,9 $\pm 0,3$	1,6 $\pm 0,5$	1,4 $\pm 0,1$	1,5 $\pm 0,1$
Wyciąg jeżówki Echinaceae extract (e)	3,0 $\pm 0,1$	2,9 $\pm 0,4$	3,0 $\pm 0,2$	3,1 $\pm 0,5$	3,0 $\pm 0,1$	2,4 $\pm 0,1$	2,0 $\pm 0,5$	1,6 $\pm 0,2$	1,4 $\pm 0,1$	1,3 $\pm 0,6$
Kontrola (k) Control	1,0 $\pm 0,0$	1,1 $\pm 0,2$	1,1 $\pm 0,1$	1,2 $\pm 0,2$	1,3 $\pm 0,3$	1,1 $\pm 0,2$	1,3 $\pm 0,2$	1,1 $\pm 0,1$	1,2 $\pm 0,2$	1,2 $\pm 0,2$

Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) pomiędzy grupą C, E a K w okresie 1–6.

Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) pomiędzy C, E w okresie 1–6 w porównaniu z okresami 7–9 i 10/Differences statistically significant ($p \leq 0,05$) between group C, E and K in the period 1–6.

Differences statistically significant ($p \leq 0,05$) between group C, E in the period 1–6 versus period 7–9 and 10.

W kontroli wahały się od $1,0 \pm 0,0$ do $1,3 \pm 0,3$ komórek bakteryjnych/hemocyt, podczas gdy u pszczoł eksponowanych na chitozan od $1,5 \pm 0,1$ do $3,5 \pm 0,2$, a u eksponowanych na wyciąg z jeżówki od $1,3 \pm 0,6$ do $3,1 \pm 0,5$ (tab. 2, rys. 1).

Różnice statystycznie istotne ($p \leq 0,05$) występowały pomiędzy wartościami indeksu fagocytarnego u pszczoł eksponowanych na badane preparaty i grupy kontrolnej. Średnie wartości indeksu fagocytarnego obliczone dla okresu 1–6 (grupa A), okresu 7–9 (grupa B) i okresu 10 (grupa C, zakończenie zimowania) różniły się w sposób istotny. W każdym przypadku najwyższe wartości notowano u pszczoł eksponowanych na badane preparaty w okresie 1–6 (grupa A), tj. od 17 listopada 2004 do 2 lutego 2005 r. (rys. 2).

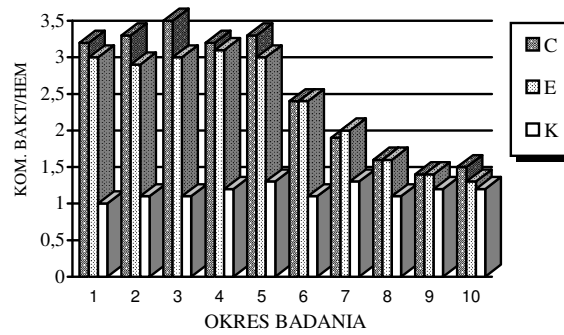
Wyraźne obniżenie wartości średniej indeksu fagocytarnego wystąpiło od 5 okresu badania, było ono statystycznie istotne w okresach 7–9 w odniesieniu do okresów 1–6 u pszczoł eksponowanych zarówno na chitozan, jak i na wyciąg z jeżówki. W okresie 10 obserwacji zarówno wartości indeksu fagocytarnego w grupach doświadczalnych, jak i w kontroli nie różniły się istotnie. Wynosiły dla chitozanu $1,5 \pm 0,1$, dla wyciągu z jeżówki $1,3 \pm 0,6$ i dla grupy kontrolnej $1,2 \pm 0,2$ komórek bakteryjnych/hemocyt (tab. 1).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Spośród całej gamy znanych i powszechnie stosowanych stymulatorów i modulatorów odporności wykorzystywanych u człowieka i zwierząt gospodarskich, tylko nieliczne wykorzystano w badaniach u pszczoły miodnej. Dotychczas badano furanokumaryny roślinnego pochodzenia i wyciągi z jeżówki [Chelmiński 2007], zaś spośród syntetycznych związków o charakterze immunostymulatorów – lewamizol, klotrimazol i pochodne imidazolu [Gliński i Chmielewski 1996a, b, 2001], a z preparatów zwierzęcego pochodzenia – chitozan [Gliński i in. 2000]. Wszystkie badania nad immunostymulatorami dotyczyły przede wszystkim możliwości ich aplikacji w profilaktyce chorób zakaźnych i pasożytniczych pszczoły miodnej. Wynikało to z zapotrzebowania pszczelarzy oraz z małej liczby ośrodków naukowych prowadzących tego typu badania na świecie. Immunostymulatory próbowano też wykorzystać do zmniejszenia niepożądanych skutków stosowania warroacydów w zwalczaniu inwazji *Varroa destructor* [Grzegorzczak 1966, Sokół 2003].

