
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. LXI, 21

SECTIO DD

2006

Zakład Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Akademii Rolniczej w Lublinie

MARIUSZ PLISZCZYŃSKI, DOROTA LUFT-DEPTUŁA,
KATARZYNA BIZOŃ

*Monitorowanie odporności zimujących robotnic pszczoły miodnej,
Apis mellifera L. (Apidae), oparte na teście działania ochronnego*

Monitoring of immunity in wintering workers of the honey bee,
Apis mellifera L. (Apidae), by a protection test

STRESZCZENIE

Jednym z najważniejszych celów badań nad zapobieganiem i zwalczaniem chorób wywołanych przez drobnoustroje jest monitoring poziomu odporności naturalnej i nabytej. Wśród różnych testów test działania ochronnego nadaje się do badań w patologii owadów. Grupy nieimmunizowanych robotnic pszczoły miodnej, *Apis mellifera L.*, zimujących (grupa C) w okresie późnej jesieni (grupa A) i wczesnej wiosny (grupa C) oraz pszczoły, którym podano w iniekcji żywe komórki *Escherichia coli* D31 zakażono LD₁₀₀ żywych komórek *Pseudomonas aeruginosa* i oceniono po 96 godz. procent żywych owadów w każdej grupie. Najniższy poziom działania ochronnego stwierdzono u pszczoł zimujących nieindukowanych (5,0±1,4%), indukowanych i zakażonych (71,1±2,4%) oraz tylko poddanych indukcji (82,0±1,8%). U pszczoł z okresu późnej jesieni i wczesnej wiosny wartości testu działania ochronnego były istotnie wyższe i wynosiły odpowiednio: 74,3±2,5, 80,0±1,2, 91,2±0,9, oraz 74,2±1,9, 89,0±2,0, 90,0±1,8%.

Słowa kluczowe: pszczoła miodna, test działania ochronnego

WSTĘP

Bariery anatomiczno-fizjologiczne okrywy ciała, przewodu pokarmowego i środowisko biochemiczne jelita cienkiego owada skutecznie hamują rozwój większości zakażeń [Gliński i Jarosz 2001]. Drobnoustroje, które przedostały się do jamy ciała owada są z reguły eliminowane przez hemocytarne i humoralne odczyny obronne. Humoralny kompleks obronny (defense complex) utworzony przez oligomer profenoloksydazy i czynnik o aktywności interleukiny 1 (IL-1 activity factor) o masie około 20 kDa [Beck i in. 1996] działa przeciwbakteryjnie. Wysoka aktywność lizozymu, będąca efektem jego hipersyntezy w procesie zakażenia, skutecznie niszczy saprofityczne bakterie Gram-dodatnie [Mohrig i Messner 1968, 1968a; Gliński i Jarosz 1994], zaś apidycyny niszczą wiele gatunków bakterii Gram-ujemnych i współdziałają w niszczeniu bakterii w procesie fagocytozy [Casteels i in. 1989, 1990, 1993].

Zaburzenie sprawności układu odpornościowego na skutek działania różnorodnych stresów powoduje wystąpienie chorób, wywołanych nie tylko przez drobnoustroje bezwzględnie chorobotwórcze, ale także przez warunkowo chorobotwórcze. Skutkiem tego działania immunosupresyjnego 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 in. 1994, 1996] rozwijają się u pszczół poddanych działaniu silnego stresu, w zatruciach chemicznych, inwazjach pasożytów. Enzymy proteolityczne produkowane przez bakterie wywołujące posocznicę hamują hemocytarne odczyny obronne i powodują rozkład enzymatyczny białek odpornościowych, które pojawiają się w hemolimfie w następstwie zakażeń. Aflatoksyny wytwarzane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* nie tylko uszkadzają ośrodkowy układ nerwowy pszczoły, ale zaburzają mechanizmy obronne przez bezpośredni wpływ na bariery anatomiczno-fizjologiczne i hemocyty. Wpływają też pośrednio na układ odpornościowy, powodując zaburzenia w systemie endokrynnym owada.

