

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt

Stacjonarne Studia Trzeciego Stopnia

Praca doktorska

MACIEJ HOWIS

**Aspekty biologiczne rodziny pszczelej – relacje między
Apis mellifera a *Varroa destructor* przy stosowaniu
zabiegów ograniczających populację pasożyta**

Biological aspects of bee colonies - relations between *Apis mellifera* and *Varroa destructor* when applying treatments to reduce parasite population

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Prof. dr. hab. Piotra Nowakowskiego

w Instytucie Hodowli Zwierząt

Wrocław 2012

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi,
Panu prof. dr hab. Piotrowi Nowakowskiemu za wyrozumiałość
i życzliwą pomoc na wszystkich etapach realizacji pracy doktorskiej*

*Pracę doktorską dedykuję mojej żonie Karolinie oraz synowi
Jakubowi, którzy przez cały okres jej realizacji byli blisko mnie*

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE / SUMMARY	6
2. WSTĘP.	10
3. CEL PRACY	12
4. PRZEGLĄD LITERATURY	13
4.1. Biologia rodziny pszczelej <i>Apis mellifera</i> L.....	13
4.1.1. Rodzina pszczela jako układ eusocjalny.....	13
4.1.2. Anatomia i fizjologia układu pokarmowego.....	16
4.1.3. Budowa histologiczna i zmiany histopatologiczne w jelicie środkowym po stosowaniu kwasów organicznych.....	20
4.2. Roztocz <i>Varroa destructor</i> - pasożyt <i>Apis mellifera</i> L.....	21
4.2.1. Wpływ pasożyta na pszczołę i rodzinę pszczelą.....	22
4.2.2. Dynamika namnażania się roztoczy w rodzinie pszczelej.....	25
4.2.3. Naturalna odporność pszczół na warrozę.....	27
4.2.4. Stosowane leki do ograniczania pasożyta w rodzinach pszczelich.....	28
5. MATERIAŁ I METODY.....	31
5.1. Materiał zwierzęcy i harmonogram wykonywanych badań.....	31
5.2. Szacowanie liczebności pasożyta <i>Varroa destructor</i> w rodzinie pszczelej.....	31
5.3. Badanie mikroklimatu rodziny pszczelej.....	33
5.4. Preparaty histologiczne jelit środkowych pszczół robotnic.....	35
5.4.1. Przygotowanie materiału do badań histologicznych.....	35
5.4.2. Wykonywanie i ocena preparatów histologicznych.....	37
5.5. Badanie aktywności enzymatycznej jelita środkowego pszczół robotnic.....	39
5.6. Opracowanie wyników.....	42
6. WYNIKI.....	43
6.1. Badania rozwoju populacji <i>Varroa destructor</i>	43

6.1.1. Populacja <i>Varroa destructor</i> w rodzinach pszczelich podczas dwóch sezonów od utworzenia odkładów.....	43
6.1.2. Usunięta naturalnie i po zastosowanych lekach podczas jednego sezonu populacja <i>Varroa destructor</i> w rodzinach produkcyjnych.....	47
6.2. Badania wpływu stosowania kwasów organicznych na mikroklimat rodziny pszczelej.....	49
6.3. Badania wpływu stosowania kwasów organicznych na obraz histologiczny jelita środkowego.....	57
6.3.1. Obraz histologiczny jelita środkowego o budowie prawidłowej i po zastosowaniu kwasu mrówkowego 65 i 83%.....	57
6.3.2. Obraz histologiczny jelita środkowego po stosowaniu kwasu szczawiowego 3,2%.....	64
6.3.3. Obraz histologiczny jelita środkowego po stosowaniu kwasu mlekowego 15%.....	66
6.4. Badania wpływu stosowania kwasów na aktywność enzymatyczną.....	67
6.4.1. Wpływ kwasów organicznych na aktywność enzymatyczną jelita środkowego młodych pszczół (1 - 11 doba życia).....	67
6.4.2. Wpływ wieku pszczół robotnic (2, 6, 11 doba życia) na poziom aktywności enzymatycznej jelita środkowego po ekspozycji na kwasy.....	69
6.4.3. Wpływ kwasów organicznych na aktywność enzymatyczną jelita środkowego przygotowanych do zimowli.....	72
7. DYSKUSJA.....	77
7.1. Rozwój populacji <i>Varroa destructor</i> w rodzinach pszczelich.....	77
7.2. Wpływ stosowania kwasów organicznych na mikroklimat rodziny pszczelej.....	78
7.3. Wpływ stosowania kwasów organicznych na obraz histologiczny jelita środkowego.....	79
7.4. Wpływ stosowania kwasów organicznych na aktywność enzymatyczną jelita środkowego.....	81
8. WNIOSKI.....	84
9. LITERATURA.....	87
10. ZAŁĄCZNIKI.....	101

1. STRESZCZENIE

Aspekty biologiczne rodziny pszczelej – relacje między *Apis mellifera* a *Varroa destructor* przy stosowaniu zabiegów ograniczających populację pasożyta

Poniższa praca doktorska jest wynikiem badań relacji między *Apis mellifera* a *Varroa destructor*. Badania i obserwacje były wykonywane od 2008 do 2011 roku w pasiece towarowej na Dolnym Śląsku. Pszczoły *Apis mellifera carnica* były utrzymywane w ulach na ramce Dadanta. W poszczególnych latach badań było monitorowane i używane do badań od 10 do 22 rodzin pszczelich. Badanie dynamiki populacji roztoczy i pszczół było wykonywane przez 3 lata. Badano również wpływ stosowania kwasów organicznych do ograniczania populacji *Varroa destructor*: kwas mrówkowy 65 i 83%, kwas mlekowy 15% i kwas szczawiowy 3,2% na biologię rodziny pszczelej. Podczas stosowania kwasów organicznych były monitorowane parametry mikroklimatu rodzin pszczelich w celu sprawdzenia ich wpływu na temperaturę (°C), wilgotność względną (%) i stężenie CO₂ (ppm). Po zastosowaniu kwasów organicznych stosowanych w pszczelarstwie zostały wykonywane preparaty histologiczne z jelit środkowych pszczół, a także badanie aktywności enzymatycznej jelit środkowych. Pobierane było minimum 10 jelit środkowych pszczół w każdym okresie badań po zabiegu (w dwóch powtórzeniach) i konserwowane w formalinie, następnie jelita były zatapiane w parafinie. Z bloczków parafinowych były krojone skrawki o grubości 7 µm na preparaty histologiczne, które barwiono metodą AZAN i H & E. Preparaty histologiczne z jelit środkowych pszczół po zastosowaniu kwasów były analizowane pod względem rozwoju błon perytroficznych, enterocytów, centrów regeneracyjnych komórek i wakuolizacji cytoplazmy. Aktywność enzymatyczna 19 enzymów: lipaz (n = 6), proteaz (n = 5), glikozydaz (n = 8) oceniano po roztarciu w emulgatorze jelit środkowych pszczół (min. 10 jelit na test) przy pomocy zestawu API ZYM 25 200 (Biomeriux, Francja). Negatywny wpływ w obrazie mikroskopowym preparatów histologicznych stwierdzono po zastosowaniu kwasu mrówkowego u młodych pszczół (1 - 15 doby życia). Kwas szczawiowy miał łagodny wpływ na jelita środkowe, natomiast kwas mlekowy był nie szkodliwy. Zastosowany kwas mlekowy nie miał wpływu na aktywność enzymatyczną jelit środkowych pszczół w stosunku do negatywnego wpływu na aktywność enzymatyczną kwasu mrówkowego i szczawiowego - głównie w grupie proteaz i glikozydaz. Zaobserwowano odwrotne korelacje między enzymami w grupach po ekspozycji pszczół na kwasy organiczne w stosunku do korelacji w grupach kontrolnych. Wyniki

przeprowadzonych badań wykazują istnienie skutków ubocznych w postaci zaburzeń w funkcjonowaniu układu pokarmowego pszczoł po stosowaniu kwasów organicznych do ograniczania populacji *Varroa destructor*. Stosowanie kwasów organicznych takich jak kwas mrówkowy i szczawiowy nie jest 100% bezpieczne dla pszczoł i powinno być wykonane po starannym rozważeniu zysków i strat dla rodzin pszczelich.

Słowa kluczowe: *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, kwas mrówkowy, kwas mlekowy, kwas szczawiowy, preparaty histologiczne jelita środkowego, aktywność enzymatyczna jelita środkowego

1. SUMMARY

Biological aspects of bee colonies - relations between *Apis mellifera* and *Varroa destructor* when applying treatments to reduce parasite population

Dissertation merges field observations with research in area of relations between *Apis mellifera* and the parasite mite - *Varroa destructor*. Research and field observations were performed from 2008 to 2011 in commercial apiary in Lower Silesia, using Dadant frame and *Apis mellifera carnica* bees. Each year from 10 to 22 bee colonies were monitored and used in experiments. Population dynamics of parasite mites and bees were monitored in bee colonies for 3 years. The influence of different varroacidal treatments using organic acids such as: formic acid 65 and 83%, lactic acid 15% and oxalic acid 3,2% on biology of bee colonies was studied. Microclimate conditions in bee hives after the use of organic acids were monitored to check if there is any effect of them on temperature (°C), relative humidity (%) and CO₂ concentration (ppm). Histological preparations from the midgut of bees as well as enzymatic activity of the midgut were analyzed due to exposure of bees towards organic acids applied as in apiary practice nowadays. Minimum 10 midguts of bees per treatment/study period (in two replicates) were preserved in formalin and then embedded in paraffin and 7 µm thick histological slices were stained with AZAN and H&E techniques. The development of peritrophic membranes, enterocytes, cell proliferation centres and vacuolization in midgut of bees were analyzed due to the applied treatment to bee colonies. Enzymatic activity of 19 enzymes: lipases (n = 6), proteases (n= 5), and glycosidases (n = 8), was evaluated in stirred homogenates of midguts of honey bees (min. 10 midguts per test) using kit API ZYM 25 200 (Biomérieux, France). Negative influence was stated between the use of formic acid on midgut histology in young bees (1 – 15 days old). Oxalic acid was mildly affecting midgut while lactic acid was quite neutral. Lactic acid treatment had no effect on enzymatic activity of bee midgut while formic and oxalic acids used had pronounced negative effect on enzymatic activity – mainly proteases and glycosidases were affected. Pattern of relations between enzyme activities were very often inverted after exposure of bees to organic acids when compared to relations stated in control groups. Results of performed research underlined the existence of side effects of using organic acids to control *Varroa destructor* in bee colonies. They were related to digestive system functioning in bees. Using such organic acids

as formic and oxalic is not 100% safe to bees and they should be used after careful consideration on gains and losses to bee colony.

Key words: *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, formic acid, lactic acid, oxalic acid, midgut preparations histological, midgut enzymatic activity

2. WSTĘP

Biologia rodziny pszczelej pokazuje, iż pszczoła miodna *Apis mellifera* L. jest dobrym przykładem układu eusocjalnego (Wilsona 1971). Zachowania altruistyczne występujące w rodzinie pszczelej zwiększają szanse przeżycia altruisty (dawcy) poprzez opiekę nad potomstwem spokrewnionym a nie własnym (Woyciechowski 2009). System naturalnej odporności różnych gatunków pszczół przed pasożytami tworzą mechanizmy rozpoznawania i ich likwidacji. *Apis cerana* niszczy pasożytnicze w sposób mechaniczny, natomiast *Apis dorsata* uwalnia się od pasożytów przez oczyszczanie się z organizmów. U *Apis mellifera* jednym z mechanizmów obronnych jest usuwanie komórek czerwiu porażonego przez pasożyty (Chmielewski i wsp. 2007). Proces koewolucji między pszczołą a roztoczem jest napędzany przez mutacje obu gatunków, co prowadzi do mniej lub bardziej stabilnej równowagi. Dziedziczne cechy fizyczne i zachowania pszczoły miodnej mogą być zaangażowane w mechanizmy tolerancji pasożytów (Buchler i wsp. 2010; Rinderer i wsp. 2010).

Roztocz *Varroa destructor* (Anderson i Trueman, 2000) jest odpowiedzialny za objawy kliniczne warrozy u *Apis mellifera*. Zmienność genetyczna pasożyta jest przyczyną strat rodzin pszczelich spowodowanych różnym poziomem równowagi między gospodarzem a pasożytem. Mają one różne skutki w zależności od zjadliwości i wpływu pasożyta na ekspresję genów u pszczół (Correa-Marques i wsp. 2003, Navajas i wsp. 2008). W klimacie umiarkowanym główne straty rodzin z powodu warrozy występują jesienią i zimą gdy następuje spadek populacji gospodarza w stosunku do pasożyta, a długowieczne pszczoły zimowe są uszkodzone przez pasożyty (Amdam i wsp. 2004). Obecność *Varroa destructor* wywiera poważną presję na zdrowie pszczół i jest wymieniana jako jedna z przyczyn CCD (*ang.* Colony Collapse Disorder). Obserwacje pokazują, że w wielu przypadkach CCD populacja roztoczy nie była główną przyczyną ginięcia rodzin (Van Engelsdorp i wsp. 2009). Efektem działalności pasożyta są mechaniczne uszkodzenia powłoki ciała w przypadku *Varroa destructor* oraz obniżenie ilości hemolimfy i jej składników (Gliński i Jarosz 1984, Dandeu i wsp. 1991). Działanie toksyczne pasożyta polega na indukcji latentnych zakażeń wirusowych i bakteryjnych (Ball 1985, Ball i Allen 1988) oraz przenoszenie zakażeń między rodzinami przez roztocza (Gliński i Jarosz 1992, Miranda i wsp. 2003). Działanie stresogenne wywoływane przez *Varroa destructor* zarówno na czerw, jak i pszczoły jest potwierdzone wzrostem aktywności S-transferazy glutationu (GST) w hemolimfie czerwiu i pszczół porażonych pasożytem (Brodsgaard i wsp. 2003). Dynamika populacji pasożyta *Varroa*

destructor jest bardzo zmienna i zależy od cech gospodarza i pasożyta, które mogą mieć wpływ na współczynnik reprodukcji i śmiertelność roztoczy (Fries i wsp., 1994, Calis i wsp. 1999b). Wzrost liczby robotnic wpływa na zdolności reprodukcyjne roztocza podczas życia, dodatkowo obecność pszczół zbieraczek, rojenie i poziom zachowań obronnych. Wzrost liczby roztoczy jest dodatkowo wywoływany przez czynniki klimatyczne i dostępność nektaru (Currie i Tahmasbi 2008).

Wprowadzenie do ogólnego stosowania leków po wykryciu obecności pasożytów w Europie spowodowało zabicie podatnych osobników, ale również prowadziło do ostrej selekcji powodując z czasem powstawanie roztoczy nowej generacji, opornych na stosowane środki. Brak skutecznych leków do kontroli roztoczy pozwala na wzrost populacji do poziomu powodującego upadek rodzin: bezpośrednio przez liczbę roztoczy przypadających na pszczołę i pośrednio przez zmniejszenie odporności pszczół, co stwarza sprzyjające warunki do rozwoju wirusów. Zwiększanie dawek i aplikacji chemicznych prowadzi do zwiększania pozostałości leków w ulu. Ilość i liczba rozpuszczalnych w tłuszczach pozostałości leków może przechodzić do produktów pszczelich (Wallner 1999, Bogdanow 2006, Martel i wsp. 2007). W ostatnich latach z powodu zmniejszonej skuteczności leków kwasy organiczne (mrówkowy, mlekowy, szczawiowy) są coraz częściej stosowane i traktowane jako alternatywa do ograniczania populacji *Varroa destructor*. Przedstawione w pracy wyniki badań potwierdzają lub odrzucają bezpieczeństwo stosowania kwasów organicznych do ograniczania populacji *Varroa destructor*.

3. CEL PRACY

Celem pracy było przedstawienie relacji między pasożytem *Varroa destructor* a współczesną populacją pszczoły miodnej *Apis mellifera carnica* poprzez monitoring dynamiki namnażania się pasożytów *Varroa destructor* i ich wpływ na ginięcie rodzin pszczelich. W pracy określono wpływ stosowanych kwasów organicznych na mikroklimat rodziny pszczelej i poziom homeostazy. Określono wpływ stosowanych w szerokiej praktyce pszczelarskiej kwasów organicznych (mrówkowego, mlekowego, szczawiowego) na obraz histologiczny jelita środkowego oraz poziom aktywności enzymatycznej jelita środkowego zarówno u młodych, jak i dorosłych pszczół.

4. PRZEGLĄD LITERATURY

4.1. Biologia rodziny pszczelej *Apis mellifera* L.

4.1.1. Rodzina pszczela jako układ eusocjalny

Rodzina pszczela pszczoły miodnej *Apis mellifera* L. jest przykładem układu eusocjalnego zgodnie z definicją Wilsona (1971), która mówi, że aby układ był eusocjalny to muszą być spełnione trzy warunki: 1 - tworzą je osobniki należące do co najmniej dwóch pokoleń, 2 - wychowują wspólnie potomstwo pochodzące od jednej lub kilku matek (królowych), 3 - część osobników tworzących gniazdo jest całkowicie bezpłodna lub ma znacznie ograniczoną płodność (robotnice). W przypadku pszczoły miodnej rodzina składa się z jednej matki (królowej), kilkudziesięciu tysięcy pszczoł robotnic i kilku tysięcy trutni. Liczebności robotnic i trutni jest uzależniona od fazy poziomu rozwoju rodziny i pory roku. Latem w rodzinie pszczelej w zależności od rasy może być od 30 do 80 tys. robotnic i od 1 do 3 tys. trutni. W zimie w rodzinie nie ma trutni, a liczba robotnic zmniejsza się do około 10 tys. Rozwój osobniczy wszystkich członków rodziny pszczelej składa się z następujących stadiów rozwoju: jaja, larwy zwiniętej, larwy przedzającej, przedpoczwarki i poczwarki o różnej długości rozwoju (Woyke 2008) (tabela 1.).

Tabela 1. Czas rozwoju członków rodziny pszczelej [dni] (Woyke 2008)

Stadia rozwoju	Matka	Robotnica	Truteń
Jajo	3	3	3
Larwa zwinięta	5	6	7
Larwa przedzająca	2	2	3
Przedpoczwarka	1	2	4
Poczwarka	5	8	7
Całkowity rozwój	16	21	24

Przedstawiony powyżej udział liczbowy poszczególnych członków wchodzących w skład rodziny pszczelej pozwala wyjaśnić mechanizmy utrwalania się zachowań altruistycznych na drodze doboru naturalnego. Zachowania altruistyczne ograniczają (dostosowania) płodność i szanse przeżycia altruisty na rzecz zwiększenia (dostosowania) szansy przeżycia i wydania potomstwa biorcy tego altruistycznego zachowania (Woyciechowski 1985, Woyciechowski

i Moroń 2009). Aby zachowania altruistyczne mogły powstać musi być spełniona nierówność $c/b < r$, gdzie c - koszt altruisty, b - zysk biorcy zachowania altruistycznego (obie wartości mierzone są dostosowaniem), zaś r - współczynnik pokrewieństwa łączący dawcę i biorcę. W tym zachowaniu najważniejsza jest propagacja genów altruisty, natomiast mniej ważne jest to czy robi to on sam, czy przy jego pomocy robi to jego krewniak noszący geny altruisty. Ważne jest tutaj łączne dostosowanie altruisty (ang. inclusive fitness). Przykłady układów eusocjalnych występujących u pszczoł, mrówek i os są obecne kiedy ich samce są haploidami, a ich plemniki niosą ten sam zestaw informacji genetycznej, co jest możliwe przy braku mejozy w spermatogenezie. Ich pełne córki są bardziej spokrewnione ze sobą $r = 0,75$ niż z własną matką $r = 0,5$, co pozwala łatwiej spełnić nierówność przy $r = 0,75$. Natomiast matka ze swoimi synami jest bliżej spokrewniona $r = 0,5$ niż siostra z braćmi $r = 0,25$, ponieważ posiadają wspólne geny tylko od matki (Hamilton 1964a, b).

Matka pszczoły żyje średnio w rodzinie 3 - 4 lata, a jej zadaniem jest składanie jaj i utrzymywanie kontroli nad rodziną pszczołą poprzez wydzielanie, przez gruczoły egzokrynne, na powierzchnię ciała substancji matecznej. W skład substancji wchodzi feromony, czyli proste 8 - 10 węglowe alkohole alifatyczne, nienasycone kwasy tłuszczowe lub ich estry zawierające atomy wodoru i tlenu (Lipiński 2002). Nowa matka pojawia się naturalnie w rodzinie pszczoły w trzech okolicznościach:

- kiedy pszczoły chcą wymienić matkę na nową (matka z cichej wymiany)
- kiedy stara matka nagle zginie (matka z matecznika ratunkowego)
- kiedy pszczoły chcą się wyroić (matka rojowa)

Trutnie występują w rodzinie od maja do sierpnia w warunkach klimatu umiarkowanego. Z genetycznego punktu widzenia są takie same jak matki i służą jedynie do rozwoju niezapłodnionych komórek jajowych w trutnie, które produkują plemniki i kopulują z matką. Poliandria (kopulacja matki z kilkoma trutniami) występująca u eusocjalnych błonkówek osłabia pokrewieństwo potomstwa takiej matki przez co zmniejsza się szanse na zachowania altruistyczne. Już przy dwóch partnerach matki jej córki są spokrewnione ze sobą tak samo jak siostry zwykłych diploidów ($r = 0,5$) (Woyciechowski 1985). Jednak poliandria, która wyewoluowała już po utrwaleniu układów eusocjalnych, stwarza lepsze możliwości obrony przed pasożytami w rodzinach o większej zmienności genetycznej. Różnice genetyczne nie tylko predysponują robotnice do lepszego wykonywania różnych zadań, ale także dają większe możliwości wykorzystania zasobów zmiennego środowiska (Hamilton 1987).