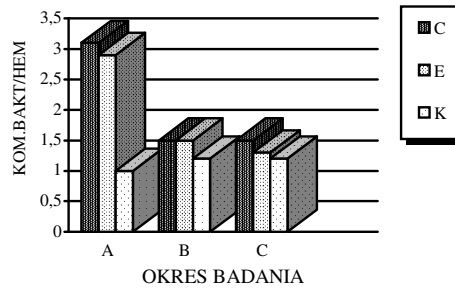
Wcześniejsze badania wykazały, że środki potęgujące lub korygujące reaktywność immunologiczną owadów działają w sposób specyficzny lub niespecyficzny na układ odpornościowy owada, wzmagając w konsekwencji komórkowe i/lub humoralne odczyny obronne. Zwiększenie fagocytozy uzyskano poprzez aktywację układu oksydazy polifenolowej przy użyciu laminaryny [Gliński i Jarosz 1995]. Wyciąg z arcydzięgla lekarskiego (*Archangelica officinalis* Hoffm.) stymulował w warunkach eksperymentalnych zarówno naturalną, jak i indukowaną odpowiedź komórkową i humoralną pszczoły [Gliński i Wolski 1996]. Klotrimazol zwiększał wartość indeksu fagocytarnego oraz aktywność bakteriolityczną typu lizozymu w hemolimfie [Gliński i Chmielewski 1996a, b]. Apiwarol AS i Fluwarol aktywowały komórkowe odczyny obronne i zwiększały nasilenie naturalnej i indukowanej odporności humoralnej owada [Grzegorzczak 1996]. Sokół [2003] obserwował u robotnic z rodzin, w których stosowano lewamizol wzrost odsetka immunocytów w hemolimfie, poziomu białka całkowitego i lipidów. Chitozan wywiera działanie immunostymulujące u robotnic *Bombus terrestris* oraz u pszczoły miodnej [Gliński i in. 2000, 2001, 2003, Swoboda-Danilkiewicz 2003].

Badania nad immunostymulatorami, w których całe rodziny są ekspozowane na ich działanie mają charakter badań klinicznych. Dotyczy to również zimujących rodzin ekspozowanych na działanie chitozanu i wyciągu z jeżówki purpurowej. Badanie wpływu tych preparatów na robotnice pochodzące z rodzin ekspozowanych na ich działanie, a następnie zakażonych przez bakterie symuluje sytuacje spotykane w rodzinach zakażonych drogą naturalną.



Rys. 1. Wartości indeksu fagocytarnego u zimujących pszczół robotnic ekspozowanych na Chitozan (C) i wyciąg z jeżówki (E); kontrola (K)

Fig. 1. Phagocytic index in wintering worker bees exposed to chitosan (C) and Echinacea extract (E); control (K)



Rys. 2. Wartości indeksu fagocytarnego u zimujących pszczół robotnic ekspozowanych na chitozan (C), wyciąg z jeżówki (E); K – kontrola, A – okres badania 1–6, B – okres badania 7–9, C – okres badania 10

Fig. 2. Phagocytic index in wintering worker bees exposed to chitosan (C) and Echinacea extract (E); control (K); A – period 1–6, B – period 7–9, C – period 10

Zarówno chitozan, jak i wyciąg z jeżówki cechowały się działaniem immunostymulującym, a także immunomodulującym na odporność hemocytarną zimujących robotnic z rodzin ekspozowanych na ich działanie. Na silne działanie stymulujące wskazuje wzrost wartości indeksu fagocytarnego (rys. 1). W komórkowych odczynach obronnych uczestniczą immunocyty, a najważniejszym mechanizmem oczyszczania jamy ciała z zarazków

u owadów jest fagocytoza. Uzyskane wyniki odnośnie wpływu chitozanu na wartości indeksu fagocytarnego znajdują potwierdzenie w badaniach Glińskiego i in. [2000]. Chitozan stymulował odporność naturalną pszczół robotnic, zwiększając aktywność fagocytozy.

U zimujących pszczół robotnic z rodzin eksponowanych na wyciąg z jeżówki wzrastały, podobnie jak w przypadku chitozanu, wartości indeksu fagocytarnego (rys. 1). Działanie pobudzające układ odporności naturalnej przez badane preparaty jest efektem aktywacji plazmatocytów i granulocytów do fagocytozy oraz pobudzenia ciała tłuszczowego i hemocytów do produkcji i uwalniania lizozymu do hemolimfy.