Jednym z czynników stresogennych są warunki hodowli oraz zmiany zachodzące w biologii rodziny w kolejnych porach roku. Stąd też istnieje konieczność oceny nasilenia odporności naturalnej rodziny. Temu celowi służy określenie stopnia działania ochronnego u zimujących pszczół robotnic niezakażonych oraz zakażonych do jamy ciała żywymi komórkami *Escherichia coli* D31.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na robotnicach pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L., pochodzących z pasieki Oddziału Pszczelnictwa Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Puławach. Pszczoły pobierano do badań w odstępach 2-tygodniowych w 2003 i 2004 r. Pszczoły zawiązały kłęb w okresie od 17 listopada 2003 r. do 15 marca 2004 r. (okres zimowania, grupa B). Badania wykonywano każdorazowo na grupie około 200 robotnic po 24-godzinnej aklimatyzacji. W trakcie badań pszczoły utrzymywano w klateczkach w temperaturze 29°C i wilgotności względnej 85%, karmiono je ciastem miodowo-cukrowym. Pszczoły pochodziły z rodzin zdrowych, wolnych od warrozy oraz od zgnilca amerykańskiego i zgnilca europejskiego. W okresie zimowania osyp był normalny.

Nasilenie działania ochronnego oznaczono u owadów niepoddanych stymulacji bakteryjnej (grupa I, II) i u owadów poddanych stymulacji przy użyciu *E. coli* D31 (grupa III, IV) w stosunku do szczepu *Pseudomonas aeruginosa*, produkującego piocyjaninę (szczep H5). Oznaczenia prowadzono: na 2 tygodnie przed zimowaniem (A), w 8. tygodniu zimowania (B), 4 tygodnie po zimowaniu (C). Szczep *P. aeruginosa* wyizolowano od pszczół padłych na posocznicę wywołaną przez ten zarazek. Grupy robotnic (I, III), liczące po 25–30 owadów, zakażano drogą aerozoloną w czasie 0, a wyniki odczytywano w 96 godz. po zakażeniu. Dawka zakaźna wynosiła 5 ml zawiesiny komórek *P. aeruginosa* z 18-godz. hodowli bulionowej w płynie fizjologicznym dla owadów. Odpowiadała ona $2 \cdot 10^3$ jtk /ml płynu fizjologicznego. Ta dawka powodowała padnięcie wszystkich owadów w grupach kontrolnych (grupa I) po 96 godz. po zakażeniu aerozoloną (LD₁₀₀). Grupę kontrolną, liczącą w eksperymencie protekcji 25-30 sztuk robotnic, u których nie indukowano odporności (grupa II) oraz u których indukowano odporność (grupa IV), eksponowano na taką samą objętość płynu dla owadów, niezawierającą komórek *P. aeruginosa*. Owady, u których indukowano odporność (grupa III) zakażono dawką *P. aeruginosa*, co spowodowało padnięcie wszystkich owadów w grupie I. Owady obserwowano przez 4 dni, licząc codziennie padłe osobniki [Gliński i Jarosz 1992]. Działanie ochronne obliczono dla 4. dnia (96 godz.) po zakażeniu dla całej badanej grupy owadów ze wzoru:

$$\text{Protekcja (\%)} = 100 - \text{odsetek śmiertelności}$$

Wszystkie badania powtórzono trzykrotnie, a w wynikach podano wartości średnie z 3 oznaczeń. Celem zobiektywizowania wyniki poddano analizie statystycznej (test χ^2 przy $p < 0,05$) wartość odchylenia standardowego obliczono wg programu Microsoft Excel 7.0 a.

WYNIKI

Działanie ochronne w 96 godz. eksperymentu przedstawia tabela 1. W podgrupach I grup A, B, C, w których nie indukowano odporności, wszystkie owady padły po zakażeniu *P. aeruginosa*. Dawkę zarazka, która spowodowała padnięcie wszystkich pszczoł robotnic w tych grupach zastosowano w dalszym eksperymencie. Ta dawka (LD_{100}) wynosiła $2 \cdot 10^3$ jtk/ml/23–30 pszczoł robotnic przy zakażeniu aerozolowym. W grupie A, B i C najwyższą protekcję notowano u pszczoł robotnic, u których indukowano odporność i które nie zakażano (grupy A IV, B IV i C IV), następnie w grupach pszczoł, u których nie indukowano odporności i niezakażanych (grupy A II, B II i C II). Również wysokie działanie ochronne uzyskano we wszystkich grupach pszczoł przed zimowlą (grupa A IV), w trakcie zimowania (grupa B IV) i po zimowaniu (grupa C IV), w których owady po stymulowaniu odporności zakażono *P. aeruginosa*. Statystycznie znacznie niższe

Tabela 1. Działanie ochronne u pszczoł robotnic *Apis mellifera* L.: grupa A – przed zimowaniem, grupa B – zimowanie, grupa C – po zimowaniu

Table 1. Protection of the worker honey bee, *Apis mellifera* L.: group A – before wintering, group B – wintering, group C – post wintering period