Podział pracy w układach eusocjalnych takich jak rodzina pszczoła daje jej dodatkowy zysk. U pszczoł młodsze osobniki wykonują najczęściej prace w gnieździe, a starsze poza gniazdem. Istnieje wiele hipotez tłumaczących powstanie tej strategii zwanej też polietyzmem wiekowym. Jedną z hipotez jest możliwość uczenia się robotnic podczas powtarzania tych samych czynności lub uzyskanie większej efektywności pracy robotnic, które nie tracą czasu na przemieszczanie się i poszukiwanie coraz to nowego zajęcia. Jednak największą korzyścią płynącą z polietyzmu wiekowego jest przedłużenie średniej długości życia robotnic w kolonii, co przekłada się na sukces całej rodziny pszczelej (Woyciechowski i Kozłowski 1998). Osiągnięcie tego sukcesu jest możliwe, gdy osobniki młode i zdrowe podejmują się prac w gnieździe o mniejszym ryzyku śmierci (do 21 dnia życia), a osobniki starsze lub chore podejmują czynności konieczne w terenie, ale bardziej ryzykowne (powyżej 21 dnia życia) (tabela 2). Ta hipoteza została potwierdzona nie tylko modelami matematycznymi (Woyciechowski i Kozłowski 1998, Tofilski 2009), ale też eksperymentami na pszczołach (Woyciechowski i Moroń 2009). Pszczoły robotnice wykonują wszystkie prace w gnieździe i poza gniazdem pszczelim. Wykonywane przez pszczoły czynności skorelowane są z ich wiekiem. Związane jest to z aktywnością różnych gruczołów w danym wieku, które są aktywne tylko raz w życiu (tabela 2.).

Tabela 2. Czynności robotnic wykonywane przez robotnice w określonym wieku

Czynności	Wiek [dni]
Czyszczenie siebie i komórek plastra	1 - 2
Karmienie larw starszych	3 - 6
Karmienie larw młodszych	7 - 14
Odbieranie i przerabianie nektaru, zasklepianie komórek z miodem, magazynowanie pyłku w komórkach plastra	8 - 14
Budowa plastrów	15 - 18
Ochrona gniazda	19 - 21
Zbieranie zapasów (praca w terenie)	powyżej 21

Termoregulacja rodziny pszczelej jest głównym czynnikiem wpływającym na rozwój rodziny pszczelej. Temperatura tułowia aktywnej pszczoły robotnicy waha się od 31 do 43°C w zależności od pełnionej funkcji w rodzinie pszczelej (Tautz 2008, Stabentheiner 2001). Poszczególne części ula mają różną temperaturę jedynie temperatura gniazda z czerwem regulowana jest z dużą dokładnością, gdyż czerw do swojego rozwoju naturalnego potrzebuje temperatury powyżej 33°C (Woyke 1998). W okresie zimy wewnątrz kłębu temperatura waha się od 20 do 30°C, zewnętrzne warstwy kłębu charakteryzują się temperaturą od 10 do 12°C. Minimalna temperatura potrzebna do utrzymania funkcji życiowych pojedynczej pszczoły wynosi 8°C (Chuda-Mickiewicz 1994). Dorosłe pszczoły znoszą wilgotność względną powietrza od 20 do 70%. Jednak dłuższe przebywanie w powietrzu o wilgotności powyżej 60% skraca długość ich życia i mają objawy biegunki. Ten negatywny wpływ stwierdzono zarówno w okresie zimowania jak i pełnej aktywności pszczół (Atmowidjojo i wsp. 1997, Muszyńska 1989).

4.1.2. Anatomia i fizjologia układu pokarmowego

Układ pokarmowy pszczoły miodnej składa się z trzech podstawowych odcinków:

- jelita przedniego
- jelita środkowego
- jelita tylnego

Jelito przednie i tylne są pochodzenia ektodermalnego i od wewnątrz wyścielane jest schitynizowany oskórek, a jelito środkowe powstało z mezodermy i wyścielane jest nabłonkiem trawiennym (Caetano 1984, 1988, Dade 1994, Martins 2006). Jelito przednie u pszczół składa się z: jamy gębowej, gardzieli, przełyku, wola, oraz przedżołądka. Jama gębowa przechodzi w silnie umięśnioną gardziel, w której mają ujście trzy typy gruczołów ślinowych. Gruczoł wargi dolnej (właściwy) produkuje wydzielinę zasadową i nie zawiera enzymów, jest najlepiej rozwinięty u zbieraczek. Gruczoł gardzielowy występuje tylko u robotnic i jest najbardziej aktywny między 3 a 6 dniem życia i wydziela mleczko pszczele. U starszych robotnic gruczoły gardzielowe funkcjonują jako gruczoły ślinowe produkując inwertazę i amylazę. Gruczoły żuwaczkowe są najsilniej rozwinięte u matki pszczelej produkując substancję mateczną, a u robotnic ślinę. Następnie gardziel przechodzi w przełyk biegnący między mięśniami tułowia do odwłoka gdzie przechodzi w wole miodne, łączące się z jelitem środkowym za pośrednictwem przedżołądka. W przedniej części przedżołądka występuje tzw. wentyl miodowy zbudowany z czterech trójkątnych fałdów umożliwiających jego dokładne zaciskanie, a końcowy odcinek ma postać cienkiej rurki. Taka budowa

przedżołądka umożliwia jedynie przesuwanie pokarmu w jednym kierunku - do jelita środkowego. Wole miodne służy pszczole do transportu i przetrzymywania płynnych pokarmów, ale dzięki schitynizowanej wyściółce uniemożliwia procesy wchłaniania substancji pokarmowych. Pojemność wola miodnego wynosi około 57mm^3 . W wolu miodnym odbywają się procesy mieszania zawartości sprzyjające procesom enzymatycznym. Kłapy przedżołądka mają zdolność wyłapywania ziaren pyłku i przekazywania ich do jelita środkowego. Jest to miejsce wstępnego rozkładu pobranych z pokarmem cukrów złożonych. Amylaza powoduje rozkład skrobi i dekstryn, a inwertaza rozkłada sacharozę na glukozę i fruktozę (Tomaszewska i Chorbiński 2000).

Jelito środkowe zwane trawiennym ułożone jest w odwłoku w kształcie pętli i na całej swej długości wykazuje silne pofałdowanie, co zwiększa powierzchnię trawienia i wchłaniania. Długość jelita środkowego wynosi około 10mm u robotnic, 13mm u matki pszczelej i 19mm u trutnia. W jelicie środkowym zachodzi właściwy proces trawienia i wchłaniania. Komórki nabłonkowe jelita produkują enzymy rozkładające peptydy i białka (proteazy) i tłuszcze (lipazy), oraz cukry (amylaza, inwertaza, maltaza). Enzymy są produkowane w komórkach, a gdy są one wypełnione enzymem odrywają się martwiczo do światła jelita, gdzie rozpadają się i uwalniają enzymy (Schumaker i wsp. 1993). Pobrany nektar jest rozkładany przez gruczoły gardzielowe. Inwertaza rozkłada sacharozę na monosacharydy (glukozę i fruktozę), a jednocześnie następuje łączenie glukozy z innymi cząsteczkami i powstają di i trisacharydy, a nawet cukry złożone. Gdy pokarm trafi do żołądka wcześniej dodana inwertaza ulega rozpadowi i produkowana jest nowa, która rozkłada obecne cukry wyższe. Monosacharydy wnikają do hemolimfy, w której stężenie cukru waha się od 1700 do 3700 mg/100ml, z czego 60 - 70% to glukoza i 30 - 40% to fruktoza. Cukry proste są wykorzystywane na bieżące potrzeby organizmu (do lotu i produkcji ciepła), natomiast materiał zapasowy w ciele pszczoły jest gromadzony w postaci tłuszczu, jako glikogen polisacharydów i przechowywany w ciele tłuszczowym (*ang.* fatbodies). Aminokwasy egzogenne niezbędne dla procesów życiowych pszczół to: arginina, histydyna, izoleucyna, leucyna, lizyna, metionina, fenyloalanina, treonina, tryptofan i walina. Inne aminokwasy, które są zazwyczaj obecne u pszczół i służą do budowania białek pszczoły i wielu enzymów, to: alanina, asparagina, glutamina, glicyna, prolina i tyrozyna. Gruczoły gardzielowe produkują białka - mleczko pszczele z aminokwasów występujących w hemolimfie. Białko zapasowe jest w tłuszczu podczas metamorfozy i u dorosłych pszczół głównie zimowych. Niektóre witaminy są syntetyzowane przez pszczoły, a inne są

pozyskiwane głównie z pyłku. W ciele pszczoły obecne są zawsze witaminy takie jak: tiamina, ryboflawina, pirydoksal, kwas nikotynowy, kwas pantotenowy, biotyna i kwas foliowy. Tłuszcze, które są gromadzone w organizmie pszczoły w odniesieniu do owadów nie są wykorzystywane jako energia dla mięśni poruszających skrzydłami. (Morse i Hooper 1985)

Pszczoły nowo wygryzione w rodzinach cechują się szybkim wzrostem aktywności enzymów proteolitycznych w przewodzie pokarmowym. Szczyt tej aktywności osiągają w ciągu pierwszego tygodnia życia. Następnie obserwuje się spadek aktywności tych enzymów do momentu osiągnięcia stanu równowagi na resztę ich życia (Grogan i Hunt 1980, Gilliam i wsp. 1988, Crailsheim i Stolberg 1989). Poziom trypsyny, elastazy i aminopeptydazy leucynowej wzrastał między 3 a 8 dniem życia pszczoły, a następnie spadał do niskiego poziomu przez 24 dni. Jest to dowód na znaczenie pokarmu białkowego w odżywianiu pszczół w pierwszym tygodniu ich życia (Winston 1987). W badaniach nad poziomem aktywności chymotrypsyny w jelicie środkowym dorosłych pszczół robotnic *Apis mellifera* wysoką aktywność notowano w lecie w stosunku do zimy, jesieni i wiosny. Te obserwacje świadczą, że poziom aktywności enzymatycznej organizmu pszczół jest uzależniony od diety. Zużycie pyłku ma szczyt u młodych pszczół, których zachowanie i fizjologia są przystosowane do maksymalnego wykorzystania pokarmu białkowego przy produkcji mleczka pszczelego (Kroon i wsp. 1974, Schmidt i Buchmann 1985). Jelito środkowe u młodych pszczół jest głównym organem trawiącym pyłek (Whitcomb i Wilson 1929). Wraz ze starzeniem się pszczół i zmianą pełnionej funkcji w rodzinie pszczelej, następuje zmiana diety z białkowej na węglowodanową służącą do produkcji energii potrzebnej do lotu. Pszczoły 30-dniowe produkują trypsynę i chymotrypsynę, która pochodzi z tylnego odcinka jelita środkowego (Jimenez i Gilliam 1990). Zostały wykryte regionalne różnice w aktywności niektórych enzymów trawiennych w jelicie środkowym pszczół. Aktywność proteazy, diastazy (amylazy) i niedobór inwertazy był najwyższy w przedniej części jelita środkowego, ale aktywność lipazy była równomierna na całej jego długości. Na podstawie tych obserwacji stwierdzono, że wydzielanie enzymów miało miejsce w przedniej części jelita środkowego, natomiast wchłanianie składników pokarmowych w tylnej części (Zharebkin 1967). Po analizie proteaz z pyłku 14 gatunków roślin spożywanych przez pszczoły, stwierdzono że wszystkie próbki zawierały chymotrypsynę o podobnej aktywności a także trypsyny jak i karboksypeptydazy o aktywności nieregularnej (Grogan i Hunt 1979). Po analizie wyciągu z jelit środkowych pszczół stwierdzono, że działalność chymotrypsyny była

najwyższa w jelitach środkowych młodych pszczoł karmionych pyłkiem, Natomiast aktywność trypsyny nie jest zależna od sezonu i rodzaju pyłku, ale związana jest z wiekiem pszczoł (Grogan i Hunt 1980). Została również wykazana obecność aminopeptydazy na błonach perytroficznych i wierzchołkowej części komórek jelita środkowego pszczoły (Peters i Kalnins 1985). Z kolei analiza aktywności proteolitycznej tkanki jelita środkowego w przestrzeni ekto i endoperytroficznej zarówno u poczwarki jak i dorosłej pszczoły robotnicy wykazała wysoki poziom trypsyny i chymotrypsyny, które pochodziły z tkanki jelita środkowego pszczoły (Moritz i Crailsheim 1987). Wyniki te potwierdzają sezonowe i zależne od wieku wahania aktywności proteolitycznej (Grogan i Hunt 1984), ale Moritz i Crailsheim (1987) stwierdzili, że udział w proteolitycznej działalności ma wtórnie pyłek, niż proteazy wydzielane przez pszczoły miodne. Indukcja syntezy enzymów trawiennych w jelicie środkowym owada może być regulowana przez bezpośrednią odpowiedź wydzielniczą i kontrolę hormonalną (Applebaum 1985). Poziom aktywności enzymatycznej zarówno w 7 jak i 14 dobie życia był wyższy u pszczoł dobrze odżywionych w stosunku do pszczoł z ograniczonym poziomem białka w pokarmie (Sagili i Pankiw 2007). Po syntezie niektórych enzymów, takich jak peptydazy i różnych hydrolaz pozostają one związane do mikrokosmków i przeznaczone do trawienia na granicy rąbka szczoteczkowego (Ferreira i Terra, 1980). W przewodzie pokarmowym enzymy mogą pochodzić z miodu pszczelego, pyłku (Stanley i Linskens 1974) lub ze źródeł mikrobiologicznych (Barker i Lehner 1972, Gilliam i wsp. 1988). Natomiast endopeptydazy są wydzielane do jelita środkowego w sposób, który zapobiega autolitycznemu trawieniu tkanek odpowiedzialnych za ich wydzielanie. Proces wydzielania białka bez aktywatora zachodzi jedną z dwóch dróg: 1) wydzielanie występuje w komórkach, w których białko jest wydzielane tak szybko, jak jest syntetyzowane i 2) regulowane wydzielanie występuje w komórkach w których białko jest syntetyzowane i przechowywane w wyspecjalizowanych pęcherzyki przed wydaniem (Palade 1975, Kelly 1975). Rozłożone przez enzymy składniki pokarmowe zostają wchłonięte i rozprowadzone przez hemolimfę po całym organizmie, a nie strawione resztki pokarmowe zostają przesunięte do jelita tylnego. Jelito tylne składa się z jelita cienkiego i jelita prostego a oddzielone jest od jelita środkowego zastawką. Komórki nabłonkowe jelita tylnego są schitynizowane, ale przepuszczają wodę, ponieważ jest to miejsce odwodnienia niestrawionych resztek pokarmu. Dodatkowo w tej części przewodu pokarmowego chitynowe wyrostki nabłonka ułatwiają rozdrabnianie i przesuwanie treści kałowych. Ściany jelita prostego wykazują podłużne pofałdowania, a mięśnie podłużne i poprzeczne pozwalają na

jego rozszerzanie do pojemności 57% masy ciała pszczoły. Mięśnie występujące przed odbytem pełnią funkcję zwieracza kontrolującego proces wydalania kału. Wydzielina gruczołów odbytowych, zawierająca enzymy katalizujące oraz kwaśny odczyn treści jelita tylnego zapobiegają gniciu mas kałowych szczególnie podczas zimowli (Gałuszka 1998).

4.1.3. Budowa histologiczna i zmiany histopatologiczne w jelicie środkowym po stosowaniu kwasów organicznych

Jelito środkowe pszczoły miodnej jest prawdziwym żołądkiem, gdzie ma miejsce trawienie pokarmu. Naturalne położenie jelita środkowego w ciele pszczoły przypomina kształtem literę "U". Jest ono pofałdowane na całej długości, co zwiększa powierzchnię chłonną. Wewnątrz żołądka pod nabłonkiem występuje warstwa mięśni okrężnych i warstwa mięśni podłużnych tworzących układ pracy mięśni o działaniu przeciwnym. Cały nabłonek pokryty jest grubą warstwą galaretowatej substancji wewnętrznej, która produkuje błony perytroficzne. Błony perytroficzne zapobiegają ścieraniu przez pokarm ścian żołądka, są ciągle produkowane i ulegają odrywaniu, co w przekroju żołądka jest widoczne jako koncentryczne warstwy. Błona perytroficzna jest całkowicie przepuszczalna dla wody, substancji rozpuszczonych i enzymów (Morse i Hooper 1985). Ułożenie mięśni w ścianie jelita środkowego pozwala na powstawanie ruchów perystaltycznych. Błony perytroficzne owijają przechodzącą treść pokarmową i chronią nabłonek żołądka przed uszkodzeniem spowodowanym ostrymi ziarnami pyłku, oraz spowalniają przejście treści przez żołądek. Główną funkcją błon perytroficznych jest równomierna dystrybucja enzymów w całym jelicie środkowym (Giebel i wsp. 1971, Dahlmann i wsp. 1978), co zostało sprawdzone zarówno na larwach jak i pszczołach dorosłych, Stare błony perytroficzne są stopniowo rozrywane i usuwane z żołądka razem z niestrawionymi resztkami pokarmowymi. W wyniku intensywnego działania komórki nabłonka błony śluzowej żołądka szybko się zużywają i muszą być zastąpione przez nowe. W tym celu działają tzw. krypty regeneracyjne, w których widoczne są mniejsze komórki, co pozwala na regenerację nabłonka, który jest wielowarstwowy (Kubišová 2003). Produkcja nadmiernych ilości błon perytroficznych może być spowodowana zahamowaniem zluszczaniem się naskórka i biegunką - mechanizm zabezpieczający przed szkodliwym działaniem substancji lub wydłużeniem czasu wchłaniania i lepszym wykorzystaniem składników pokarmowych (Bielenin i Ibek 1980, Crailsheim 1988). W obrazie mikroskopowym preparatów histologicznych z jelit środkowych pszczół karmionych pokarmem cukrowym i białkowym z dodatkiem kwasu mlekowego lub preparatu probiotycznego po 11 dobach zaobserwowano zwiększoną produkcję błon perytroficznych

(Szymaś i Przybył 2007). Obraz histologiczny jelita środkowego pszczoły miodnej zmienia się w wyniku działania: substancji toksycznych (Bielenin i Ibek 1980), niewłaściwego pokarmu (Szymaś 1994), infekcji bakteryjnych (Gregorc i Bowen 1998, 2000) i wieku owada (Jimenez i Gilliam 1990).

Śmierć komórek może nastąpić w kilku przypadkach: przez przypadek, martwicę, apoptozy - zaprogramowanej śmierci. Martwicza śmierć jest indukowana w ekstremalnych warunkach takich jak: niedokrwienie, niedotlenienie, ekspozycja na toksyny i hipertermia (Bowen i wsp. 1996). U pszczoł śmierć komórek była opisywana w gruczołach gardzielowych (Moraes i Bowen 2000). Także w jelicie środkowym pszczoł po zakażeniu *Paenibacillus Larvae* i po aplikacji amitrazy roztoczebójczej (Gregorc i Bowen 1998, 2000). Śmierć komórek wykryto także w izolowanych komorach serca pszczoły miodnej po narażeniu na działanie herbicydu (2,4 - dwuchlorofenoksyoctowego kwasu) (Papaefthimiou i wsp. 2002). Śmiertelność komórek nabłonka jelita środkowego po zastosowaniu kwasu szczawiowego stwierdzono na poziomie 25% po 5 godzinach od zastosowania kwasu na larwy 3 i 5 dniowe. Po 21 godzinach poziom śmiertelności komórek wzrósł do 70%, natomiast po 50 godzinach u larw 3 dniowych śmierć komórek była na poziomie 18%, ale u 5 dniowych wynosiła 82%. W grupie kontrolnej wykazano sporadyczną śmiertelność komórek głównie tłuszczowych. Stosowanie 85% kwasu mrówkowego wywołuje rozległą śmiertelność komórek tkanki nabłonkowych i pod nabłonkowych, które poprzedziła śmierć komórek całego ciała larwy. Poziom śmiertelności komórek nabłonka jelita środkowego u larw 3 dniowych po 5 godzinach wynosił 70% a 5 dniowych 95% śmiertelność. Po 21 godzinach od zastosowania kwasu mrówkowego u larw 3 dniowych stwierdzono 96% śmiertelność a u 5 dniowych 100% komórek (Gregorc i wsp. 2004).

4.2. Roztocz *Varroa destructor* - pasożyt *Apis mellifera* L.

Rodzaj *Varroa* obejmuje cztery gatunki: *Varroa jacobsoni* (Oudemans, 1904). *Varroa underwoodi* (Delfinado-Baker i Aggarwal, 1987), *Varroa rindereri* (De Guzman i Delfinado-Baker, 1996) i *Varroa destructor* (Anderson i Trueman, 2000).

Roztocz *Varroa destructor* jest odpowiedzialny za groźną chorobę - warrozę u *Apis mellifera*. Do 2000 roku był mylnie uważany za *Varroa jacobsoni* (Anderson i Trueman, 2000), który w rzeczywistości jest gatunkiem mniej zjadliwym i u *Apis mellifera* w Europie nie występuje. *Varroa destructor* jest reprezentowany obecnie przez cztery haplotypy: japońsko-tajlandzki o niższej patogeniczności i koreański o większej patogeniczności, które

rozprzestrzeniły się na świecie (Anderson i Trueman 2000). Niedawno opisano dwa nowe haplotypy na *Apis mellifera* w południowo - wschodniej Azji (chiński i drugi koreański), których zjadliwość dla pszczoł europejskich nie jest znana, ale mogą być nowym zagrożeniem. U *Apis cerana Varroa destructor* jest reprezentowany przez trzy haplotypy: japońsko-tajlandzki występujący również u *Apis mellifera* oraz nepalski i wietnamski występujący tylko u *Apis cerana*. Naturalnym gospodarzem roztocza *Varroa destructor* jest *Apis cerana*, z którego został przeniesiony na pszczoły europejskie *Apis mellifera*. Najprawdopodobniej do zmiany gospodarza (z *Apis cerana* na *Apis mellifera*) doszło, gdy rodziny *Apis mellifera* wywieziono do Wschodniej Rosji i na Daleki Wschód w pierwszej połowie ubiegłego wieku co doprowadziło do swobodnej dystrybucji obu gatunków pszczoł i przeniesienia pasożyta (Oldroyd, 1999). Roztocza *Varroa destructor* znaleziono u *Apis mellifera* we wschodniej części wybrzeża ZSRR (1952), w Pakistanie (1955), Japonii (1958), Chinach (1959), Bułgarii (1967), Ameryce Południowej (Paragwaj, 1971), Niemczech (1977) (Ruttner i Ritter, 1980), Polska 1980 i pierwszy sygnał ze Stanów Zjednoczonych pochodzi z 1987 (De Guzman i Rinderer, 1999). *Varroa destructor* jest gatunkiem prawie kosmopolitycznym, ale nie został znaleziony jeszcze w Australii.