Mechanizm pobudzenia hemocytarnych odczynów obronnych owadów przez immunostymulatory nie jest znany. Można tylko przypuszczać, że wpływają one na jedną lub na obydwie znane kaskady przenoszenia sygnałów, Toll i Imd, i w sposób pośredni dochodzi do zwiększonej aktywności immunocytów, czego skutkiem jest wzrost indeksu fagocytarnego [De Gregoire i in. 2002, Zheng i in. 2005]. Zmiany w parametrach charakteryzujących odporność komórkową zachodzące pod wpływem chitozanu i aktywnych biologicznie substancji występujących w wyciągu z jeżówki mogą być też następstwem działania tych preparatów na układ oksydazy polifenolowej bądź bezpośrednio na hemocyty. Układ oksydazy polifenolowej jest zaangażowany w rozpoznawaniu immunologicznym, ułatwia fagocytozę, uczestniczy w melanizacji guzków i otoczek oraz w inkapsulacji melanotycznej [Gliński i Jarosz 1995]. Jego pobudzenie aktywizuje komórkowe odczyny obronne owada. Nie można też wykluczyć bezpośredniego wpływu chitozanu i wyciągu z jeżówki purpurowej na tempo przemian białkowych w immunocytach, a co się z tym wiąże – na zwiększoną ich aktywność w fagocytozie.

Chitozan i wyciąg z jeżówki zwiększając nasilenie odporności naturalnej wykazały typowe właściwości immunostymulatorów. W tym działaniu zachowywały się podobnie.

Zaobserwowano wyraźne różnice w wielkości badanych parametrów odporności u pszczół z rodzin poddanych działaniu chitozanu i wyciągu z jeżówki w zależności od pory zimowania (okres 1–6, 7–9 i 10, rys. 2). Można więc przypuszczać, że występowanie silniejszej odpowiedzi na badane preparaty w czasie od 17 listopada 2 do lutego (okres badań 1–6) było związane z wiekiem pszczół robotnic. Zimowano silne rodziny z młodymi pszczołami. Wraz z upływem czasu wystąpił „syndrom starzenia”, znany z immunologii kręgowców, polegający na osłabieniu odpowiedzi immunologicznej wraz z wiekiem. Względnie niska wartość odpowiedzi w okresie 10 była prawdopodobnie spowodowana jeszcze dużą liczbą starych pszczół, mimo trwającej wymiany na nowe robotnice. Alternatywnym tłumaczeniem jest postępujący wraz z czasem zimowania spadek w pokarmie ilości chitozanu i wyciągu z jeżówki, co znajduje odbicie w mniejszym ich działaniu na układ odpornościowy pszczół.

WNIOSKI

1. Chitozan i wyciąg z jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*) są stymulatorami odporności hemocytarnej u robotnic pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L., w rodzinach eksponowanych na te preparaty w czasie zimowania. Na działanie immunostymulujące wskazuje wzrost wartości indeksu fagocytarnego.

2. Lepsze efekty immunostymulacji występują w pierwszej połowie okresu zimowania pszczół eksponowanych na chitozan lub wyciąg z jeżówki purpurowej.