Grupa Group	Podgrupa Subgroup	Indukcja odporności Induction	Zakażenie Infection	Protekcja (%) po 96 h Protection (%) after 96 h
A	I	-	Δ	0
	II	-	-	74,3±2,5
	III	Δ	Δ	80,0±1,2*
	IV	Δ	-	91,2±0,9*
B	I	-	Δ	0
	II	-	-	65,0±1,4ab
	III	Δ	Δ	71,1±2,4 B*
	IV	Δ	-	82,0±1,8 A*
C	I	-	Δ	0
	II	-	-	74,2±1,9
	III	Δ	Δ	89,0±2,0*
	IV	Δ	-	90,0±1,8*

a – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy grupą B i A

b – różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy grupą B i C

* różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) pomiędzy podgrupami III i IV i podgrupą II w danej grupie

a – differences statistically significant ($p < 0,05$) between B and A

b – differences statistically significant ($p < 0,05$) between B and C

* differences statistically significant ($p < 0,05$) between subgroups III and IV and subgroup II for each group

wartości ($p < 0,05$) protekcji występowały w grupie pszczoł zimujących (grupa B) i dotyczyły podgrup II i IV w porównaniu z pszczołami przed zimowlą (grupa A) oraz podgrup II i III w porównaniu z pszczołami po zimowaniu (grupa C). W każdej grupie różnice statystycznie istotne ($p < 0,05$) występowały pomiędzy wartościami działania ochronnego stwierdzonego w podgrupach III i IV w odniesieniu do podgrupy II (tab. 1).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przebieg zimowania w znacznym stopniu decyduje o wiosennym rozwoju rodziny, a w konsekwencji wpływa też na jej wyniki produkcyjne następnym sezonie. Na przebieg zimowania i stan po jego zakończeniu wpływa wiele czynników. Ważne znaczenie odgrywają warunki klimatyczne podczas zimowania i w okresie przejściowym, długość ich trwania, sposób przygotowania rodziny do zimowania, na co duży wpływ ma pszczelarz, ilość, charakter i jakość zapasów, wielkość osypu zimowego. Występowanie chorób w rodzinie zimującej oraz istnienie czynników usposabiających do zachorowania w istotny sposób wpływają zarówno na przebieg zimowania, jak i na stan rodziny po zimowaniu. O predyspozycji do zachorowań na choroby zakaźne w znacznym stopniu decyduje stan odporności rodziny [Stark i Gliński 1996, Gliński i Kostro 2001, Gliński i in. 2004].

W ocenie stanu immunologicznego organizmu są wykorzystywane różnorodne techniki i procedury, określające sprawność głównych komponentów odpowiedzi immunologicznej, układu hemocytarnego oraz składników humoralnych odporności naturalnej [Grzegorzczak 1996, Buczek 1998, Młynarska 1999]. Dużą rolę przypisuje się ocenie działania ochronnego na zakażenie patogenami, które są przyczyną chorób i śmierci określonych gatunków owadów. W badaniach użyto *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowany od pszczoł robotnic padłych na posocznicy. Na przydatność testu protekcji w ocenie odporności wskazują m.in. badania Fiołka [2005]. W badaniach prowadzonych na poczwarkach *Galleria mellonella*, immunizowanych i zakażonych *Pseudomonas aeruginosa*, przeżywalność po 48 godz. wynosiła 65%, zaś u owadów traktowanych silnym immunosupresorem, jakim jest aktynomycyna D, obniżyła się do 15%. Obniżeniu działania ochronnego towarzyszył drastyczny spadek aktywności peptydów przeciwbakteryjnych w hemolimfie.

Niższa protekcja obserwowana u owadów natywnych i jej niewielki wzrost po indukcji bakteryjnej przy użyciu patogennego dla pszczoł szczepu *Pseudomonas aeruginosa* jednoznacznie wskazują na mniejszą sprawność układu odporności przeciwbakteryjnej pszczoł w okresie zimowania w porównaniu z późną jesienią i wczesną wiosną. Jakkolwiek była ona najniższa w porównaniu z protekcją stwierdzaną u pszczoł późną jesienią i wczesną wiosną, to jednak różnice u pszczoł niepoddanych indukcji bakteryjnej nie były bardzo duże. Można przypuszczać, że podczas zimowania obniża się sprawność odpowiedzi przeciwwzakaźnej robotnic. Jednym z czynników, który na to wpływa jest z pewnością starzenie się pszczoł. Wczesną wiosną i późną jesienią w rodzinie dominują młode robotnice, co wiąże się z przygotowaniem pszczoł do zimowania, na wiosnę zaś z wymianą na młode robotnice pszczoł, które zimowały.