Zmienność genetyczna pasożyta jest przyczyną strat rodzin pszczelich spowodowanych różnym poziomem równowagi między gospodarzem a pasożytem. Działalność pasożyta ma różne skutki w zależności od zjadliwości i wpływu pasożyta na ekspresję genów u pszczoł (Correa-Marques i wsp. 2003, Navajas i wsp. 2008). *Varroa destructor* jest pseudo-haplo-diploidalnym pasożytem (Martin i Kemp 1997, Harris i Harbo, 1999). Rozmnaża się przez kojarzenie w pokrewieństwie - brat z siostrą, co w dużej mierze przyczynia się do utrwalania powstawania mutacji (Corneut i wsp. 2006). Proces koewolucji między pszczolą a roztoczem jest napędzany przez mutacje obu gatunków, co prowadzi do mniej lub bardziej stabilnej równowagi. Dziedziczne cechy fizyczne i zachowania pszczoły miodnej mogą być zaangażowane w mechanizm tolerancji pasożytów (Büchler i wsp. 2010, Rinderer i wsp. 2010).

4.2.1. Wpływ pasożyta na pszczolę i rodzinę pszczelą

Pszczoły europejskie są znacznie mniej odporne na pasożyta, ale ze względu na szeroki ich zasięg pasożyt rozprzestrzenił się prawie na całym świecie (Peng i wsp. 1987, Oldroyd, 1999). U nowego żywiciela nie zostały wykształcone jeszcze mechanizmy obronne, które regulują relacje między gospodarzem a pasożytem, w wyniku czego *Varroa destructor* może powodować śmierć żywiciela. Na początku pojawienia się pasożyta do Europy i Ameryce

Północnej można było łatwo kontrolować jego populację poprzez zastosowanie 1 - 2 zabiegów leczniczych rocznie. Obecnie straty rodzin pszczelich wzrastają od początku XXI wieku mimo bardziej intensywnej walki z inwazją. Od 2006 roku zostały zaobserwowane duże straty rodzin pszczelich w Europie i Ameryce Północnej i zjawisko to nazwano Colony Collapse Disorder (CCD). Powodem wprowadzenia takiego słownictwa było stwierdzenie naukowców, iż nie ma jednoznacznej przyczyny wyjaśniającej duże straty rodzin pszczelich. Jest to synergiczne działanie różnych przyczyn. Obecność *Varroa destructor* wywiera poważną presję na zdrowie pszczół i jest wymieniana jako jedna z potencjalnych przyczyn CCD. Zaobserwowano, że w wielu przypadkach CCD populacja roztoczy nie była główną przyczyną ginięcia rodzin (Van Engelsdorp i wsp. 2009). Udokumentowano trzy przypadki wystąpienia CCD: W pierwszym znaleziono jedynie jeden wirus (izraelską odmianę wirusa ostrego paraliżu - IAPV), który był silnie skorelowany z CCD (Cox-Foster i wsp. 2007). W drugim badaniu oceniano zmiany w ilości pszczół i podwyższoną zawartość pestycydów, ale pojawiła się tylko tendencja mimo wzrostu częstości występowania wirusów i innych patogenów w rodzinach z CCD (Johnson i wsp. 2009). W trzecim badaniu wykazano iż pszczoły z CCD miały wyższe obciążenie patogenami w stosunku do populacji, która przeżyła, co sugeruje na istnienie interakcji między patogenami i bodźcami stresowymi takimi jak obecność pasożytów. Nie ma jednoznacznych dowodów na to, że *Varroa destructor* jest powodem występowania CCD, ale nie można wykluczyć jego zdolności do tłumienia systemu odpornościowego pszczoły (Van Engelsdorp i wsp. 2009). Straty rodzin pszczelich podczas zimowli są nieuniknione, ale dwadzieścia lat temu był to poziom 5 - 10%, obecnie jest to często 20%, a nawet więcej. Przyczyny strat podczas zimowli są różne: straty matki, brak zapasów, choroby i pasożyty (Journal of Apicultural Research, 2010 - wydanie specjalne). Roztocz *Varroa* może ułatwiać przenoszenie wirusów: DWV, SBV, APV, IAPV i KBV przez pszczoły opiekunki do larw, a w konsekwencji także do pszczół dorosłych (Ball 1985, Chen i wsp. 2004). Mogą być również przekazywane przez trutnie w nasieniu oraz przez matki za pośrednictwem zakażonych jaj (Yue i wsp. 2006, 2007). Działanie toksyczne pasożyta polega na indukcji latentnych zakażeń wirusowych i bakteryjnych (Ball 1985, Ball i Allen 1988). Udowodniono że wirus przenoszony jest między roztoczami. Może replikować w roztoczach *Varroa* i jest obecny w ich ślinie, co sugeruje, że jest on aktywnym biologicznie wektorem niektórych wirusów pszczelich (Bowen-Walker i wsp. 1999, Chen i wsp. 2004, 2005). Wirus DWV powoduje zmiany morfologiczne takie jak: zdeformowanie skrzydeł i skrócenie odwłoków, co jest zabójcze dla pszczół (Ball i Allen 1988, Martin 1998,

Bowen-Walker i wsp. 1999, Martin 2001a, Tentcheva i wsp. 2006). Wirusy ABPV i DWV są bardzo zjadliwe, co potęgują obrażenia pszczoł spowodowane odżywianiem się roztoczy (Chen i wsp. 2006). Wspomniane wirusy są skorelowane ze stratami rodzin podczas zimowli (Highfield i wsp. 2009, Berthoud i wsp. 2010). Rodziny z warrozą, jeśli są nieleczone, to zwykle giną w ciągu sześciu miesięcy do dwóch lat od zarażenia. Czas ten nie zależy tylko od potencjału rozrodczego pasożyta, ale również od poziomu jego inwazji własnej oraz w sąsiedniej rodzinie pszczelej, co może opóźniać (przy niskim poziomie) lub przyspieszać (przy wysokim poziomie pasożyta) giniecie owej rodziny pszczelej (Ritter i wsp. 1984). Pszczoły porażone pasożytem wychowywane do zimowli żyją krócej i mogą mieć niższą masę ciała w porównaniu do pszczoł wolnych od roztoczy i słabiej rozwijają się na wiosnę. Wysoki poziom inwazji pasożytów w zimie powoduje upadki rodzin pszczelich (Kovac i Crailsheim, 1988; Boecking i Genersch, 2008). Rodziny o niskim stopniu porażenia pasożytem w okresie zimy charakteryzowały się większą ilością wychowywanego czerwia i większą objętością zajmowanego przez rodzinę gniazda w okresie wczesnowiosennym (Howis i Nowakowski 2010).

Varroa destructor jest nadal poważnym zagrożeniem dla pszczoły miodnej i wciąż dziesiątkuje jej populację na świecie. W USA największe straty na poziomie od 50 do 100% obserwowano podczas zimowli w 1995/1996 i 2000/2001 roku (Pettis i Delaplane 2010). Podobna sytuacja miała miejsce w Europie Środkowej podczas zimowli 2002/2003 (Hendrikx i wsp. 2009) a w południowej 2004/2005 (Higes 2005). Efektem działalności pasożyta są mechaniczne uszkodzenia powłoki ciała oraz obniżenie ilości hemolimfy i jej składników (Gliński i Jarosz 1984, Dandeu i wsp. 1991) oraz przenoszenie zakażeń między rodzinami przez roztocza (Gliński i Jarosz 1992, Miranda i wsp. 2003). Działanie stresogenne wywoływane przez *Varroa destructor* zarówno na czerw jak i pszczoły jest potwierdzone wzrostem aktywności S-transferazy glutationu (GST) w hemolimfie czerw i pszczoł porażonych pasożytem (Brodsgaard i wsp. 2003). Skutkiem pasożytowania *Varroa destructor* jest utrata dużej ilości hemolimfy, obniżenie poziomu białek hemolimfy, zaburzenie syntezy białek odpornościowych w ciele tłuszczowym (Gliński i Jarosz 1984). Pasożytowanie 1-3 roztoczy na poczwarcie robotnicy powoduje obniżenie objętości hemolimfy o około 24%, a 4-6 roztoczy o około 40%. U porażonych trutni jest to odpowiednio 18,9 i 21,9% (Weinberg i Madel 1985). Poziom białek w hemolimfie poczwerek porażonych przez 1-3 roztocza obniża się o około 27%, a porażonych 4-6 pasożytami o około 50%. Aktywność bakteriolityczna typu lizozym występująca w hemolimfie owada silnie spada, a nawet zanika u czerwii silnie

porażonego pasożytem (Gliński i Jarosz 1988a). Jest to wskazanie, że pasożyty niszczą mechanizmy odporności humoralnej i osłabiają aktywność fagocytozy (Gliński i Jarosz 1988b). Interakcje między wirusami i zarażenia przez *Varroa destructor* są kluczem do zrozumienia upadków rodzin pszczelich. Wykazano, iż pszczoły nie zakażone wirusami tolerują wyższy poziom populacji pasożytów (Martin 2001a).

4.2.2. Dynamika namnażania się roztoczy w rodzinie pszczelej

Na dynamikę namnażania się roztoczy mają wpływ warunki pogodowe, pożytkowe i pojawienie się dużej liczby trutni w rodzinie (Calis i wsp. 1999a, Martin 2001b). Obserwowane globalne ocieplenie może powodować przyspieszenie wiosną i wydłużenie jesienią, okresu wychowu czerwiu pszczelego i trutowego, co znacznie zwiększa liczbę roztoczy w rodzinach na koniec sezonu (Le Conte i Navajas 2008). Dynamika populacji pasożyta *Varroa destructor* jest bardzo zmienna i zależy od cech gospodarza i pasożyta, które mogą mieć wpływ na współczynnik reprodukcji i śmiertelność roztoczy (Fries i wsp., 1994, Calis i wsp. 1999b). Wzrost ilości czerwiu w rodzinie pszczelej wpływa na zdolności reprodukcyjne roztocza podczas życia, dodatkowo obecność pszczół zbieraczek i ich błędzenie, poziom zachowań obronnych i rojenie się. Wzrost liczby roztoczy jest dodatkowo wywoływany przez czynniki klimatyczne i dostępność nektaru (Currie i Tahmasbi 2008). Jednak dokładny wpływ poszczególnych parametrów nie jest znany, ponieważ większość z nich daje efekt dopiero gdy dojdzie między nimi do interakcji. Niektórzy autorzy próbowali wyodrębnić najbardziej istotne czynniki za pomocą wieloczynnikowej analizy, co potwierdziło istotne korelacje między ilością czerwiu i liczbą pasożytów (Arechavaleta-Velasco i Guzman-Novoa, 2001, Harris i wsp., 2003, Lodesani i wsp. 2002). Jednak dokładne przewidywanie w jakim stopniu wzrośnie liczba pasożytów od wiosny do jesieni jest jeszcze nie możliwe.

W Niemczech w pierwszych latach od wykrycia *Varroa destructor* w rodzinach pszczelich, jego populacja po czterech latach osiągała od 7 do 11 tysięcy osobników (Ritter i Perschil 1982, Fries i wsp. 1994). W tym czasie dobowy próg osypanych roztoczy w lipcu wynosił 200 sztuk i był sygnałem do leczenia rodziny pszczelej (Ritter i wsp. 1984). Aktualnie leczenie rodziny rozpoczyna się, kiedy naturalny osyp wynosi 10 sztuk na dzień, ponieważ poziom ten wskazuje na szybki upadek rodziny pszczelej podobnie jak obciążenie rodziny powyżej 3000 pasożytów (Boecking i Genersch, 2008). W regionach o dużym napszczeleniu dynamika populacji roztoczy jest efektem stałej wymiany pasożytów, która dokonuje się dzięki pszczołom zbieraczkom i trutniom w wyniku rabowania innych rodzin

(Greatti i wsp., 1992, Goodwin i wsp. 2006). Dzięki temu w rodzinach następuje reinwazja pasożytów w wyniku której jedne rodziny tracą, a inne zyskują roztocza. Istotną sprawą jest to, iż rodziny silnie rabujące otrzymują pasożyty od rodzin słabszych, często w wyniku wysokiej inwazji *Varroa destructor*. Efektywne rabowanie odbywa się w promieniu do 1 km i trwa w okresie małego pożytku lub jego braku. Rodziny rabujące następnie odnotowują szybki wzrost liczby roztoczy (Renz i Rosenkranz 2001).

W klimacie umiarkowanym rodziny nieleczone giną z powodu warrozy po 3 - 4 latach od początku inwazji (Korpela i wsp. 1993, Buchler 1994). Różna jest dynamika rozwoju roztoczy między klimatem umiarkowanym a podzwrotnikowym i tropikalnym z wyraźną tendencją do niższego wzrostu populacji roztoczy w warunkach tropikalnych (De Jong i wsp. 1984, Moretto i wsp. 1991, Eguaras i wsp. 1994, Garcia-Fernandez i wsp. 1995, Rosenkranz i wsp. 2006). Niższy wzrost populacji roztoczy w klimacie podzwrotnikowym i tropikalnym jest ciekawy. Zgodnie z całoroczną wymianą pokoleń pszczoł w tym klimacie, reprodukcja roztoczy nie ma przerwy w stosunku do klimatu umiarkowanego. Pokazuje to możliwy kompromis między dostępnością czerwii w rodzinach a śmiertelnością roztoczy w klimacie podzwrotnikowym i tropikalnym. W klimacie umiarkowanym główne straty rodzin z powodu warrozy występują jesienią i zimą, gdy następuje spadek populacji gospodarza w stosunku do pasożyta, a pszczoły zimowe są uszkodzone przez pasożyty (Amdam i wsp. 2004). Możemy przyjąć, że w krótkim czasie spada liczba pszczoł i to zagraża istnieniu rodziny pszczelej, a nie wzrost populacji pasożytów. Osobnym problemem jest jeszcze poziom śmiertelności roztoczy w lecie i zimie. Badanie osypów martwych pszczoł z pasożytami i stopnia porażenia pszczoł żywych początkiem lutego nie wykazało różnic między liczbą pasożytów martwych i tych, które pozostały w rodzinach pszczelich. Jednak nie można stwierdzić, czy śmiertelność pasożytów była naturalna, czy związana ze śmiertelnością pszczoł (Fries i Perez-Escala 2001).

Jedną ze strategii gospodarza przeciwko roztoczom jest naturalny podział rodziny zwany rojeniem się pszczoł, którego konsekwencją jest podział roztoczy w rodzinie. Okazuje się, że średnio $25 \pm 9\%$ roztoczy opuściło rodziny z rojami naturalnymi, a $75 \pm 9\%$ pozostało w rodzinie macierzystej (Wilde i wsp. 2005). Badania na izolowanej wyspie wykazały, iż pod koniec sezonu stopień porażenia roju i rodziny macierzystej był podobny na co ma wpływ dobry rozwój roju i spowolnienie rozwoju w rodzinie macierzystej po wydaniu roju (Fries i wsp. 2003). Kolejną strategią ograniczającą rozwój *Varroa destructor* jest skrócenie okresu czerwii pod zasklepem, co zmniejsza liczbę dorosłych roztoczy, ale jednocześnie pozwala

wydać o jedno pokolenie roztoczy więcej w sezonie co może zniwelować zamierzony efekt takiego działania (Martin 1998).

4.2.3. Naturalna odporność pszczół na warrozę

Naturalna odporność pszczoły miodnej na *Varroa destructor* odgrywa istotną rolę w jej przeżyciu. System naturalnej odporności tworzą mechanizmy rozpoznawania i likwidacji pasożytów. *Apis cerana* niszczy pasożytnicze w sposób mechaniczny, natomiast *Apis dorsata* uwalnia się od pasożytów przez oczyszczanie się z organizmów. U *Apis mellifera* jednym z mechanizmów obronnych jest usuwanie komórek czerwii porażonego przez pasożyty (Chmielewski i wsp. 2007). W odporność przeciwko roztocom zaangażowane są struktury anatomiczne okrywy ciała i tchawek. Ważną rolę w odporności na *Varroa destructor* u *Apis cerana* odgrywa odporność behawioralna (Koeniger i wsp. 1981, Boecking 1992, Narayanappai wsp. 2003). Wielokierunkowe działanie uszkadzające czerw i pszczoły pozwala na zaistnienie kilku mechanizmów obronnych redukujących skutki działania pasożytów. Zalicza się do nich działanie oczyszczające (ang. grooming behaviour), usuwanie pasożytów z porażonego czerwii przez pszczoły robotnice, różnice w atrakcyjności czerwii dla roztoczy (czerw robotnic, czerw trutowy). Mechanizmem obronnym jest również skrócenie cyklu rozwojowego pszczoły, co uniemożliwia pełny rozwój *Varroa destructor*. *Apis cerana* ma zdolność czyszczenia swojego ciała z pasożytujących pasożytów niszcząc je mechanicznie i usuwając poza rodzinę. Okresowy brak czerwii, również ogranicza liczbę pasożytów w rodzinach (Rozenkrantz i wsp. 1993). Porażony czerw trutowy jest niezasklepiany przez robotnice, co powoduje że ginie wraz z roztoczami (Rozenkrantz i Tewarson 1992). Tolerancją na pasożyty cechują się pszczoły afrykańskie i europejskie w Tunisie, Brazylii i Urugwaju. Charakteryzuje się to zredukowaną płodnością roztoczy na czerwii trutowym. U pszczół azjatyckich krótki okres rozwoju czerwii w zasklepionych komórkach limituje rozwój roztoczy. Różnice we wrażliwości na inwazję między pszczółami *Apis mellifera carnica* a *Apis mellifera capensis* oraz *Apis mellifera ligustica* w porównaniu z hybrydami *Apis mellifera monticola* mają związek z krótszym okresem rozwoju (Moritz i Mautz 1990, Thrybom i Fries 1991, Wilde i Koeniger 1992). Różnice w tolerancji warrozy między *Apis mellifera* a *Apis cerana* wynikają ze zmniejszonej zdolności oczyszczania się z pasożytów, oraz słabego usuwania pasożytów z zasklepionych komórek z czerwem pszczelim i trutowym u pszczół europejskich.

4.2.4. Stosowane leki do ograniczania pasożyta w rodzinach pszczelich

W 1970 kiedy pojawił się pasożyt w Europie rozpoczęto efektywne jego zwalczanie poprzez wprowadzanie substancji takich jak: bromopropylat, fluwalinat, amitraz i kumafos. W 1995 roku zaobserwowano w Europie południowej występowanie pierwszych objawów oporności roztoczy na fluwalinat i na inne pyretroidy np. flumetrynę (Milani 1995, Hillesheim i wsp. 1996). W USA mimo przemiennego stosowania środków roztocza uodporniły się również na kumafos i amitraz (Milani 1999, Elzen i wsp. 2000). Oznacza to że nie ma leków o 100% skuteczności (tabela 3). Leki które zabijają podatne osobniki prowadzą do ostrej selekcji i powodują z czasem powstawanie roztoczy nowej generacji, opornych na stosowane środki. Brak skutecznych leków do zwalczania roztoczy pozwala na wzrost populacji do poziomu powodującego upadek rodzin: bezpośrednio przez liczbę roztoczy przypadających na pszczołę i pośrednio przez zmniejszenie odporności pszczół, co stwarza sprzyjające warunki do rozwoju wirusów. Badania nad synergicznym działaniem fluwalinatu i kumafosu wykazały duży wzrost toksyczności fluwalinatu dla młodych pszczół w rodzinach, które były wcześniej leczone kumafosem. Śmiertelność może wystąpić w związku z obecnymi w ulu subletalnymi dawkami kumafosu (Johnson i wsp. 2009). Zwiększanie dawek i aplikacji chemicznych prowadzi do zwiększania pozostałości leków w ulu. Ilość i liczba rozpuszczalnych w tłuszczach pozostałości leków może przechodzić do produktów pszczelich spożywanych przez ludzi (Wallner 1999, Bogdanow 2006, Martel i wsp. 2007, Czekońska 2009). Aby uniknąć pozostałości leków w miodzie, należy stosować je po zakończeniu zbiorów miodu. Jednak przy pożytkach późnych populacja roztoczy osiąga często jesienią krytyczny poziom dla zmniejszającej się rodziny pszczelej, co świadczy o zaburzeniu w koewolucji obu gatunków i doprowadza do ich upadków (Kefuss i wsp. 2004, Fries i wsp. 2006, Le Conte i wsp. 2007, Seeley 2007). Pszczoły, które przeżyły inwazję roztoczy nie posiadają cech odpowiednich dla współczesnego pszczelarstwa, takich jak produkcja miodu i łagodność (Buchler i wsp. 2010, Rinderer i wsp. 2010). Alternatywnymi substancjami do ograniczania populacji pasożyta są olejki eteryczne oraz tymol. Tymol gromadzi się w wosku, który staje się nieprzydatny dla pszczół na lata po zabiegu (Floris i wsp. 2004). Zastosowanie wosku z pozostałościami tymolu sprzyja powstaniu oporności *Varroa destructor*, co w połączeniu z pestycydami dostarczonymi z pokarmem może być śmiertelne dla pszczół (Colin i Belzunces 1992, Johnson i wsp. 2009).

Tabela 3. Leki warroabójcze występujące w Unii Europejskiej

Preparat (producent)	Substancja czynna	Ilość substancji czynnej w jednym zabiegu na rodzinę	Forma użytkowa	Terminy zabiegów	Nr pozycji w literaturze
Apiwarol (Biowet)	Amitraz	12,5 mg	Tabletka do spalania	Wiosna, jesień, rodziny bez czerwii	19
Biowar 500 (Biowet)	Amitraz	2 x 500 mg	Plastikowe paski	Jesień przez 8 tygodni	19
Baywarol (Bayer)	Flumetryna	4 x 3,6 mg	Plastikowe paski	Jesień lub wczesna wiosna 6 tygodni	13
Perizin (Bayer)	Kumafos	3,2% roztwór	Roztwór do polewania 2 x co tydzień (10 -50ml)	Jesienią po ostatnim miodobraniu	13
Apilife Var (L. Alf. Włochy)	Tymol, olej eukaliptusa kamfora	Brak informacji	Płytki nasączone substancjami	Jesień przez 8 tygodni	18
Apistan (Vita Europe)	Fluwalinat	Brak informacji	Plastikowe paski	Jesień lub wczesna wiosna 6 tygodni	159
Apiguard (Vita Europe)	Tymol	2 x 50 g	Żel 2 x co 2 tygodnie	Wiosna lub późne lato po miodobraniu	159
Apivar (Blove)	Amitraz	2 x 0,5 g	Plastikowe paski	Jesień i przełom wiosny i lata	5
Gabon PF 90 (Beedol Czechy)	Fluwalinat	2 x 90 mg	Plastikowe paski	Jesienią po miodobraniu 4 tygodnie	14

Gabon PA 92 (Beedol Czechy)	Acrinathrin a	2 x 1,5 mg	Plastikowe paski	Jesienią po miodobraniu 4 tygodnie	14
Beevital Hive Clean (Austria)	Sacharoza, kwasy org., propolis, olejki eter.	Brak informacji	Roztwór do polewania 3 x co tydzień (15ml)	Wiosną, latem, jesienią	16
Bienen Wohl (Niemcy)	sacharoza kwasy org., propolis, olejki eter.	29% 5,1% 2,0% 0,05%	Roztwór do polewania 3 x co tydzień (15ml)	Wiosną, latem, jesienią	111

Wykorzystywanie olejków eterycznych i kwasów organicznych do ograniczania populacji warrozy, wykazuje działanie higienizujące i roztaczobójcze (Ardeshtir i wsp. 2002). Jednocześnie może prowadzić do niszczenia bakterii i grzybów korzystnych dla zdrowia rodziny pszczelej będące częścią systemu obronnego (Vasquez i wsp. 2009). W ostatnich latach z powodu zmniejszonej skuteczności leków kwasy organiczne (mrówkowy, mlekowy, szczawiowy) są coraz częściej stosowane i traktowane jako alternatywa do ograniczania populacji *Varroa destructor*. Skuteczność tych zabiegów jest bardzo zróżnicowana i uzależniona od sytuacji panującej w rodzinie pszczelej (tabela 4).