PIŚMIENNICTWO

- Buczek K. 1998. Badania nad przydatnością Klotrimazolu jako leku w grzybicy otorbielakowej i immunostymulatora pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L. Rozprawa dokt., Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie.
- Chelmiński M. 2007. Badania nad modulacją odporności przeciwbakteryjnej robotnic pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L., przy użyciu immunomodulatorów biologicznych i syntetycznych. Rozprawa dokt., Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie.
- De Gregoire E., Spellman P.T., Tzou P., Rubin G.M., Lemaitre B. 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune responses in *Drosophila*. *EMBO J.* 21, 2568.
- Dunn P.E. 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. Entomol.* 31, 321.
- Gliński Z. 2001. Problemy immunotoksykologii [w:] *Immunologia weterynaryjna. Wybrane zagadnienia.* A.K. Siwicki, W. Deptuła (red.) Wyd. Edycja Olsztyn, 49–53.
- Gliński Z., Buczek K., Luft-Deptuła D., Stark J.A. 2003. Immunotoxic action of heavy metals polluting the environment on the honey bee, *Apis mellifera* L. Final Programme and Book of Abstracts. XXXVIIIth APIMONDIA International Apicultural Conference, Ljubljana, Slovenia, August 24–29, s. 232–233.
- Gliński Z., Chmielewski M. 1996a. Imidazole derivatives in control of the honey bee brood mycoses. *Pszczelnicze Zesz. Nauk.* 40, 165.
- Gliński Z., Chmielewski M. 1996b. Immunomodulujące działanie pochodnych imidazolowych na organizm *Apis mellifera* L. XXXIII Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy 12–13 marca, 26–27.
- Gliński Z., Chmielewski M., Kauko L. 2000. Chitosan a potent natural immunostimulator of insect immune system. The Ist European Scientific Apicultural Conference, Puławy, September 5–8, 74–75.
- Gliński Z., Chmielewski M., Swoboda M. 2001. Immunostymulacja i immunosupresja a występowanie i przebieg grzybicy otorbielakowej czerwia pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L. Materiały XXXVIII Nauk. Konf. Pszczelarskiej, Puławy, 29–30.
- Gliński Z., Chmielewski M., Swoboda-Mazurek M. 2002. Wykorzystanie profilu immunologicznego do oceny efektów immunomodulacyjnych leków stosowanych w leczeniu chorób pszczół. *Mat. XXXIX Naukowej Konferencji Pszczelarskiej, Puławy 12–13 marca*, 52–53.
- Gliński Z., Grzegorzczak K. 1995. Hemolymph proteins of the honeybee (*Apis mellifera* L.) from apiaries differing by the level of pollution with heavy metals. *Ann. UMCS, DD*, 50, 241.
- Gliński Z., Jarosz J. *Immunobiologia pszczoły miodnej.* Wydawnictwo AR, Lublin 1995.
- Gliński Z., Jarosz J. 2001. Infection and immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apiacta* 36, 12.
- Gliński Z., Kauko L. 2000. Problems of immunosuppression and immunotoxicology in respect to the honey bee protection against microbial and parasitic invaders. *Apiacta* 35, 65.
- Gliński Z., Kostro K. 2001. Key stones in insect immunity. *Cent. Eur. J. Immunol.* 26, 43.
- Gliński Z., Wolski T. 1996. Complexes of plant furanocoumarins useful in therapy of chalkbrood disease of the honey bee. *Umbelliferae Improvement Newsletters* 6, 28.
- Grzegorzczak K. 1995. Badania nad działaniem immunomodulującym chemoterapeutyków zalecanych w zwalczaniu warrozy (Apiwarol AS, Fluwarol) i terapii grzybicy otorbielakowej (Klotrimazol) na modelu *Apis mellifera* L. i *Galleria mellonella*. Rozprawa dokt., Wydział Farmacji Akademii Medycznej w Lublinie.
- Kauko L., Gliński Z. 1994. *Hafnia alvei*- bakterin aiheutamma septikemia mehilaisissa. *Suomen Finsk Veterinartidskrift* 5, 314.

- Kauko L., Gliński Z., Buczek K. 1996. *Enterococcus faecalis* – tartunta mehiläisellä. Suomen Eläinlaak. 102, 266.
- Oleś-Bizoń K. 2006. Badania na wpływem chitozanu i wyciągu z jeżówki na wartość indeksu fagocytarnego, aktywność bakteriolityczną lizozymu, poziom apidycyn i działanie ochronne u zimujących pszczoł robotnic (*Apis mellifera* L., *Apidae*). Rozprawa dokt., Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie.
- Papadopoulou-Karabela K., Iliadis N., Liakos V., Burdzy-Hatzopoulou E. 1992. Experimental infection of honeybees by *Pseudomonas aeruginosa*. *Apidologie* 23, 293.
- Pliszczyński M., Luft-Deptuła D., Bizoń K. 2005. Monitorowanie odporności zimujących robotnic pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L (*Apidae*) na podstawie testu działania ochronnego. *Ann. UMCS, sec. DD*, 61, 173.
- Sokół R. 2003. Wpływ lewamizolu na wybrane wskaźniki immunologiczne i biochemiczne hemolimfy robotnic i trutni *Apis mellifera* z rodzin dotkniętych inwazją *Varroa destructor*. *Wyd. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski. Rozprawy i monografie*. 74, Olsztyn.
- Swoboda-Danilkiewicz M. 2003. Badania nad opracowaniem metody stymulacji odporności robotnic *Bombus terrestris* (*Apidae*). *Rozprawa dokt., Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie*.
- Zheng I., Zhang I., Lin H., McIntosh M.T., Malacrida A.R. 2005. Toll-like receptors in invertebrate innate immunity. *ISJ* 2, 105.

Summary. Two substances of natural origin, chitosan and purple coneflower (*Echinacea purpurea*) extract appeared to be potent stimulators of hemocytic response in the worker honey bees in wintering colonies. The wintering bees fed once 5 l of sugar syrup with an addition of 5 mg of chitosan or purple coneflower extract /l. The values of phagocytic index in control bees during the whole period of studies ranged from 1.1 ± 0.0 do 1.3 ± 0.3 bacterial cells/hemocyte, in bees exposed to chitosan the ranged from 1.5 ± 0.1 to 3.5 ± 0.2 bacterial cells/hemocyte and in bees exposed to purple coneflower extract they ranged from 1.3 ± 0.6 to 3.1 ± 0.5 bacterial cells/hemocyte. The value of phagocytic index increased significantly ($p < 0.05$) in the period of 17 November–2 February 2003 (group A, period 1–6) comparing to bees from group B (17 February–15 March, period 7–9) and group C (29 March, period 10, Fig. 2).

Key words: honey bee, wintering, phagocytic index, chitosan, purple coneflower extract