WNIOSKI

1. Test działania ochronnego można stosować do oceny stanu odporności naturalnej i indukowanej (nabytej) pszczoły miodnej.
2. Nasilenie odporności przeciwwzakaźnej pszczoł robotnic w okresie zimowania, ocenione na podstawie nasilenia działania ochronnego (protekcji), jest mniejsze w porównaniu z pszczołami robotnicami przed i po zimowaniu.

PIŚMIENNICTWO

- Beck G., Cardinale S., Wang L., Reiner M., Sugumaran M. 1996. Characterization of a defense complex consisting of interleukin 1 and phenol oxidase from the hemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. J. Biol. Chem. 271, 11035.
- Buczek K. 1998. Badania nad przydatnością Klotrimazolu® jako leku w grzybicy otorbielakowej i immunostymulatora pszczoły miodnej. Praca dokt., Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie.
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. 1993. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, and antibacterial peptide that is infection inducible in the honey bee (*Apis mellifera*). J. Biol. Chem. 268, 7044.
- Casteels P.R., Ampe C., Jacob F., Vaeck M., Tempst P. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. EMBO J. 8, 2387.
- Casteels P.R., Ampe C., Riviere L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). Eur. J. Biochem. 187, 381–389.
- Fiołka M. 2005. Lizozymu wybranych gatunków bezkręgowców jako czynniki naturalnej odporności przeciwwakaznej. Dysertacja dokt., Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie.
- Gliński Z., Jarosz J. 1992. Zarys immunologii owadów. Wydawnictwo AR, Lublin.
- Gliński Z., Jarosz J. 1994. Naturalna i nabyta odporność przeciwwakazna pszczoły miodnej. Medycyna Wet. 50, 472.
- Gliński Z., Jarosz J. 2001. Infection and immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. Apiacta 36, 12.
- Gliński Z., Kostro K. 2001. Key stones in insect immunity. Centr. Eur. J. Immunol. 26, 43.
- Gliński Z., Luft-Deptuła D., Stark J.A. 2004. Humoral substances conditioning antibacterial immunity of the bumble bees. Annls. UMCS, sec. DD, 59, 31.
- Grzegorzczak K. 1996. Badania nad działaniem immunomodulującym chemioterapeutyków zalecanych w zwalczaniu warrozy (Apiwarol AS, Fluwarol) i w terapii grzybicy otorbielakowej (Klotrimazol) na modelu *Apis mellifera* i *Galeria mellonella*. Dysertacja dokt., Wydział Farmacji AM w Lublinie.
- Kauko L., Gliński Z. 1994. *Hafnia alvei* – bakterin aiheutamma septikemia mehiläisissa. Suomen Finsk Veterinartidskrift 5, 314.
- Kauko L., Gliński Z., Buczek K. 1996. *Enterococcus faecalis* – tartunta mehiläisellä. Suomen Eläinlaak. 102, 266.
- Młynarska M. 1999. Kształtowanie się profilu immunologicznego robotnic *Bombus terrestris* (Apidae). Dysertacja dokt., Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie.
- Mohrig W., Messner B. 1968. Immunreaktionen bei Insekten. I. Lysozym als grundlegender antibakterieller Faktor im humoralen Abwehrmechanismus der Insekten. Biol. Zentralb. 87, 439.
- Mohrig W., Messner B. 1968a. Immunreaktionen bei Insekten. II. Lysozym als antimikrobielles Agens im Darmtrakt von Insekten. Biol. Zentralbl. 87, 705.
- Papadopoulou-Karabela K., Iliadis N., Liakos V., Burdzy-Hatzopoulou E. 1992. Experimental infection of honeybees by *Pseudomonas aeruginosa*. Apidologie 23, 293.
- Stark J.A., Gliński Z. 1996. Defense strategies of the honeybee (*Apis mellifera* L.) against hostile organisms. Apiacta 31, 6.

SUMMARY

One of the most remarkable and important research objectives in prevention and control of microbial diseases is to monitor the level of natural and induced immune response. Among the different tests, a protection test is suitable for insect pathology. Groups of non immunized worker

bees, *Apis mellifera* L., wintering (group B), late autumn (group A) and early spring (group C) bees and bees injected with live cells of *Escherichia coli* D31 were infected with an LD₁₀₀ dose of viable *Pseudomonas aeruginosa*, and the percent survival in each group was calculated 96 h post challenge. The lowest level of protection was found in wintering non induced (65.0±1.4%), induced and infected (71.1±2.4%) and only induced (82.0±1.8%) bees. In the late autumn bees and in the early spring bees the values of the protection test were significantly higher: 74.3±2.5, 80.0±1.2, 91.2±0.9, and 74.2±1.9, 89.0±2.0, 90.0±1.8, respectively.

Key words: honey bee, protection test