Tabela 4. Charakterystyka stosowania kwasów organicznych przeciwko *Varroa destructor*

Kwas	Stężenie [%]	Ilość na rodzinę [ml]	Zalecana pora stosowania	Skuteczność [%]	Literatura
Mrówkowy	83 lub 65	100 - 180	wiosna lato	> 70 93,6 - 100	Lindberg i wsp. 2000 Satta i wsp. 2005
Mlekowy	15	100 - 120	lato, jesień	98 94,2 - 99,8 83	Kraus 1992, Kraus i Berg 1994, Mutinelli i wsp. 1996
Szczawiowy	3-3,5	25 - 35	lato jesień	93,4 69	Akyol i Yeninar 2009 Howis i wsp. 2011

5. MATERIAŁ I METODY

5.1. Materiał zwierzęcy i harmonogram wykonanych badań

Materiał badawczy stanowiły pszczoły rasy kraińskiej *Apis mellifera carnica* utrzymywane w ulach na ramce Dadanta. W 2008 i 2009 roku do badań dynamiki populacji *Varroa destructor*, monitoringu mikroklimatu rodzin pszczelich podczas stosowania kwasów organicznych oraz ich wpływu na stan histologiczny jelita środkowego wykorzystywano 10 rodzin produkcyjnych od momentu ich utworzenia (odkładów) po jednej linii matek reprodukcyjnych (troisek niemiecki). W następnych 2 latach na rodzinach produkcyjnych rasy kraińskiej prowadzono badania: monitoring mikroklimatu rodzin pszczelich, wpływ kwasów organicznych na stan histologiczny i aktywność enzymatyczną jelita środkowego (rok 2010) oraz obserwacje wzrostu populacji pasożytów (rok 2011). Przynależność rasowa wykorzystywanych w badaniach pszczół została potwierdzona odległością dystansu genetycznego w programie "Skrzydłak" (Gerula i wsp. 2009). Układ badań i obserwacji wykonanych w latach 2008 – 2011 przedstawia tabela 5.

Tabela 5. Harmonogram wykonywanych badań w poszczególnych latach doświadczeń (w nawiasach podano liczbę badanych rodzin pszczelich = n)

Rok	Obserwacje wzrostu populacji <i>V. d.</i>	Stosowanie kwasów organicznych		
		Monitoring mikroklimatu rodziny pszczelej	Badania histologiczne jelita środkowego	Badania aktywności enzymatycznej jelita środkowego
2008	+ (10)	-	-	-
2009	+ (10)	+ (8)	+ (8)	-
2010	-	+ (2)	+ (8)	+ (14)
2011	+ (10)	-	-	-

5.2. Szacowanie liczebności populacji pasożyta *Varroa destructor* w rodzinach pszczelich

W badaniach przeprowadzonych w 2008 i 2009 roku do określenia wzrostu populacji pasożytów w rodzinach od momentu utworzenia rodzin (odkłady) do początku drugiej zimowli użyto 10 rodzin pszczelich utrzymywanych w ulach Dadanta (ramka 435 x 300 mm) z siatkowaną dennicą. Odkłady wykonano w połowie maja 2008 roku z młodymi matkami po jednej linii matek (troisek niemiecki).

Jako miernik poziomu populacji pasożytów *Varroa destructor* w rodzinach pszczelich przyjęto osyp pasożyta w okresie jesiennym spowodowany zastosowaniem środka komercyjnego do usuwania roztoczy. Zastosowano preparat Beevital Hive Clean (F&B Ges. m. b. H., - Austria), który jest dopuszczony do stosowania w pasiekach ekologicznych. W skład preparatu wchodzi: woda, sacharoza, kwas szczawiowy i cytrynowy, ekstrakt propolisu i olejków eterycznych. Preparat ten był wkrapiany w uliczki gniazdowe i w zależności od siły rodziny pszczelej stosowano 15 - 20 ml/rodzinę (zgodnie z zaleceniami producenta). Preparat zastosowano 3 krotnie w odstępach siedmio-dniowych: 22.09., 29.09., 6.10.2008 oraz 8.09., 15.09., 22.09.2009. Roztocza pod wpływem zastosowanego zabiegu osypywały się i przyklejały się do wkładek dennicowych Beevital Board (z klejem) umieszczonych pod siatką dennic.

W 2008 roku liczono osypane pasożyty po pierwszej, trzeciej i siódmej dobie od momentu zastosowania preparatu. Natomiast w 2009 osyp liczono po siedmiu dobach od zastosowania preparatu. Po czterech tygodniach od zakończenia liczenia osypów (11.11.2008 i 5.11.2009) oszacowano liczbę pszczół w poszczególnych rodzinach wykonując fotografie plastrów z pszczołami, a następnie licząc pszczoły na uzyskanych fotografiach. Równocześnie pobrano próbki pszczół (250 - 300 szt.) z centrum gniazda w celu określenia stopnia porażenia rodzin metodą flotacji: po zważeniu próbek pszczół, były one zalewane wodą do połowy objętości naczynia z dodatkiem kilku kropel detergentu (płynu do mycia naczyń). Całość była wytrząsana przez około 10 minut i wylewana na podwójne sito a następnie przemywana silnym strumieniem wody tak aby na górnym sicie (duże oczka) zostały pszczoły, a na dolnym (małe oczka) roztocza. Po policzeniu roztoczy obliczano stopień porażenia wg wzoru:

$$\text{Stopień porażenia [\%]} = (\text{liczba roztoczy [szt]} / \text{masa pszczół [g]}) \times 10$$

Populację pasożyta po pierwszym i drugim sezonie pszczelarskim oszacowano stosując dwa wskaźniki: (1) sumę osypanych pasożytów po zastosowaniu preparatu [szt./rodzinę] oraz (2) liczbę pasożytów pozostałych w rodzinach do zimowli oszacowaną na podstawie stopnia porażenia rodzin i liczby pszczół w poszczególnych rodzinach [szt./rodzinę].

W badaniach wykonanych w 2011 roku na 10 rodzinach określono naturalny przyrost populacji roztoczy w rodzinach produkcyjnych (matki w wieku 1 - 2 lata) po głównym lipcowym pożytku. Obserwacje polegały na cotygodniowym liczeniu osypów naturalnych roztoczy od sierpnia do połowy października. W celu uzyskania kolejnych osypów zastosowano 3,2% roztwór kwasu szczawiowego (11.10.2011) oraz 3-krotne (25.10., 2.11.,

9.11.) odymienie rodzin preparatem Apiwarol AS (Biowet, Puławy; 12,5mg amitrazy/zabieg). Do spalania zastosowano elektryczny odymiacz Varrojet (Pcelindo - Serbia). Podczas odymiania i przez 20 minut po zabiegu otwór wylotowy ula był zamknięty, zgodnie z zaleceniami producenta. Przez cały okres (sierpień – listopad) monitorowano co tydzień osypy pasożytów w rodzinach pszczelich, które były podstawą do oszacowania populacji pasożytów ginących i usuwanych naturalnie z rodzin pszczelich w drugiej połowie lata oraz populacji usuniętych po zastosowaniu preparatów warroabójczych. Ocena populacji pasożytów w rodzinach była porównywana do wyników przezimowania rodzin do następnego sezonu.

5.3. Badanie mikroklimatu rodziny pszczelej

Monitorownie mikroklimatu rodziny pszczelej było prowadzone przy pomocy zainstalowanego systemu pomiarowego w pasiece, który działał bezobsługowo i bezprzewodowo. System ten pozwalał na wykonywanie pomiarów takich wielkości fizycznych jak: temperatura, wilgotność, stężenie dwutlenku węgla bez konieczności otwierania ula - system bezprzewodowego monitoringu mikroklimatu rodziny pszczelej (Howis i wsp. 2010). Dodatkowo system umożliwiał pomiar masy badanych uli. Monitoring mikroklimatu rodzin pszczelich był prowadzony równocześnie w dwóch rodzinach pszczelich. Gromadzone dane zapisywane były w bazie danych komputera PC. Transmisja danych pomiędzy ulami a serwerem odbywała się bezprzewodowo w dozwolonym paśmie 2.4 GHz. Dane wymieniane były tylko z serwerem, który w uśpieniu czekał na przesłanie danych z rodzin pszczelich w zadanych odstępach czasu. W chwili odebrania danych pomiarowych „z wnętrza ula”, serwer wykonywał dodatkowo pomiary zewnętrznych warunków atmosferycznych za pomocą dołączonych do niego czujników temperatury, wilgotności względnej oraz ciśnienia atmosferycznego. Pozwalało to na ocenę wpływu warunków środowiska zewnętrznego na mikroklimat wewnątrz rodziny pszczelej. Dane techniczne zastosowanych czujników przedstawione zostały w tabeli 6. Czujniki znajdowały się w oddzielnych plastikowych obudowach umieszczonych we wnętrzu ula. Każdy z dwóch monitorowanych uli był ustawiony na wadze pasiecznej. Płyta główna z czujnikami zamontowana była na ramce z plastrem pszczelim w centralnej części ula (fot.1). Taka lokalizacja płyty głównej w centrum rodziny, pozwalała na wykonywanie pomiarów w głównym obszarze aktywności pszczół. Poza pomiarami temperatury, wilgotności względnej i stężenia dwutlenku węgla w centralnej części rodziny zastosowano także dodatkowy czujnik temperatury zlokalizowany na wewnętrznej krawędzi ramki (plastra).

Częstotliwość pomiarów mikroklimatu rodzin podczas stosowania kwasów organicznych była wykonywana co godzinę dla temperatury i wilgotności względnej, dwa razy na dobę dla stężenia CO₂, a masa ula była ważona raz na dobę.

Tabela 6. Zakresy pomiarowe i dokładności czujników na podstawie danych katalogowych producentów.

Czujnik	Jednostka	Zakres pomiarowy	Dokładność
Temperatury	°C	[-55.0;+125.0]	±0.5°C
Wilgotności względnej	%	[10;95]	±5%
Stężenia dwutlenku węgla	ppm	[400;40000]	±20%
Masy	kg	[0.1;100.0]	±0.1kg
Ciśnienia atmosferycznego	hPa	[150;1150]	±2%



Fot. 1. Płyta główna z czujnikami zamontowana na ramce z plastrzem pszczelim w centralnej części gniazda (fot. M. Howis)

5.4. Preparaty histologiczne jelit środkowych pszczół robotnic

5.4.1. Przygotowanie materiału do badań histologicznych

Pszczół wygryzały się przez dobę w cieplarni i po oznakowaniu kolorowym pisakiem (do znakowania matek pszczelich) były wpuszczane do rodzin pszczelich, w których zastosowano kwasy organiczne.

Kwasy (mrówkowy, mlekowy, szczawiowy) były stosowane w rodzinach pszczelich sukcesywnie od sierpnia do października zgodnie z zaleceniami ich stosowania opisanymi w literaturze (Akyol i Yeninar 2009, Chorbiński 2008 i 2012, Satta i wsp. 2005, Kraus i Berg 1994). Pierwszy zastosowano kwas mrówkowy o stężeniu 65% i 83% w objętości 100ml w dozowniku z Nassenheide (inaczej dozowniku Beckera). Kwas mrówkowy zastosowano ogółem w 4 rodzinach (65% - 2 szt. i 83% - 2 szt.) – tabela 7.

Tabela 7. Układ stosowania kwasów w rodzinach pszczelich od sierpnia do listopada 2009

Rodzina	Kwas	Sekwencja czasowa	
	mrówkowy	2 tygodnie	2 tygodnie
1	65%	kontrolna	doświadczalna
2		doświadczalna	kontrolna
3	83%	kontrolna	doświadczalna
4		doświadczalna	kontrolna
	mlekowy	1 tydzień	1 tydzień
1	15%	kontrolna	doświadczalna
2		doświadczalna	kontrolna
	szczawiowy	1 tydzień	1 tydzień
1	3,2%	kontrolna	doświadczalna
2		doświadczalna	kontrolna

Następnie w październiku w kolejnych dwóch rodzinach zastosowano roztwór 15% kwasu mlekowego w ilości 100ml/rodzinę spryskując plastry z pszczołami. W listopadzie w kolejnych dwóch rodzinach zastosowano roztwór kwasu szczawiowego 3,2% w syropie cukrowym w ilości 25 - 30ml/rodzinę wkrapiając go w uliczki między ramkowe z pszczołami.

W sierpniu 2010 roku zastosowano kwasy organiczne (mrówkowy 65%, mlekowym 15%, szczawiowy 3,2%) w celu wykonania preparatów histologicznych według podobnego układu jak w 2009 roku – tabela 8.

Tabela 8. Układ stosowania kwasów w rodzinach pszczelich - sierpień 2010

Grupa /kwas	Liczba rodzin	Pobieranie prób w dobie życia:		
		2 - ej	6 - tej	11 - tej
Mrówkowy 65%	2	+	+	+
Mlekowy 15%	2	+	+	+
Szczawiowy 3,2%	2	+	+	+
Kontrola	2	+	+	+

Czas ekspozycji rodzin pszczelich na działanie kwasów organicznych był różny. Dawka kwasu mrówkowego była odparowywana przez okres około jednego tygodnia, natomiast dawka kwasów mlekowego i szczawiowego była aplikowana w całości jednorazowo. Do wykonania preparatów histologicznych z jelit środkowych pszczół robotnic pobierano nie mniej niż 10 znakowanych pszczół w tym samym wieku z jednej rodziny. W 2009 roku przy stosowaniu kwasu mrówkowego pobierano pszczoły w 1, 3, 7 i 14-tej po zastosowaniu tego kwasu (odpowiednio: 2, 4, 8 i 15 - tej dobie życia pszczół), natomiast w 1, 3 i 7 dobie po zastosowaniu kwasu mlekowego i szczawiowego (odpowiednio: 2, 4 i 8 - ej doba życia pszczół). Pszczoły były uśmiercane poprzez 10 minutowe mrożenie, a następnie przewody pokarmowe pszczół były wypreparowane (fot. 2). W roku 2010 pszczoły do badań histologicznych pobierano z rodzin w 1, 5 i 10 - tej dobie po zastosowaniu kwasów organicznych i z rodzin kontrolnych (odpowiednio w sierpniu: 2, 6 i 11 - tej dobie życia pszczół).



Fot. 2. Wypreparowane pojedyncze przewody pokarmowe pszczół robotnic (fot. M. Howis)

5.4.2. Wykonywanie i ocena preparatów histologicznych

Wypreparowane przewody pokarmowe pszczół do badań były wiązane w pęczki (co najmniej 10 sztuk na rodzinę i grupę wiekową - fot. 3) utrwalano w formalinie Bekera. Badanie histologiczne wykonano techniką parafinową, a z uformowanych bloczków parafinowych zawierających jelita środkowe pszczół robotnic krojono mikrotomem skrawki o grubości 7µm. Preparaty histologiczne były barwione metodą AZAN oraz H & E (hematoksyliną i eozyną) (Bagiński 1969, Sawicki 2005). Wykonane preparaty były obserwowane w mikroskopie świetlnym przy powiększeniu (10 x 20). W ocenie preparatów brano pod uwagę: wypełnienie jelit ziarnami pyłku, budowę i stan funkcjonalny enterocytów (m. in. wielkość i wybarwienie jąder komórkowych i obecność rąbka szczoteczkowego), a także poziom wytworzenia błon perytroficznych (tabela 9).



Fot. 3. Wypreparowane przewody pokarmowe pszczół przygotowane do utrwalenia w formalinie Bekera (fot. M. Howis)

Tabela 9. Charakterystyka badanych cech histologicznych

Badany element histologiczny	Możliwy opis
Enterocyty	prawidłowe, złuszczenie i obrzmienie jąder, przejaśnienie chromatyny jądrowej
Ziarnistości w enterocytach	brak, obecne - widoczne,
Rabek szczoteczkowy	Widoczny, nie widoczny
Błony perytroficzne	skąpe, prawidłowe, zwiększone wytwarzanie
Aktywność centrów regeneracyjnych	brak światła, rozplem, podwyższona aktywność
Wakuolizacja	brak, widoczna
Cewki malpighiego	puste, widoczne obrzmienie
Dystrofia komórek nabłonkowych	brak, ślady dystrofii, widoczna dystrofia

5.5. Badanie aktywności enzymatycznej jelita środkowego pszczół robotnic

Badanie aktywności enzymatycznej jelita środkowego zostało przeprowadzone w 2010 roku w dwóch okresach. Pierwszy okres w sierpniu obejmował badanie aktywności enzymatycznej u pszczół (po wygryzieniu się z dokładnie określonym wiekiem). Pszczoły wygryzały się w cieplarni przez dobę, następnie były znakowane i wpuszczane do rodzin pszczelich, które następnie były poddane ekspozycji na kwas. Stosowano kwasy organiczne (mrówkowy 65%, mlekowym 15%, szczawiowy 3,2%). W obrębie ekspozycji na jeden kwas badane były pszczoły z dwóch rodzin oraz z dwóch rodzin kontrolnych. Pobierano próbki pszczół do badań w 1, 5 i 10 dobie od zastosowania kwasu (odpowiednio: 2, 6 i 11 - tej dobie życia pszczół) – tabela 10.

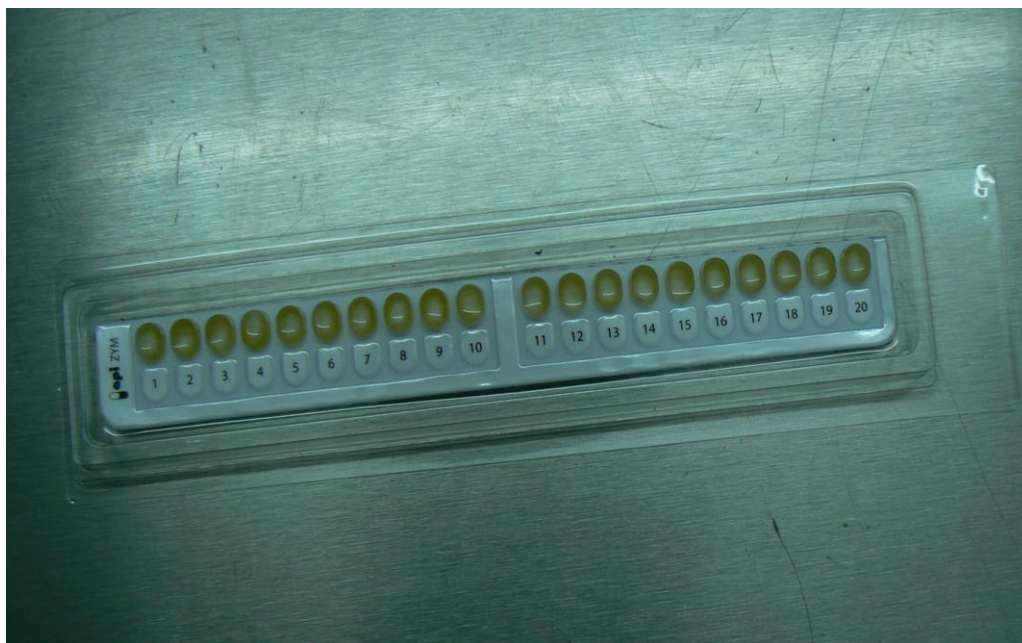
W drugim okresie badanie aktywności enzymatycznej jelita środkowego wykonano w październiku (pierwsza połowa). Pobierano próbki pszczół przygotowanych do zimowli w 1, 5 i 10 dobie od zastosowania kwasu. W każdej grupie były po dwie rodziny pszczele (suma $n = 6$ rodzin $\times$ 3 okresy badawcze), a grupę kontrolną stanowiły pszczoły pobrane z rodzin pszczelich przed zastosowaniem kwasów ($n = 6$ rodzin) – tabela 10.

W sumie przeprowadzono 48 testów enzymatycznych w dwóch okresach badawczych na pszczołach o określonym wieku (sierpień) oraz na pszczołach przygotowanych do zimowli (październik).

Tabela 10. Liczba rodzin i okresy badania aktywności enzymatycznej jelita środkowego pszczół robotnic poddanych ekspozycji kwasów organicznych

Grupa/kwas	Sierpień 2010			Październik 2010			
	<u>Po dobie:</u>			<u>Po dobie:</u>			
	1 – ej	5 – tej	10 – tej	Kontrola	1 – ej	5 – tej	10 - tej
Mrówkowy	2	2	2	2	2	2	2
Szczawiowy	2	2	2	2	2	2	2
Mlekowy	2	2	2	2	2	2	2
Kontrola	2	2	2	-	-	-	-
Ogółem	8	8	8	6	6	6	6

W rodzinach zastosowano kwasy organiczne: mrówkowy (65%), szczawiowy (3,2%), mlekowy (15%), w ilościach zalecanych w literaturze do ograniczania populacji roztoczy *Varroa destructor* (Akyol i Yeninar 2009, Chorbiński 2008 i 2012, Satta i wsp. 2005, Kraus i Berg 1994,). Materiał stanowiły wypreparowane jelita środkowe pszczół robotnic po 1-szej, 5-tej i 10-tej dobie ekspozycji rodzin pszczelich na kwas. Analizowano każdorazowo 10 jelit środkowych pszczół pobranych z centrum gniazda każdej rodziny pszczelej. Do badania wykorzystano zestaw API ZYM 25 200 (Biomerieux, Francja), który określa aktywność 19 enzymów rozkładających: tłuszcze (n = 6) (fosfataza alkaliczna, esteraza C4, esteraza lipaza C8, lipaza C14, kwaśna fosfataza, fosfohydrolazanaftylo-AS-BI), białka (n = 5) (arylamidaza leucyny, arylamidaza waliny, arylamidaza cystyny, tripsyna, α -chymotrypsyna) i cukry (n = 8) (α -galaktozydaza, β -galaktozydaza, β -glukuronidaza, α -glukozydaza, β -glukozydaza, N-acetylo- β -glukozamidaza, α -mannozydaza, α -fukozydaza). API ZYM jest półilościową mikrometodą opracowaną do badania aktywności enzymatycznej i jest stosowaną do oceny materiałów biologicznych (mikroorganizmów, zawiesin tkanek, komórek, płynów, itp.). Pozwala on na badanie reakcji enzymatycznych przy użyciu małych ilości materiału biologicznego. Zestaw składa się z paska z 20 mikroprobówkami (studzienkami), zawierającymi substrat enzymatyczny i bufor (fot. 4). Ostateczny produkt metabolizmu wytwarzany w trakcie inkubacji jest wykrywany dzięki reakcji barwnej, która zachodzi po dodaniu odczynników.



Fot. 4. Zestaw testu enzymatycznego przygotowany do inkubacji (fot. M. Howis)

Badanie aktywności enzymatycznej jelit środkowych w sierpniu i październiku 2010 roku odbywało się w 1-szej, 5 - tej i 10 - tej dobie od zastosowania kwasów oraz w grupie kontrolnej. Materiał biologiczny - minimum 10 jelit środkowych, młodych pszczoł robotnic (sierpień 2010) i pszczoł dorosłych przygotowanych do zimowli (październik 2010)) był rozcierany w emulgatorze mechanicznym z dodatkiem 2ml wody destylowanej. Pasek testu umieszczano w komorze inkubacyjnej z 5ml wody destylowanej i pipetą nanoszono po 65 μ l materiału (roztartych jelit pszczoł) do każdej studzienki. Następnie materiał był inkubowany w cieplarni przez 4 godziny 15 minut $\pm$ 15 minut w temperaturze 37°C. Po inkubacji do każdej studzienki dodawano po 1 kropli odczynników ZYM A a następnie ZYM B. Po 5 minutach odczytywano wynik barwny reakcji enzymatycznej w zakresie wartości od 0 do 5. Intensywność zabarwienia 0 odpowiada braku reakcji, natomiast intensywność barwy 5 odpowiada maksymalnej reakcji enzymatycznej. Wartości 3, 4, 5 były uważane za reakcje o wyniku dodatnim (fot. 5).



Fot. 5. Zestaw testu enzymatycznego po reakcji barwnej przygotowany do odczytu wyników
(fot. M. Howis)

5.6. Opracowanie wyników

Wyniki zostały przedstawione w formie opisowej, tabelarycznej, na wykresach oraz fotografiach. Podstawowe analizy statystyczne wykonano przy użyciu pakietu statystycznego Statistica v. 9.0. Uzyskane dane liczbowe przedstawione zostały w postaci wartości średnich $\pm$ SD oraz min – max.

Relacje między pasożytnictwem (liczba pasożytów) a rodziną pszczelą (liczba pszczół i czerwiu oraz wydajność miodowa) zostały zanalizowane przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji i scharakteryzowane współczynnikami korelacji Paerson'a.

Wyniki dotyczące badań histologicznych zostały przedstawione w formie opisowej i udokumentowane fotograficznie przedstawiając obrazy mikroskopowe prawidłowej budowy jak i zaobserwowane zmiany w przekrojach poprzecznych ściany jelit środkowych pszczół robotnic.

Wyniki badania aktywności enzymatycznej jelita środkowego pszczół robotnic zostały poddane analizie wariancji jednoczynnikowej, a różnice między grupami zostały zweryfikowane stosując test rozstępu Duncana. Relacje między poziomem aktywności 19 badanych enzymów w grupach pszczół po ekspozycji na kwasy organiczne zostały scharakteryzowane współczynnikiem korelacji Paerson'a, porównującym zależności między enzymami do grupy kontrolnej.

6. WYNIKI

6.1. Badanie dynamiki rozwoju populacji *Varroa destructor*

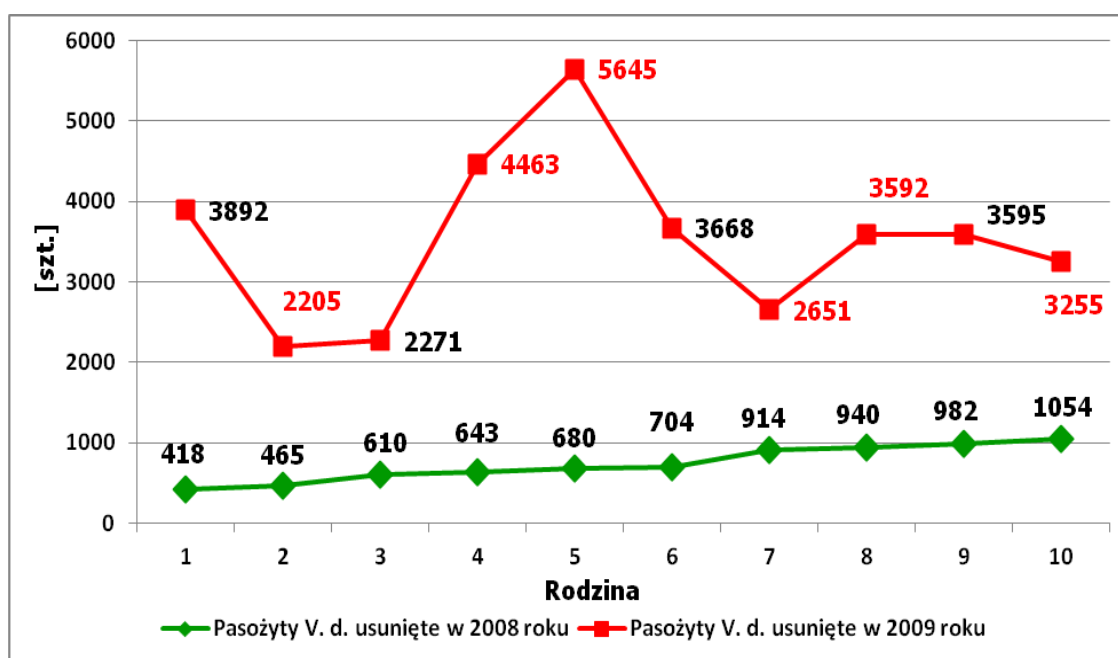
6.1.1. Populacja *Varroa destructor* w rodzinach pszczelich podczas dwóch sezonów od utworzenia odкладów

Porównywano nabudowanie się populacji *Varroa destructor* w rodzinach pszczelich w dwóch kolejnych sezonach (2008 i 2009). Przeprowadzone badania wykazały różnice między rodzinami w wielkości populacji pasożytów w pierwszym i drugim roku funkcjonowania rodzin pszczelich. Populacja usuniętych pasożytów z rodzin w pierwszym roku ich funkcjonowania (rok 2008 - utworzenie odкладów) w trakcie stosowania preparatu Beevital Hive Clean (22.09 – 13.10.2008) wynosiła od 418 do 1054 (wykres 1). Była to liczba pasożytów jaka namnożyła się od połowy maja i przeżyła do września 2008 roku. W listopadzie 2008 roku określono stopień porażenia rodzin przygotowanych do zimowli na średnim poziomie 0,97 pasożyta na 100 pszczół. W poszczególnych rodzinach populacja *Varroa* na początku zimowli wynosiła średnio 62,1 osobników (tabela 11). Po drugim sezonie funkcjonowania rodzin (8.09. – 29.09.2009) liczba usuniętych pasożytów wyniosła od 2205 do 5645 szt./rodzinę (wykres 1). Była to populacja pasożytów jaką zastano po 12 miesiącach funkcjonowania rodzin pszczelich i która została usunięta preparatem Beevital Hive Clean. Skuteczność tego preparatu została określona na poziomie 91,6% (Howis i Nowakowski 2009). Część populacji pasożyta pozostała w rodzinach i w listopadzie 2009 roku stopień porażenia tych rodzin był na średnim poziomie 47,6 pasożytów na 100 pszczół (tabela 11). Większy stopień porażenia rodzin w 2009 roku był spowodowany różną powierzchnią czerwii krytego w rodzinach podczas usuwania pasożytów. W 2008 było to 0,55 ramki (0,0 - 1,0), natomiast w 2009 roku 2,4 ramki Dadanta (1,0 - 4,0) powierzchni czerwii krytego. W konsekwencji w 2008 roku było to średnio 62 pasożyty, a w 2009 roku 486 osobników w rodzinach do zimowli. Siła rodzin pszczelich wyrażona liczbą pszczół w listopadzie była istotnie ($P \leq 0,001$) większa po pierwszym sezonie użytkowania (6421 szt.) w stosunku do drugiego (2495 szt.). Po pierwszym sezonie usunięto istotnie mniej pasożytów (741 szt.) niż po drugim sezonie (3524 szt.). Stopień porażenia rodzin pasożytami jak również liczba pasożytów pozostałych do zimowli były istotnie niższe ($P \leq 0,001$) w pierwszym sezonie użytkowania rodzin (tabela 11).

Tabela 11. Charakterystyka rodzin pszczelich i populacji *Varroa destructor* po pierwszym i drugim sezonie ich użytkowania

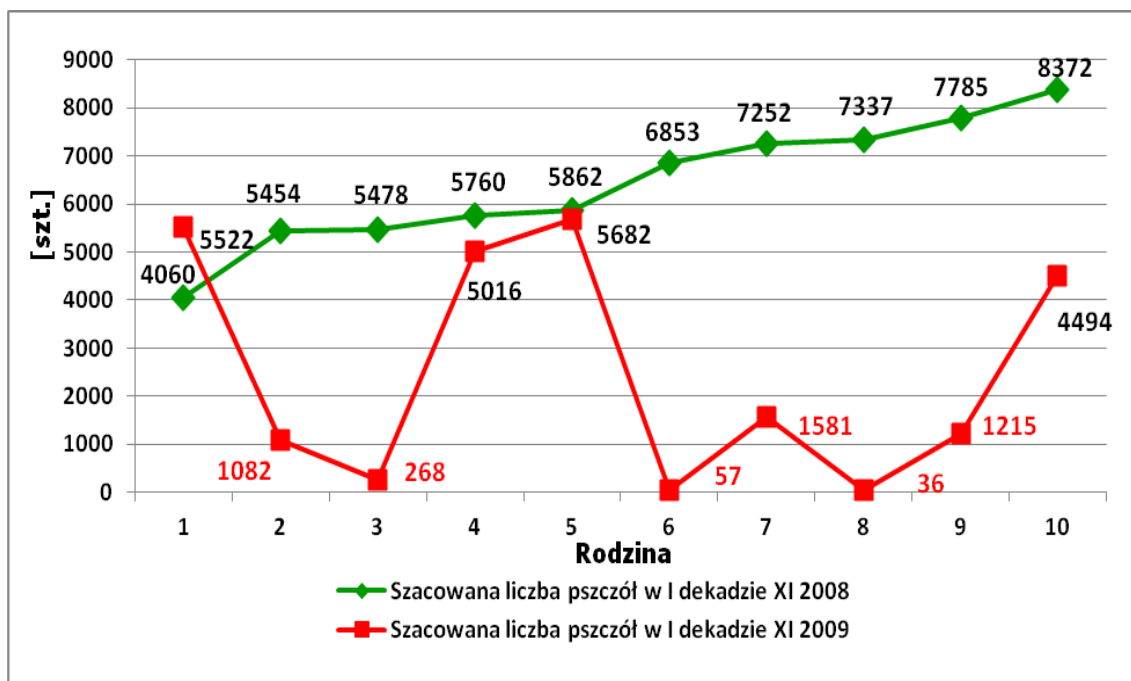
Badana cecha	Pierwszy sezon użytkowania rodzin (n = 10) - wartości średnie* $\pm$ SD	Drugi sezon użytkowania rodzin (n = 10) - wartości średnie* $\pm$ SD
Liczba pszczoł [szt.]	6421,30 ^A $\pm$ 1313,66	2495,30 ^B $\pm$ 2382,61
Liczba usuniętych <i>V. d.</i> [szt.]	741,00 ^A $\pm$ 220,59	3523,70 ^B $\pm$ 1037,65
Stopień porażenia rodzin <i>V. d.</i> w listopadzie [%]	0,97 ^A $\pm$ 0,48	47,57 ^B $\pm$ 34,44
Liczba <i>V. d.</i> do zimowli [szt.]	62,10 ^A $\pm$ 33,46	486,00 ^B $\pm$ 285,07

* średnie oznaczone różnymi literami są statystycznie istotne ($P \leq 0,001$)

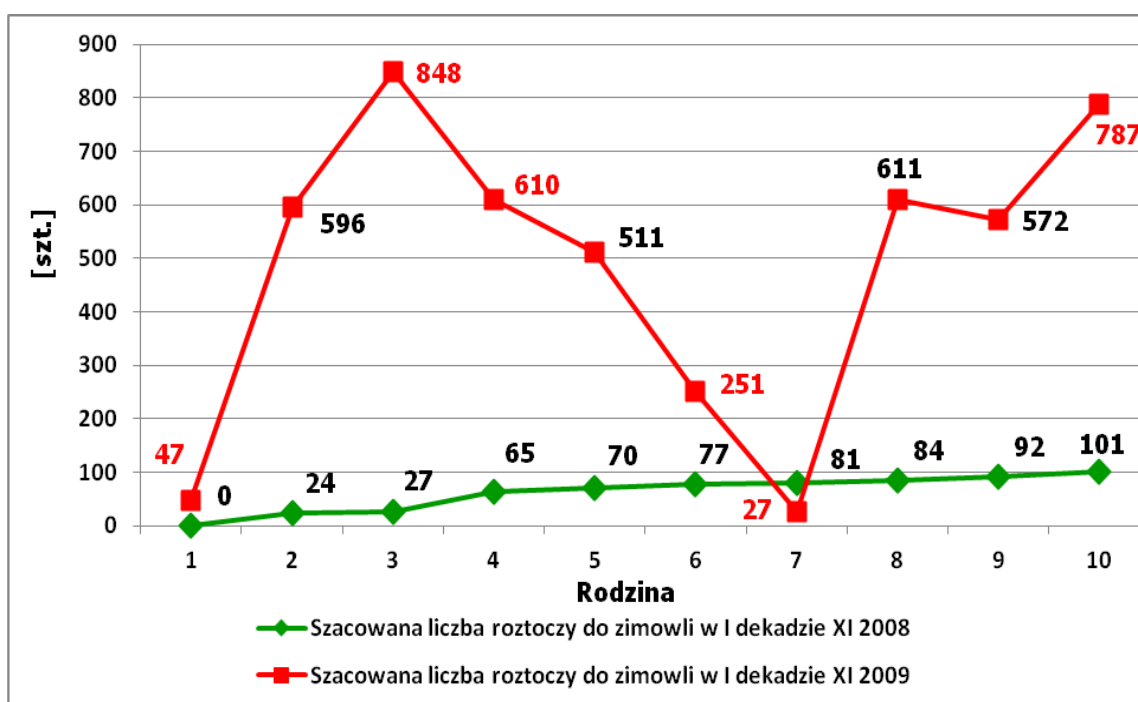


Wykres 1. Liczba usuniętych pasożytów w dwóch kolejnych sezonach - uporządkowanie według liczby pasożytów usuniętych w 2008 roku (czcionka czerwona oznacza rodziny które osypały się w 2009 roku)

Podczas badania stopnia porażenia rodzin pszczelich dokonano oszacowania liczby pszczoł w poszczególnych rodzinach i liczby pasożytów jaka pozostała w rodzinach do zimowli. W listopadzie 2008 liczba pszczoł w rodzinach wahała się od 4060 do 8372 sztuk, natomiast w 2009 roku od 36 do 5682 sztuk (wykres 2). Populacja roztoczy jaka została do zimowli w 2008 roku wynosiła od 0 do 101 sztuk, natomiast w 2009 roku od 27 do 847 sztuk (wykres 3).



Wykres 2. Szacowana liczba pszczół w dwóch kolejnych sezonach - uporządkowanie rodzin według liczby pszczół do zimowli w 2008 roku (czcionka czerwona oznacza rodziny które osypały się w 2009 roku)



Wykres 3. Szacowana liczba roztoczy do zimowli w dwóch kolejnych sezonach - uporządkowanie według liczby roztoczy w 2008 roku (czcionka czerwona oznacza rodziny które osypały się w 2009 roku)

Zimę 2008/2009 przetrwały wszystkie rodziny, natomiast w listopadzie 2009 roku zginęło 6 z 10 badanych rodzin. Przechimowały rodziny, które miały w listopadzie od 4494 do 5682 sztuk pszczoł, natomiast zginęły w 2009 roku zarówno rodziny, które miały do zimowli w 2008 roku do 30 pasożytów jak i powyżej 60 pasożytów, co świadczy o braku zależności między liczbą pasożytów do zimowli a przetrwaniem rodziny w kolejnym sezonie (wykres 2 i 3). Porównując badane cechy w rodzinach, które zginęły i w rodzinach, które przeżyły można stwierdzić, iż siła rodzin pszczelich wyrażona liczbą pszczoł w listopadzie była istotnie ($P \leq 0,001$) mniejsza w rodzinach, które zginęły (706,50 szt.) w stosunku do rodzin które przeżyły dwa sezony użytkowania (6066,21 szt.). Liczba usuniętych pasożytów *Varroa destructor* w grupie rodzin które zginęły była istotnie wyższa (3879 szt.) w stosunku rodzin które przeżyły dwa sezony użytkowania (1383,78 szt.) Stopień porażenia rodzin pasożytami do zimowli był istotnie wyższy ($P \leq 0,001$) w grupie rodzin, które zginęły (71,82 szt.) w stosunku do rodzin które przeżyły (3,89 szt.) (tabela 12).

Tabela 12. Charakterystyka rodzin pszczelich które zginęły po drugim sezonie i rodzin przetrwały które przetrwały dwa sezony użytkowania

Badana cecha	Rodziny które zginęły (n = 6) - wartości średnie* $\pm$ SD	Rodziny które przeżyły (n = 14) - wartości średnie* $\pm$ SD
Liczba pszczoł [szt.]	706,50 ^A $\pm$ 667,54	6066,21 ^B $\pm$ 1265,23
Liczba usuniętych <i>V. d.</i> [szt.]	3879,00 ^A $\pm$ 1047,29	1383,78 ^B $\pm$ 1150,65
Stopień porażenia rodzin <i>V. d.</i> w listopadzie [%]	71,82 ^A $\pm$ 19,22	3,89 ^B $\pm$ 4,90
Liczba <i>V. d.</i> do zimowli [szt.]	428,33 $\pm$ 367,61	207,93 $\pm$ 241,82

* średnie oznaczone różnymi literami są statystycznie istotne ($P \leq 0,001$)

Liczba usuniętych pasożytów w okresie jesiennym była dodatnio skorelowana ze stopniem porażenia i liczbą pasożytów w rodzinach na początku zimowli, odpowiednio $r = 0,79$ i $0,64$ ($P \leq 0,05$). Rodziny pszczele w których usunięto więcej pasożytów w okresie jesiennym charakteryzowały się mniejszą liczebnością pszczoł ($r = -0,75$; $P \leq 0,05$). Stopień porażenia rodzin w listopadzie był istotnie ujemnie skorelowany z liczbą pszczoł ($r = -0,92$; $P \leq 0,05$) (tabela 13). Równanie regresji opisujące tę zależność przyjęło postać:

$$y = 6283,32 - 75.212x \quad (r^2 = 0,84; P < 0,0001)$$

gdzie: y – liczba pszczoł w rodzinie do zimowli [szt.]

x – stopień porażenia pszczoł przez pasożyty [%]

Tabela 13. Korelacje między liczbą pszczoł i cechami charakteryzującymi populację pasożyta w rodzinach

Badane cechy	Liczba pszczoł do zimowli	Pasożyty <i>V. d.</i> do zimowli	Stopień porażenia <i>V. d.</i>
Usunięte <i>V. d.</i>	- 0,75*	0,64*	0,79*
Stopień porażenia <i>V. d.</i>	- 0,92*	0,32	-

* korelacje istotne przy $P \leq 0,05$

6.1.2. Usunięta naturalnie i po zastosowanych lekach podczas jednego sezonu populacja *Varroa destructor* w rodzinach produkcyjnych

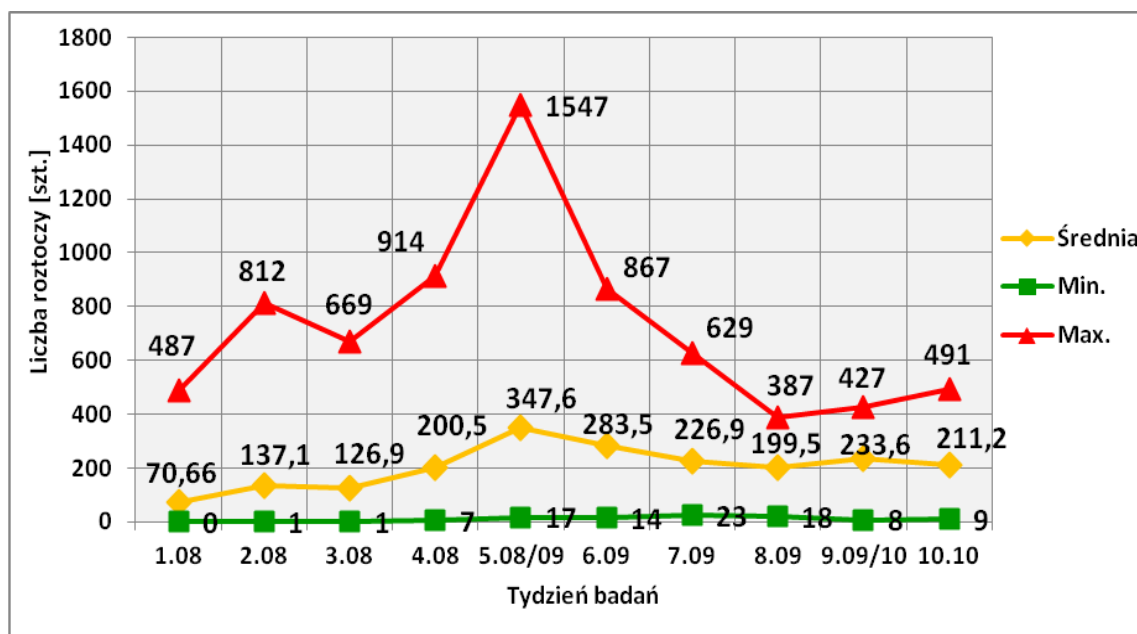
W 2011 roku od sierpnia do połowy listopada wykonano badanie poziomu naturalnego osypu pasożytów w 10 rodzinach produkcyjnych (matki 1 - 2 lata). Obserwacje wykazały, że w ciągu 10 tygodni osypało się naturalnie z rodzin od 189 do 6252 sztuk pasożytów z rodziny. Po zastosowaniu leczenia (1 x 3,2% kwas szczawiowy - działanie 2 tygodnie i 3 x w odstępach tygodniowych odymienie rodzin Apiwarolem) usunięto w sumie od 296 do 2964 sztuk. Na podstawie danych z osypów naturalnych i po leczeniu wyliczono skuteczność naturalnego usuwania pasożytów na średnim poziomie 43,26% (tabela 14).

Tabela 14. Charakterystyka naturalnego usuwania pasożytów i podczas leczenia rodzin pszczelich

Badana cecha	Wartość średnia	SD	min. - max
Liczba osypanych pasożytów naturalnie przez 10 tygodni (2.08 - 11.10.2011)	2037,4	1954,9	189 - 6252
Suma osypanych pasożytów po leczeniu (11.10.- 15.11.2011)	1800,1	714,8	296 - 2964
Suma osypanych pasożytów od sierpnia do połowy listopada	3894,5	1739,3	1968 - 6548
Skuteczność naturalnego usuwania pasożytów przez pszczoły	43,26	26,5	8,42 - 95,48

Na podstawie monitoringu osypów naturalnych w pasiece populacja pasożytów w okresie od sierpnia do początku października charakteryzowała się okresowymi wzrostami i spadkami populacji roztoczy. Zostały zaobserwowane dwa szczyty liczby osypanych pasożytów. Pierwszy "mały" szczyt wystąpił w drugim tygodniu sierpnia, a drugi "duży" na przełomie sierpnia i września w trzy tygodnie po pierwszym szczycie osypów w pasiece (wykres 4). Zwiększenie liczby osypujących się naturalnie pasożytów w pewnych okresach

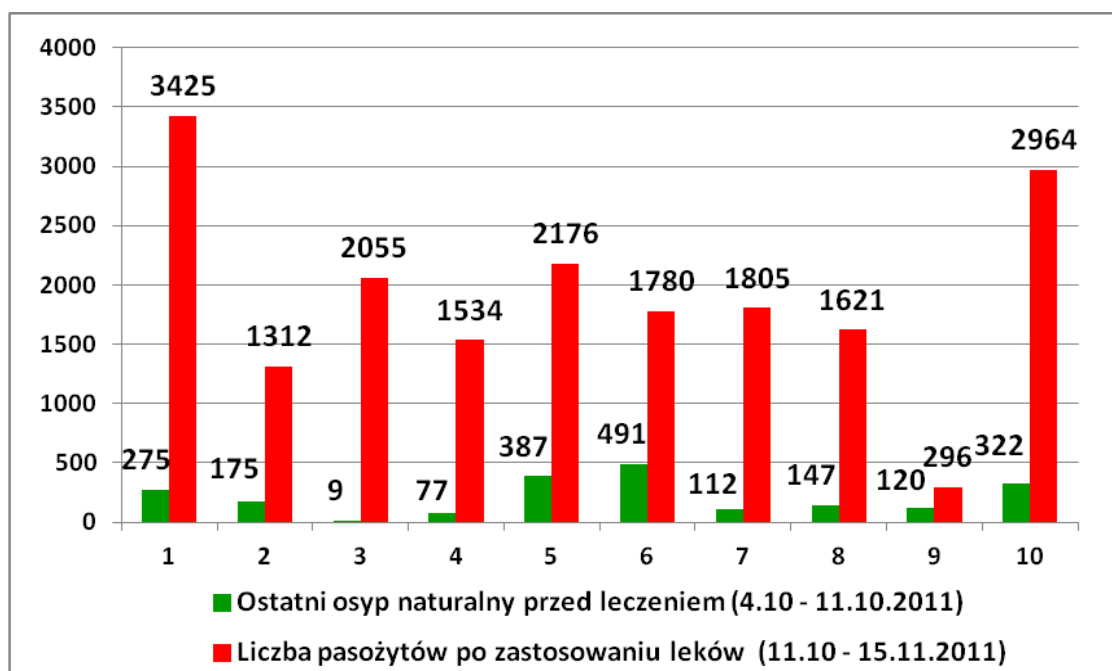
świadczy o zwiększonym "wysypie" roztoczy w rodzinach. W przypadku nie zastosowania środków wspomagających ich usunięcie z rodziny na przełomie lipca i sierpnia populacja szybko osiąga poziom zagrażający istnieniu rodziny pszczelej. Trafienie z leczeniem rodzin w okresowe pojawianie się zwiększonej populacji pasożytów może wpłynąć na poziom skuteczności zabiegu ograniczającego liczbę roztoczy w rodzinach. Leki długo działające w rodzinie (6 - 8 tygodni) mają większą skuteczność w stosunku do jednorazowego zastosowania odymienia rodziny pszczelej Apiwarolem AS lub jednorazowego zastosowania kwasu organicznego.



Wykres 4. Dynamika namnażania się pasożytów w pasiece na podstawie osypów naturalnych (n=10)

Określając liczbę roztoczy w rodzinie pszczelej na podstawie monitoringu osypów naturalnych można uzyskać przybliżony obraz stopnia porażenia rodzin pszczelich w pasiece. W badaniach z 2011 roku określono stopień porażenia rodzin na podstawie ostatniego tygodniowego osypu naturalnego z początku października, który wyniósł od 9 do 491 pasożytów (wykres 5). Następnie zastosowano leczenie, co trwało w sumie 5 tygodni. W ciągu 5 tygodni leczenia rodzin usunięto z rodzin od 296 do 3425 sztuk roztoczy. Spośród 10 rodzin 40% miało osypy około 10 krotnie wyższe w stosunku do ostatniego osypu naturalnego. Natomiast 30% rodzin miało osypy około 20 razy wyższe w stosunku do osypu naturalnego. Na uwagę zasługuje także rodzina, która miał bardzo niski osyp naturalny i ponad 200 razy większy osyp roztoczy podczas leczenia przy małej ilości czerwiu w rodzinie. Jest to sygnał na możliwość istnienia reinwazji pasożytów, która związana jest

z rabowaniem innych rodzin w okresie jesiennym. Wielokrotność zwiększenia liczby pasożytów w stosunku do osypu naturalnego można odebrać jako gorsze naturalne radzenia sobie pszczoł z pasożytem w danej rodzinie (wykres 5).



Wykres 5. Liczba pasożytów usuniętych po leczeniu rodzin pszczelich w stosunku do ostatniego naturalnego osypu z przed leczenia

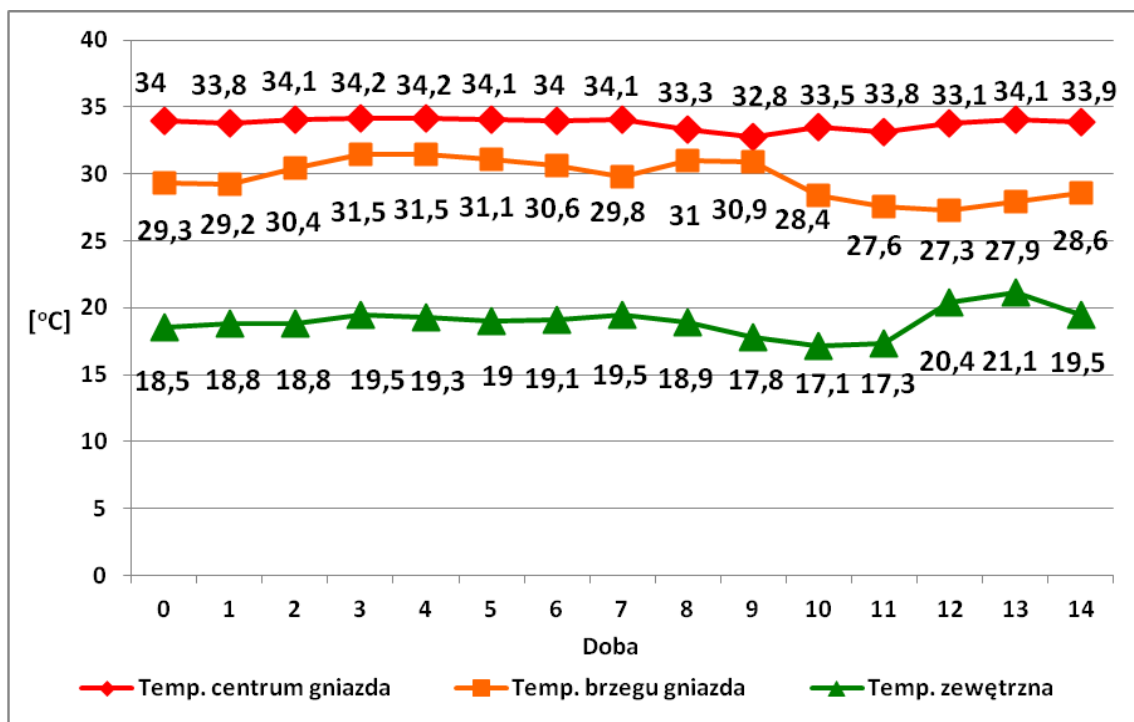
6.2. Badanie wpływu stosowania kwasów organicznych na mikroklimat rodziny pszczelej

Przy wprowadzeniu do gniazda rodziny pszczelej kwasu organicznego o działaniu drażniącym następuje reakcja pszczoł, która może mieć wpływ na parametry mikroklimatu ula. W okresie od 3.08 do 18.08. 2009 kwas mrówkowy 65%, zastosowano przy średnich dobowej temperaturach zewnętrznych od 17,1 do 21,1°C. Temperatura w tym okresie w centrum gniazda wynosiła od 33,1 do 34,2°C, natomiast temperatura brzegu gniazda przyjmowała wartości od 27,3 do 31,5°C (tabela 15). Rozkład średnich dobowych temperatur w ciągu 14 dni od rozpoczęcia ekspozycji rodzin pszczelich na ten kwas nie różnił się istotnie od temperatury w okresie poprzedzającym zabieg (wykres 6). W okresie stosowania kwasu mrówkowego 65% średnia dobowa wilgotności względna zewnętrzna (poza ulem) była od 27,8 do 50,8% i wilgotność względna w centrum gniazda pszczelego przyjmowała podobne wartości (od 25,0 do 47,7%). W pierwszym tygodniu zaobserwowane podwyższenie wilgotności względnej w gnieździe (do 47,7%) było spowodowane umiarkowanym pożytkiem z nawłoci (*Solidago canadensis*) udokumentowanym na wadze pasiecznej. Przy

braku pożytku w drugim tygodniu wilgotność względna obniżyła się do 25,0%. Średnie dobowe stężenie CO₂ w centrum rodziny pszczelej przyjmowało wartości od 440 do 520 ppm (tabela 16). Rozkłady średnich wartości wskaźników mikroklimatu w ciągu 14 dni od rozpoczęcia ekspozycji rodzin pszczelich na kwas mrówkowy 65% nie różniły się istotnie od temperatury gniazda w okresie poprzedzającym zabieg (wykres 7).

Tabela 15. Wyniki średnich (ze średnich dobowych) temperatur na zewnątrz i wewnątrz rodzin pszczelich po stosowaniu kwasów organicznych [$x \pm SD$ (min - max)]

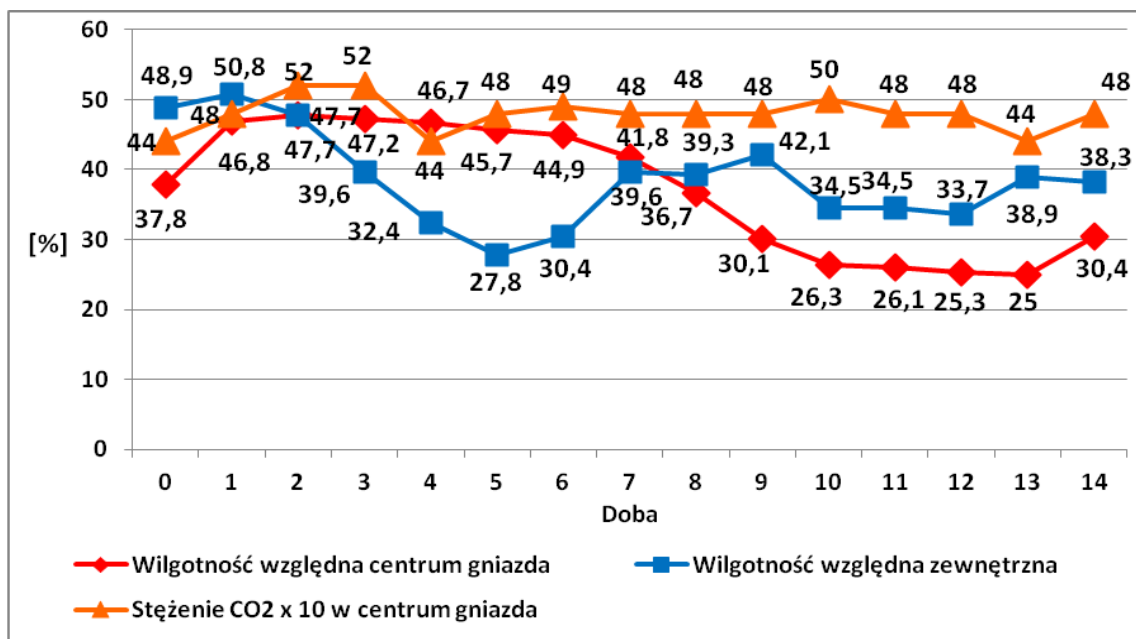
Zabieg	Badane kwasy (n = dni)	Temp. zewnętrzna (°C)	Temp. brzegu gniazda (°C)	Temp. centrum gniazda (°C)
1	Kontrola przed kwasem (1)	$18,5 \pm 0,29$	$29,3 \pm 0,55$	$34,0 \pm 0,48$
	Kwas mrówkowy 65% (14) (3.08. - 18.08.2009)	$19,0 \pm 2,03$ (17,1 - 21,1)	$29,7 \pm 2,00$ (27,3 - 31,5)	$33,8 \pm 0,75$ (32,8 - 34,2)
2	Kontrola przed kwasem (1)	$13,8 \pm 2,42$	$29,3 \pm 0,42$	$32,3 \pm 0,80$
	Kwas mrówkowy 83% (14) (7.09. - 21.09.2009)	$17,1 \pm 1,88$ (14,4 - 19,4)	$27,1 \pm 1,76$ (24,5 - 33,1)	$34,0 \pm 0,78$ (33,5 - 34,6)
3	Kontrola przed kwasem (1)	$5,2 \pm 0,82$	$8,8 \pm 1,40$	$14,3 \pm 1,31$
	Kwas mlekowy (7) (20.10. - 27.10.2009)	$8,4 \pm 1,20$ (6,0 - 10,9)	$18,2 \pm 3,44$ (14,4 - 22,8)	$20,5 \pm 2,21$ (18,2 ± 14,5)
4	Kontrola przed kwasem (1)	$12,0 \pm 0,37$	$23,1 \pm 2,97$	$24,3 \pm 0,78$
	Kwas szczawiowy (7)	$9,9 \pm 2,28$ (8,1 - 11,1)	$18,1 \pm 3,19$ (15,4 - 19,9)	$21,0 \pm 1,55$ (19,7 ± 23,5)



Wykres 6. Średnie dobowe temperatury (°C) na zewnątrz i wewnątrz ula - doba przed (0) i po zastosowaniu kwasu mrówkowego 65% (doby 1 - 14)

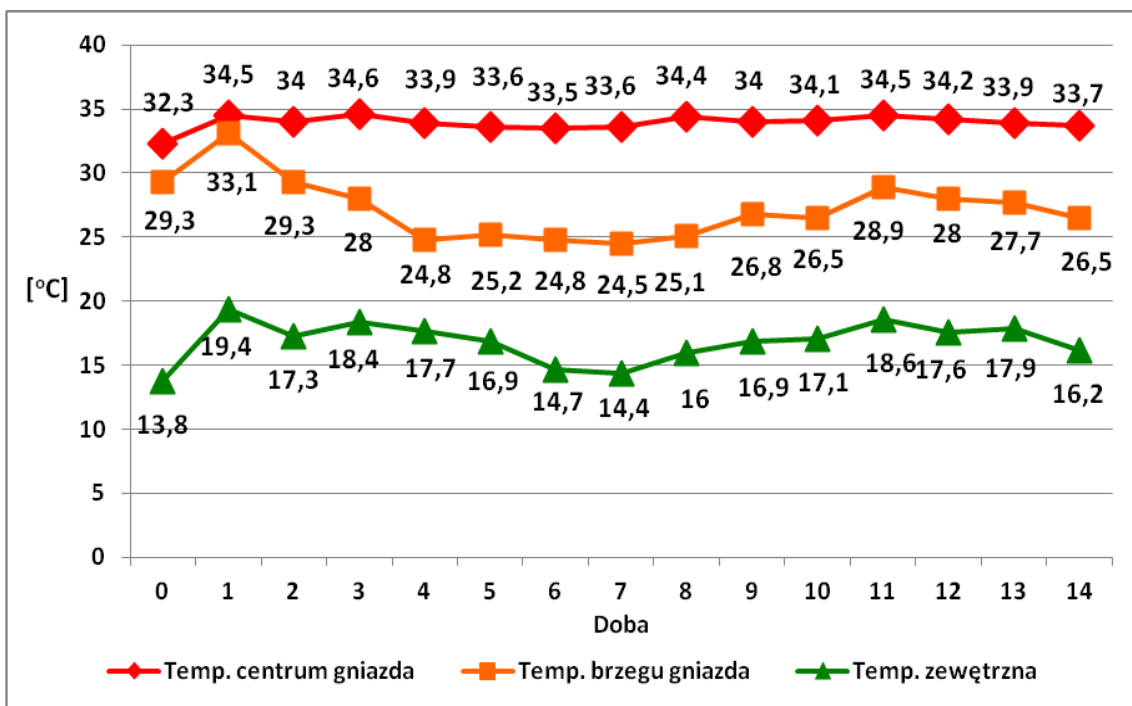
Tabela 16. Wyniki średnich (ze średnich dobowych) wilgotności względnych na zewnątrz i wewnątrz rodzin pszczelich oraz stężenie CO₂ w centrum gniazda po stosowaniu kwasów organicznych [x ± SD (min - max)]

Zabieg	Badane kwasy (n = dni)	Wilgotność . zewnętrzna (%)	Wilgotność (%)	CO ₂ (ppm)
1	Kontrola przed kwasem (1)	48,9 ± 2,64	37,8 ± 5,31	440 ± 0,0
	Kwas mrówkowy 65% (14) (3.08. - 18.08.2009)	37,8 ± 8,77 (27,8 - 50,8)	37,2 ± 10,03 (25,0 - 47,7)	482 ± 18,2 (440 - 520)
2	Kontrola przed kwasem (1)	38,6 ± 5,31	44,2 ± 3,50	480 ± 0,0
	Kwas mrówkowy 83% (14) (7.09. - 21.09.2009)	34,5 ± 6,31 (16,8 - 43,3)	30,8 ± 5,16 (19,6 - 42,9)	503 ± 34,8 (400 - 600)
3	Kontrola przed kwasem (1)	52,8 ± 3,60	50,0 ± 3,04	493 ± 23,1
	Kwas mlekowy (7) (20.10. - 27.10.2009)	48,1 ± 4,50 (43 - 52,8)	46,4 ± 3,67 (43,8 - 49,2)	524 ± 79,4 (466 - 640)
4	Kontrola przed kwasem (1)	46,6 ± 3,78	23,2 ± 3,35	500 ± 20,0
	Kwas szczawiowy (7) (17.11. - 24.11.2009)	32,7 ± 7,18 (26,7 - 40,3)	21,9 ± 4,10 (18,2 - 24,4)	510 ± 35,6 (440 - 560)

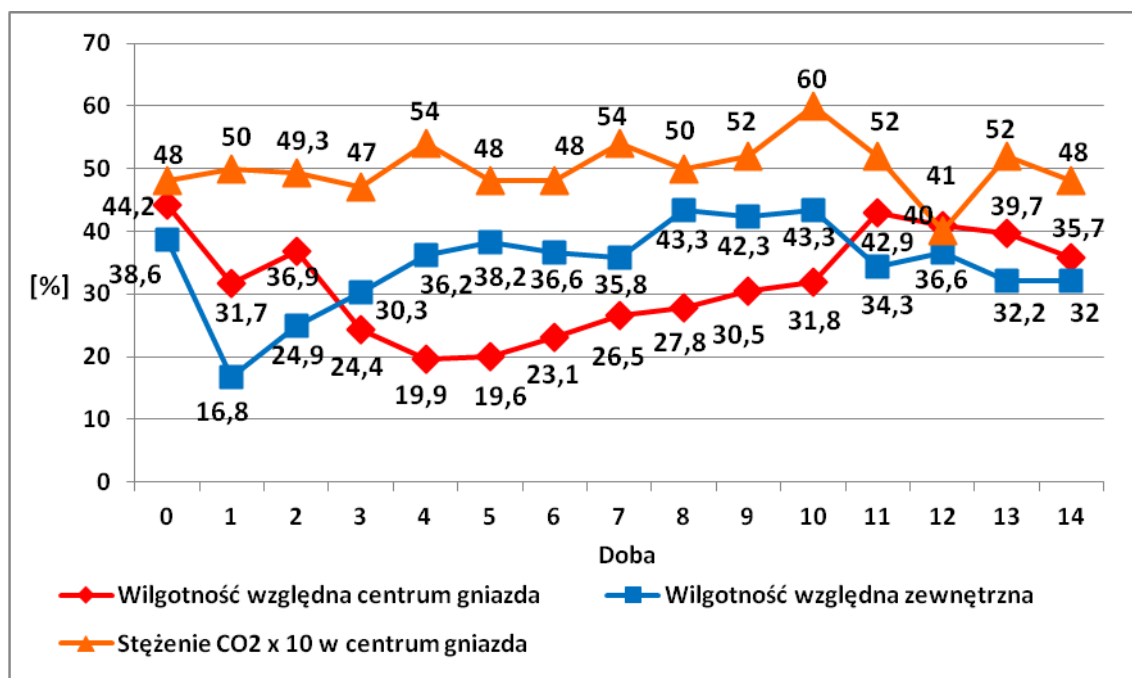


Wykres 7. Średnie dobowe wilgotności względnych (%) na zewnątrz i wewnątrz ula oraz stężenie CO₂ (ppm) przed (0) i po zastosowaniu kwasu mrówkowego 65% (doby: 1 – 14)

Stosowanie kwasu mrówkowego 83% w okresie 7.09 – 21.09.2009 przypadło w okresie niższych temperatur zewnętrznych (od 13,8 – 19,4°C) w stosunku do okresu stosowania kwasu mrówkowego 65% w sierpniu. W czasie ekspozycji rodzin pszczelel na kwas mrówkowy 83% temperatura w centrum gniazda wynosiła od 32,3 do 34,5°C, natomiast temperatura brzegu gniazda od 24,5 do 33,1 °C (tabela 15). Średnia dobowa wilgotność względna zewnętrzna w tym okresie przyjmowała wartości od 16,8 do 43,3%, a wilgotność względna w centrum gniazda pszczelego wynosiła od 19,6 do 44,2%. Natomiast stężenie CO₂ w badanym okresie wynosiło od 400 do 600 ppm (tabela 16). Rozkłady średnich wartości wskaźników mikroklimatu w ciągu 14 dni od rozpoczęcia ekspozycji rodzin pszczelel na kwas mrówkowy 83% nie różniły się istotnie od ich przebiegu w okresie poprzedzającym zabieg. Na zmiany parametrów mikroklimatu rodziny pszczelej większy wpływ miały zmieniające się parametry środowiska zewnętrznego niż stosowany w tym okresie kwas mrówkowy (wykres 8 i 9).

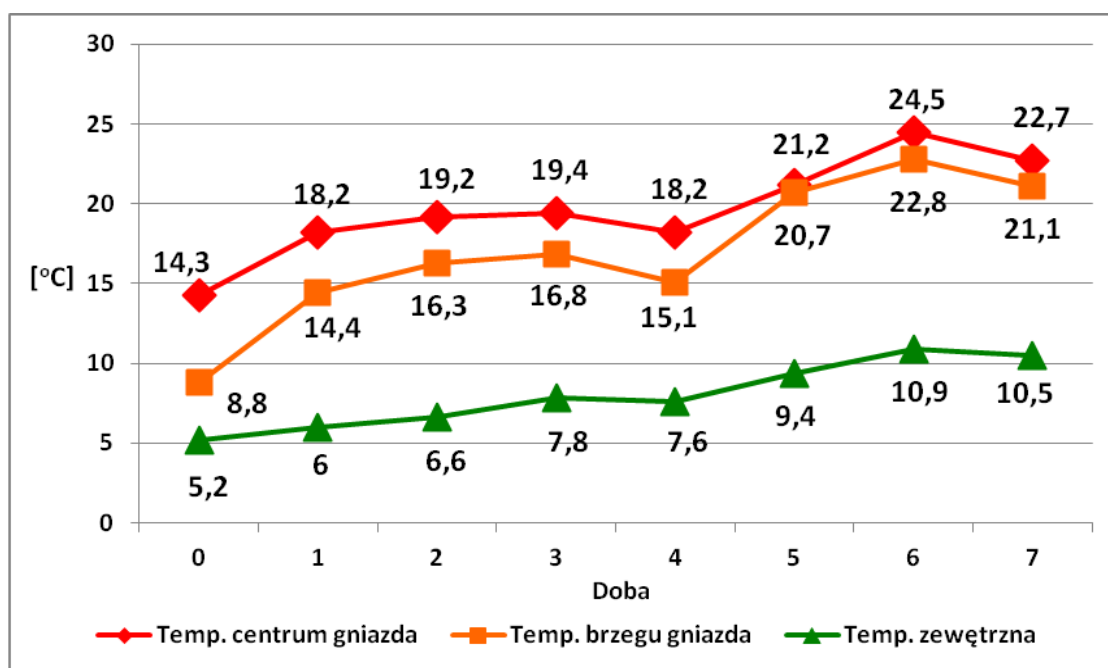


Wykres 8. Średnie dobowe temperatury (°C) na zewnątrz i wewnątrz ula przed (0) i po zastosowaniu kwasu mrówkowego 83% (doby: 1 – 14)

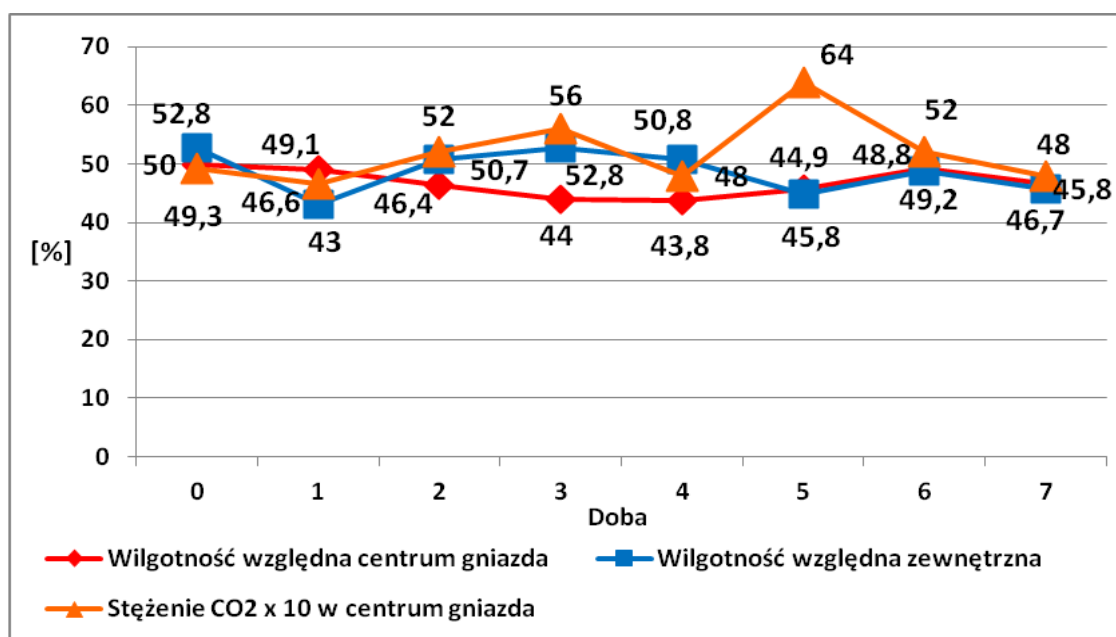


Wykres 9. Średnie dobowe wilgotności względne (%) na zewnątrz i wewnątrz ula oraz stężenie CO₂ (ppm) w centrum gniazda przed (0) i po zastosowaniu kwasu mrówkowego 83% (doby: 1 - 14)

W trzeciej dekadzie października 2009 podczas spryskiwania plastrów kwasem mlekowym 15% temperatura na zewnątrz ula wynosiła 6,0°C. W okresie siedmiu dni po aplikacji kwasu mlekowego średnia dobową temperatura w centrum gniazda pszczelego wynosiła od 18,2 do 24,5°C a na brzegu gniazda od 14,4 do 22,8°C (tabela 15). W tym okresie średnia dobową wilgotność względna zewnętrzna przyjmowała wartości od 43,0 do 52,8% przy podobnej średniej dobowej wilgotności względnej w gnieździe pszczelim (43,8 – 49,1%) i przy stężeniu CO₂ w gnieździe od 466 do 640 ppm (tabela 16). W pierwszej dobie po aplikacji kwasu zaobserwowano wzrost temperatur, zarówno w centrum gniazda pszczelego (+3,9°C) jak i na brzegu gniazda (+5,6°C) w stosunku do średnich dobowych temperatur w okresie poprzedzającym zabieg (8,8°C). Podwyższone, o podobny rząd wielkości, temperatury w gnieździe pszczelim obserwowano przez okres siedmiu dni po aplikacji kwasu mlekowego (wykres 10 i 11).

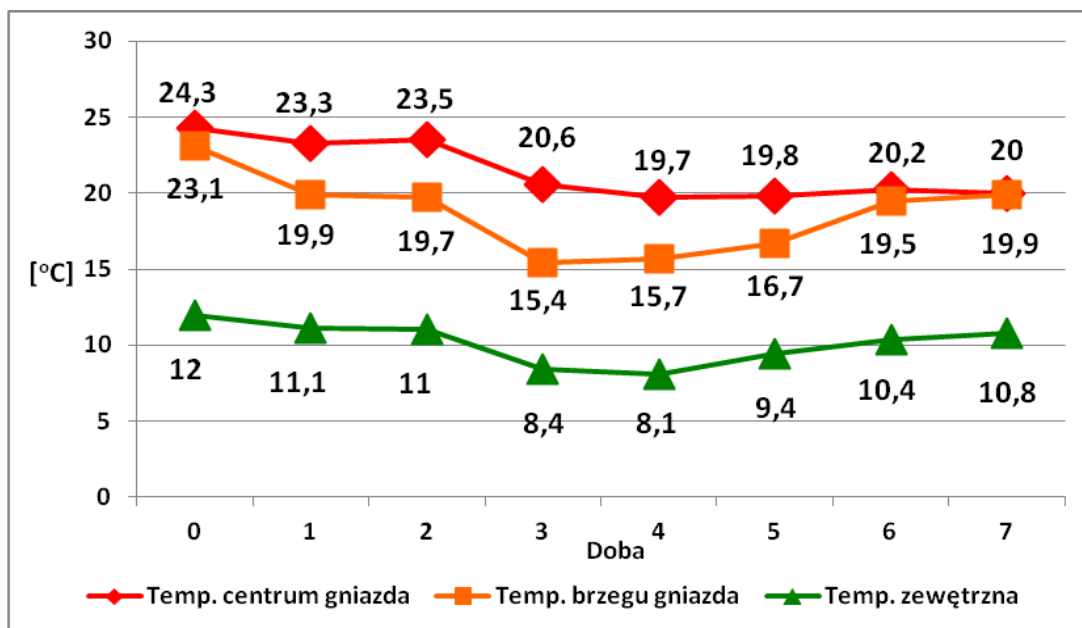


Wykres 10. Średnie dobowe temperatury (°C) na zewnątrz i wewnątrz ula przed (0) i po zastosowaniu kwasu mlekowego 15% (doby: 1 – 7)

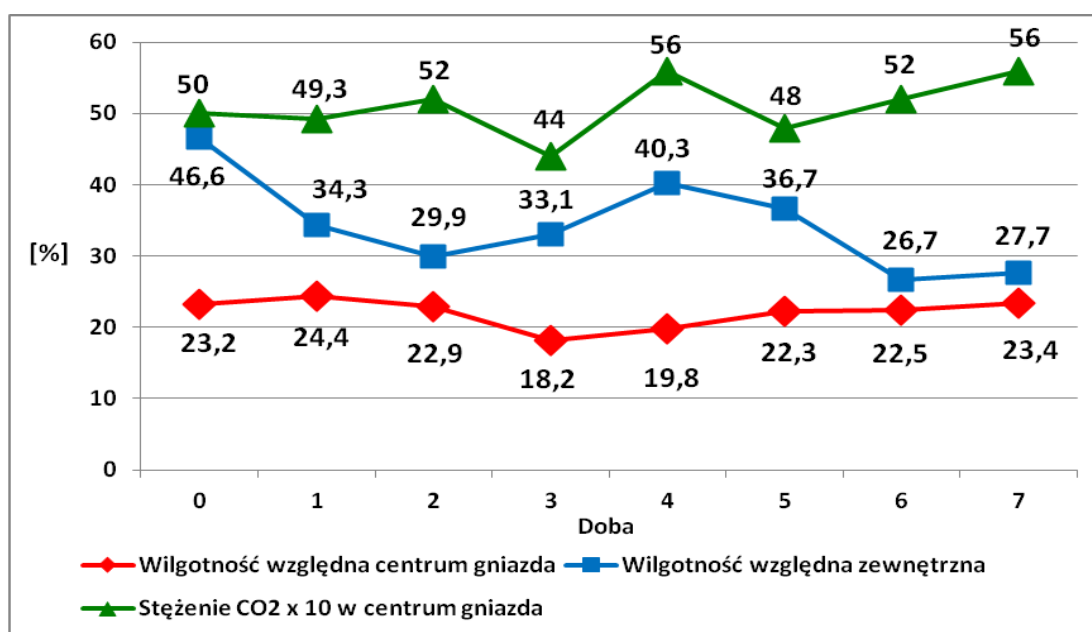


Wykres 11. Średnie dobowe wilgotności względne (%) na zewnątrz i wewnątrz ula oraz stężenie CO₂ (ppm) w centrum gniazda przed (0) i po zastosowaniu kwasu mlekowego 15% (doby: 1 – 7)

Kwas szczawiowy 3,2% zastosowano w drugiej połowie listopada przy średniej dobowej temperaturze zewnętrznej wynoszącej 11,1°C, a przez kolejne 6 dni temperatura wynosiła od 8,1 do 11,0 °C. Temperatura w okresie po aplikacji kwasu szczawiowego wynosiła w centrum gniazda od 19,7 do 23,5 °C a na brzegu gniazda od 15,4 do 19,9°C (tabela 15). Wilgotność względna zewnętrzna w okresie po zastosowaniu kwasu szczawiowego 3,2% przyjmowała wartości od 26,7 do 40,4%, natomiast wilgotność w centrum gniazda pszczelego była od 18,2 do 24,4%. Stężenie CO₂ w okresie poprzedzającym zabieg wynosiło 500 ppm, a po aplikacji kwasu odnotowano wartość od 440 do 560 ppm (tabela 16). Podczas stosowania kwasu szczawiowego nie zaobserwowano różnic istotnych w mikroklimacie rodziny pszczelej w stosunku do pomiarów poprzedzających stosowanie kwasu. Obserwowane zmiany temperatur były spowodowane w większym stopniu zmianami parametrów środowiska zewnętrznego, a nie zastosowanym kwasem szczawiowym (wykres 12 i 13).



Wykres 12. Średnie dobowe temperatury (°C) na zewnątrz i wewnątrz ula przed (0) i po zastosowaniu kwasu szczawiowego 3,2% (doby: 1 – 7)

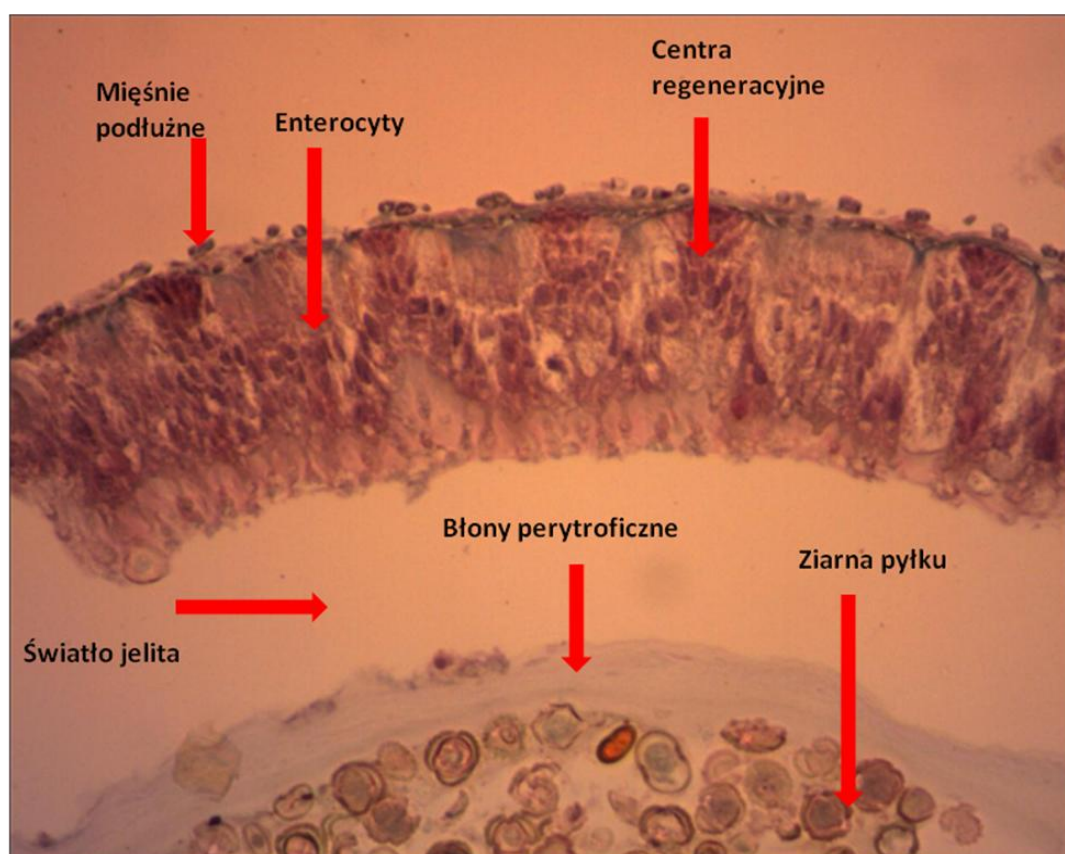


Wykres 13. Średnie dobowe wilgotności względne (%) na zewnątrz i wewnątrz ula oraz stężenie CO₂ (ppm) w centrum gniazda przed (0) i po zastosowaniu kwasu szczawiowego 3,2 (doby: 1 - 7)

6.3. Badanie wpływu stosowania kwasów organicznych na obraz histologiczny jelita środkowego

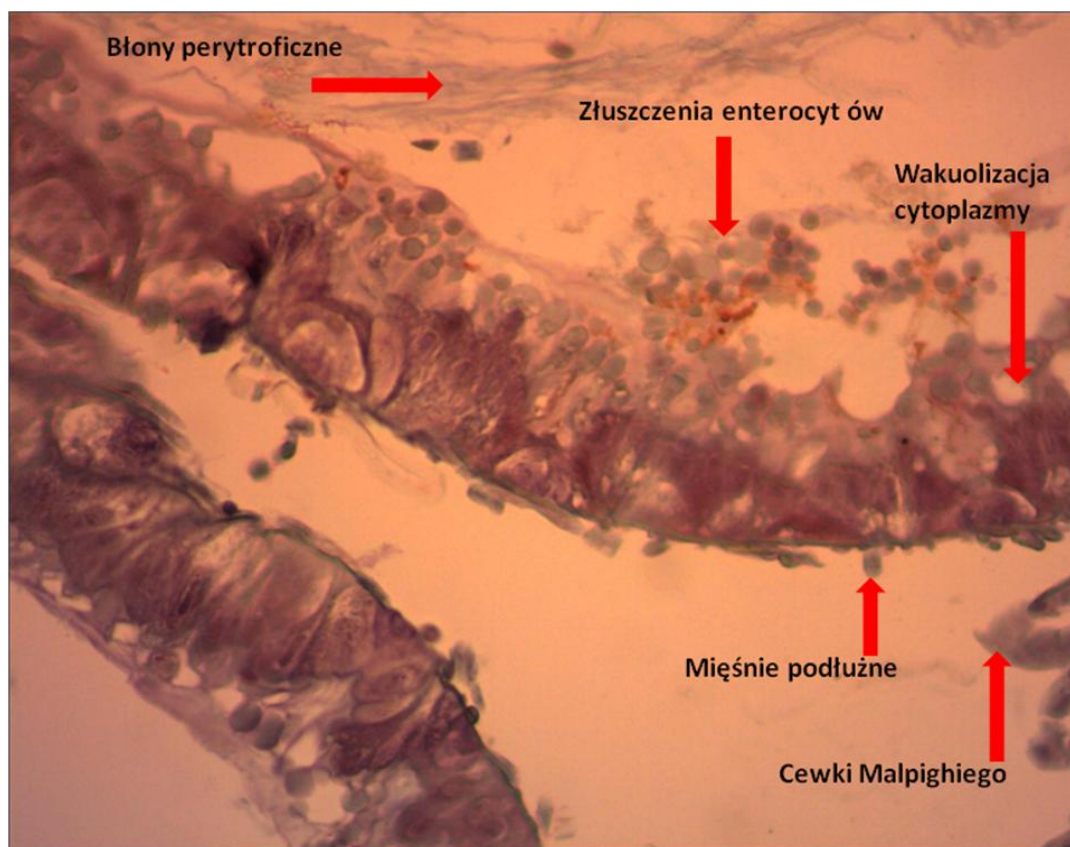
6.3.1. Obraz histologiczny jelita środkowego o budowie prawidłowej i po zastosowaniu kwasu mrówkowego 65 i 83%

W 2009 roku obraz mikroskopowy preparatów histologicznych ścian jelita środkowego w pierwszej dobie po wygryzieniu się pszczół charakteryzował się prawidłową budową. W przekrojach jelit wypełnionych pyłkiem enterocyty było prawidłowe w zależności od fazy czynnościowej niskiej lub średniej wysokości. Rąbek szczoteczkowy na ich brzegach był dobrze widoczny, a błony perytroficzne prawidłowo wykształcone. Cewki Malpighiego widoczne także w preparatach miały puste światło, a jądra w komórkach cewek były dobrze widoczne. W przekrojach nie wypełnionych pyłkiem enterocyty były wysokie w fazie wydzielniczej. W świetle jelit widoczne były obecne obfite błony perytroficzne (fot. 6)



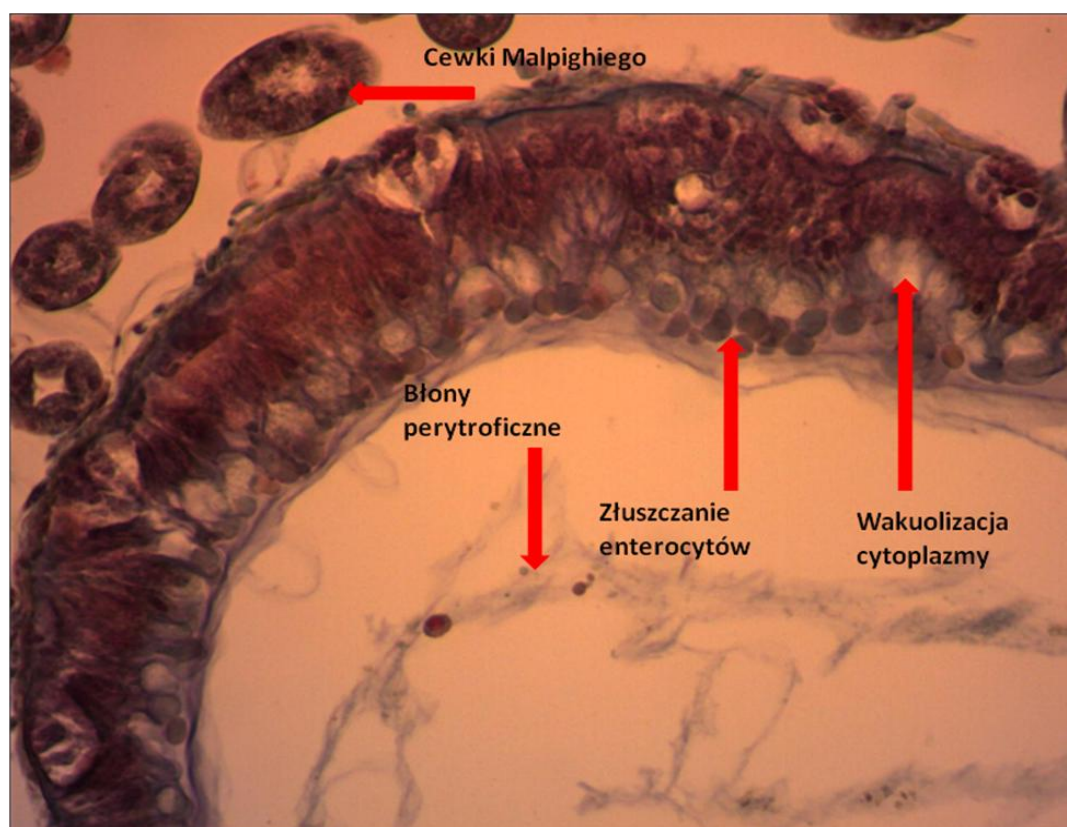
Fot. 6. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego o prawidłowej budowie ściany jelita środkowego pszczół robotnic - barwienie AZAN (fot. M. Howis)

W pierwszej dobie od zastosowaniu kwasu mrówkowego 65% w doświadczeniu przeprowadzonym w 2009 roku obraz histologiczny ścian jelit był następujący. Zarówno w przekrojach jelit wypełnionych pyłkiem jak i bez pyłku enterocyty były niezmienione, ale zaobserwowano ich nieznaczne wydłużenie i lekko wzmożone złuszczenie. Prawie we wszystkich jelitach zanotowano zwiększenie wytwarzania błon perytroficznych i podwyższona aktywność centrów regeneracyjnych. Rąbek szczoteczkowy był nie widoczny, ale wystąpiły widoczne ślady wakuolizacji enterocytów (fot. 7). W 2010 roku w pierwszej dobie po zastosowaniu kwasu mrówkowego 65% w przekrojach jelit z pyłkiem kwiatowym błony perytroficzne były zachowane, a na powierzchni komórek nabłonkowych widoczny był rąbek szczoteczkowy, a ich jądra były obkurczone. Natomiast w przekrojach jelit bez pyłku widoczna była wzmożona produkcja błon perytroficznych i ślady złuszczenia komórek.



Fot.7. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego jelit środkowych pszczoł po pierwszej dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 65% - barwienie AZAN (fot. M. Howis)

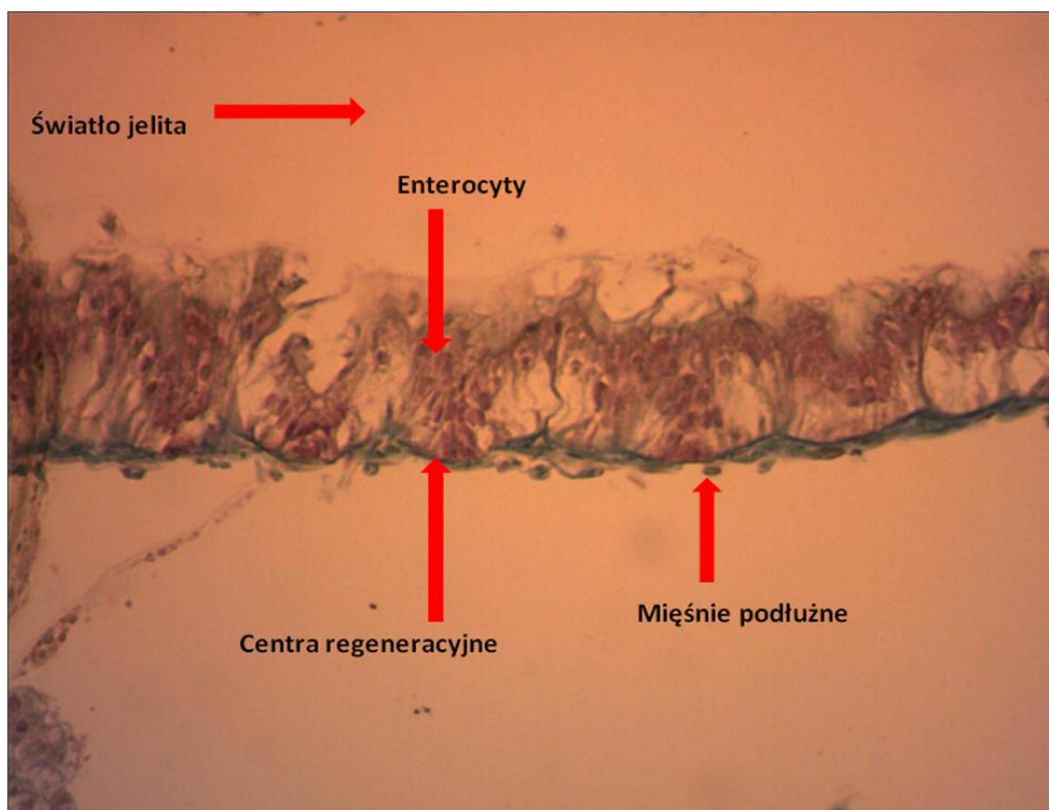
W trzeciej dobie po rozpoczęciu aplikacji kwasu mrówkowego zaobserwowano wzmożenie procesu złuszczenia enterocytów i zwiększenie aktywności centrów regeneracyjnych, szczególnie w przekrojach jelit bez pyłku. W enterocytach widoczne było lekkie obrzmienie ich jąder oraz przejaśnienie chromatyny jądrowej. Nasilenie obserwowanych zmian było bardzo różne w poszczególnych przekrojach jelit. W części przekrojów wystąpiły ślady wakuolizacji komórek nabłonkowych, zwłaszcza w fazie wydzielniczej komórek. Rąbek szczoteczkowy był niewidoczny (fot 8).



Fot. 8. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego jelit środkowych pszczół po 3 dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 65% - barwienie H&E (fot. M. Howis)

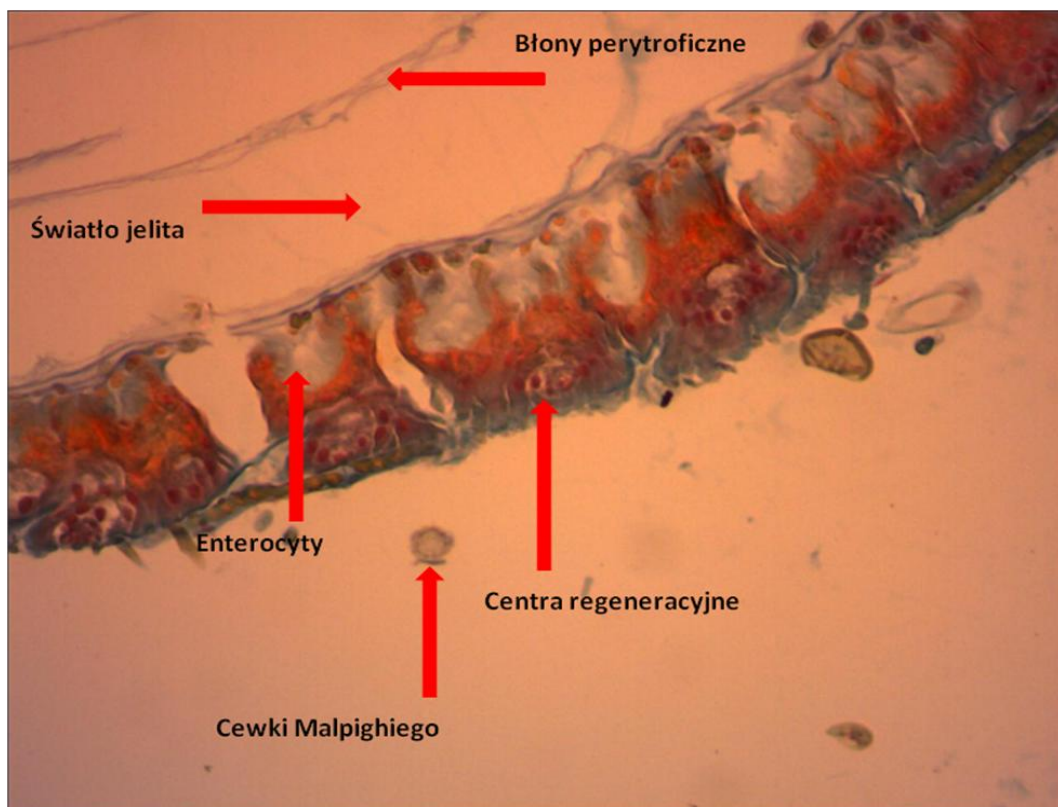
W siódmej dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 65% w 2009 roku zaobserwowano obrzmienie cewek Malpighiego i brak w nich światła. W przekrojach jelit wystąpiło skrócenie wysokości enterocytów, oraz brak wytwarzania błon perytroficznych. O rozpoczęciu procesów odnowy świadczy wzmożona aktywności centrów regeneracyjnych i obrzmienie jąder w komórkach wysokich, ale uaktywniają się ślady wakuolizacji enterocytów (fot. 9). W 2010 roku badania prowadzone w piątej dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 65%. W przekrojach jelit środkowych bez obecności pyłku błony

pertytroficzne były widoczne ale ich regularność była zaburzona. Obserwowano silną działalność wydzielniczą enterocytów w postaci nagromadzenia ziarnistości w ich cytoplazmie. Natomiast jelita wypełnione ziarnami pyłku charakteryzowały się obfitymi błonami pertytroficznymi i wyraźną obecnością rąbka szczoteczkowego.



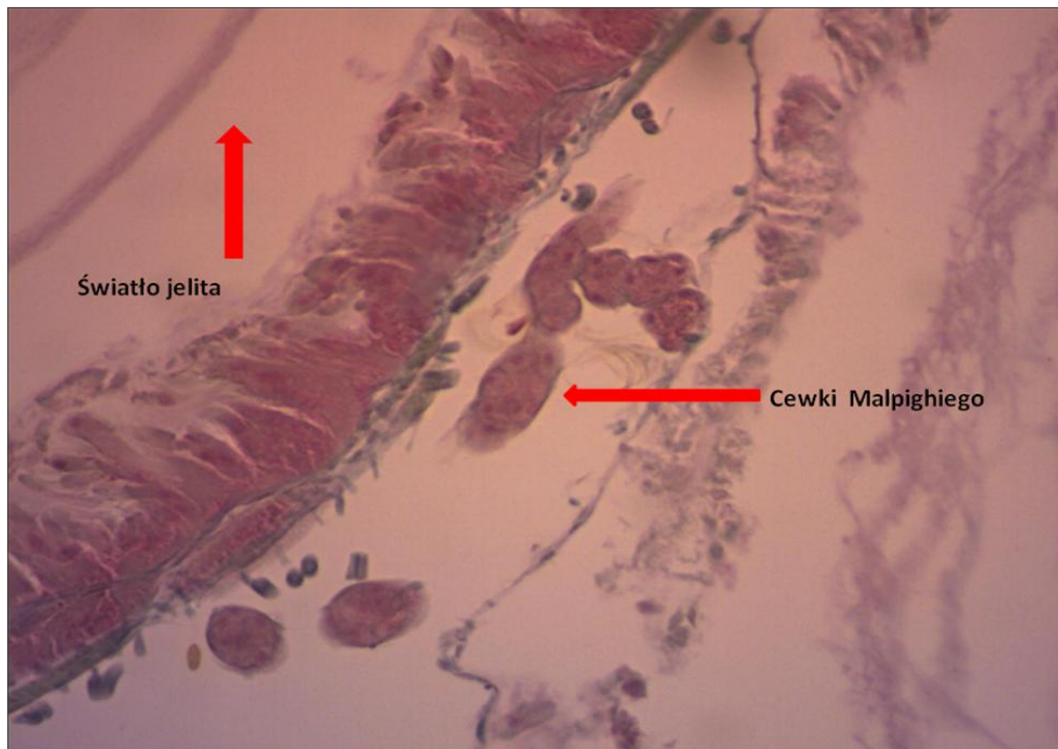
Fot. 9. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego jelit środkowych pszczół po 7 dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 65% - barwienie AZAN (fot. M. Howis)

W czternastej dobie po zastosowaniu kwasu mrówkowego obserwowano w jelitach środkowych pszczół silne zmniejszenie wysokości enterocytów i widoczne w nich objawy wakuolizacji i dystrofii. W komórkach widoczne było obrzmienie jąder i przejaśnienie chromatyny jądrowej, brak ich światła. Widoczny rozplem komórek centrów regeneracyjnych. Błony pertytroficzne były bardzo skąpe, a w przekrojach jest widoczne obrzmienie cewek Malpighiego rozplem komórek centrów regeneracyjnych (fot. 10). W 2010 roku preparaty były wykonywane w 10 dobie od zastosowania kwasu mrówkowego. W przekrojach z pyłkiem była widoczna silna aktywność centrów regeneracyjnych, której nie zanotowano w przekrojach "pustych". Zaobserwowano również ślady złuszczenia się i wakuolizacji komórek nabłonkowych.



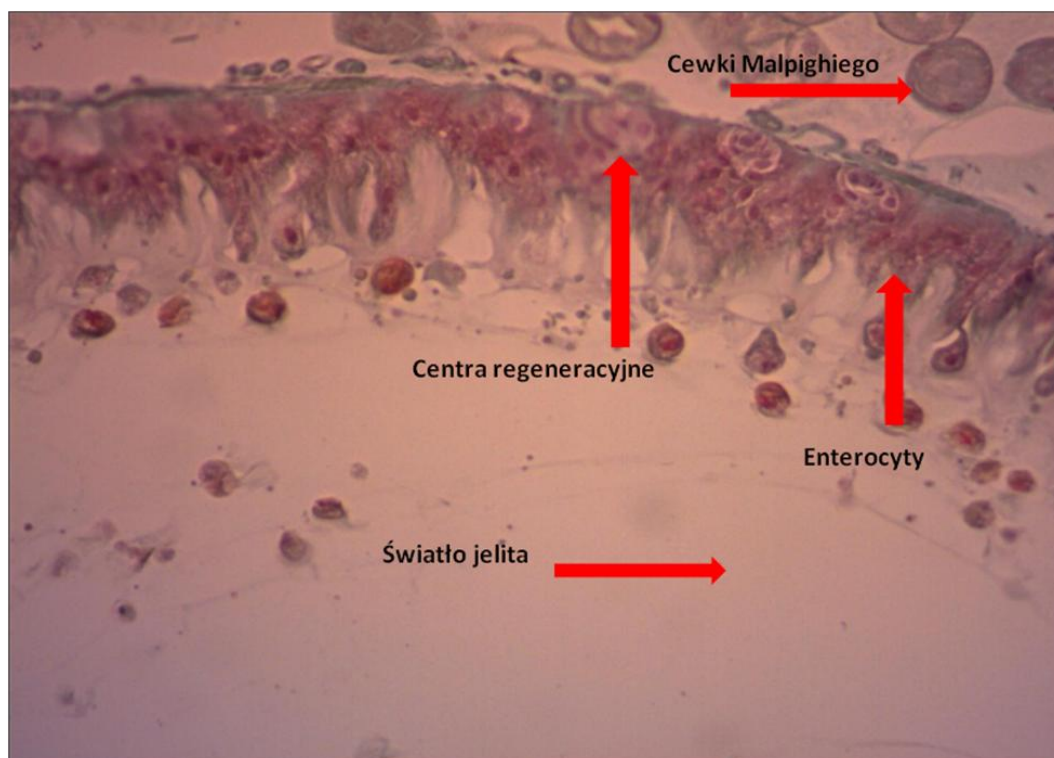
Fot. 10. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego jelit środkowych po 14 dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 65% - barwienie AZAN (fot. M. Howis)

W pierwszej, dobie po zastosowaniu kwasu mrówkowego 83% zaobserwowano bardzo silne złuszczenie enterocytów - rozpad komórek częściowy do całkowitego po błonę podstawną. Zatarcie struktury komórkowej enterocytów, wysokość komórek od bardzo niskich po średnie z objawami ich złuszczenia się (fot. 11).



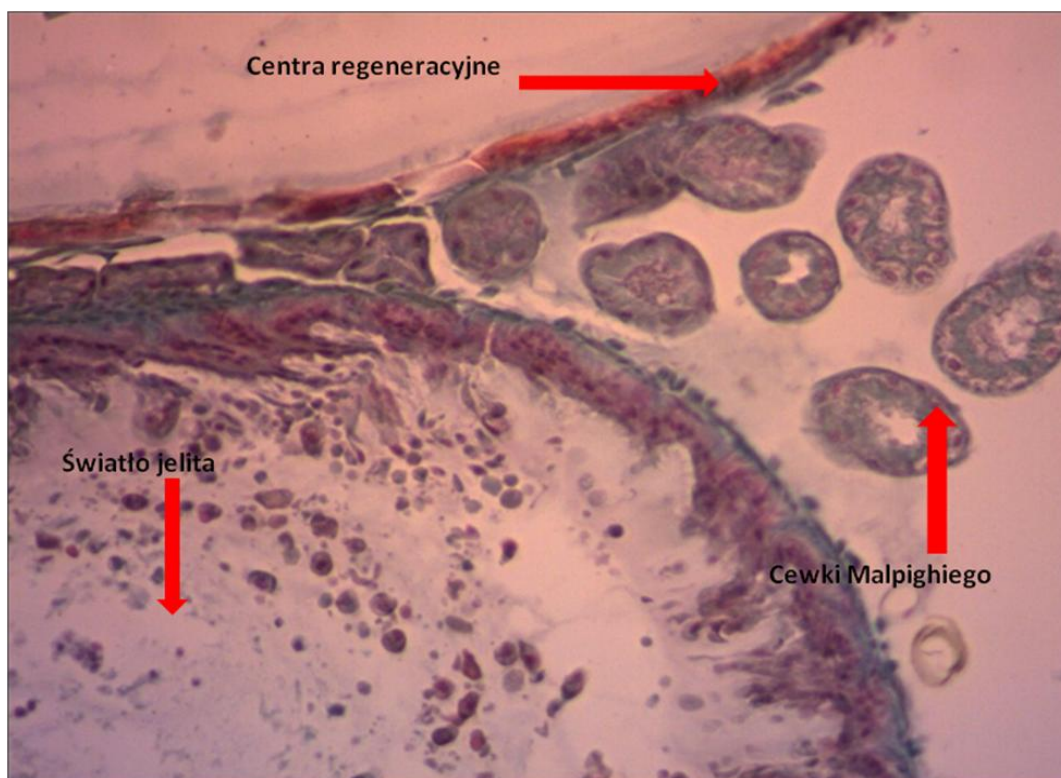
Fot. 11. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego jelit środkowych pszczoł po pierwszej dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 83% - barwienie H&E (fot. M. Howis)

W siódmej dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 83% zostało zaobserwowane wydłużenie komórek nabłonkowych i ich wzmożone złuszczenie, a także przejaśnienie cytoplazmy u podstawy komórek. W niektórych z kolei wystąpiło skrócenie enterocytów i obrzmienie ich jąder, a w jednym przekroju pojawiły się ziarnistości w enterocycie i wzmożona aktywność centrów regeneracyjnych. Działalność wytwórcza błon perytroficznych była wyraźnie zaburzona. Nastąpiło uaktywnienie się procesów regeneracyjnych nabłonka jelitowego (fot. 12).



Fot. 12. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego jelit środkowych pszczół robotnic po 7 dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 83% - barwienie AZAN (fot. M. Howis)

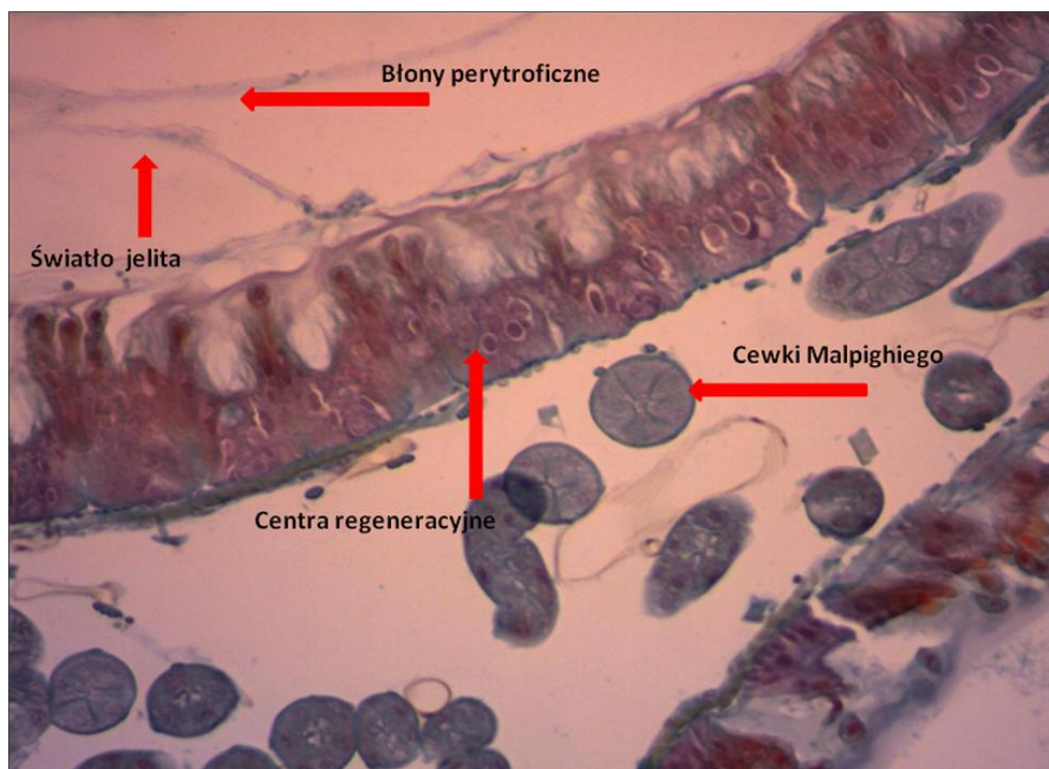
Wykonane preparaty histologiczne jelit środkowych pszczół w 14 dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 83% pokazały bardzo silne objawy złuszczenia się komórek nabłonkowych w jelitach środkowych pszczół robotnic. W jelitach bez obecności ziaren pyłku była widoczna wzmożona aktywność regeneracyjna enterocytów, której nie obserwowano w przekrojach wypełnionych ziarnami pyłku kwiatowego (fot. 13).



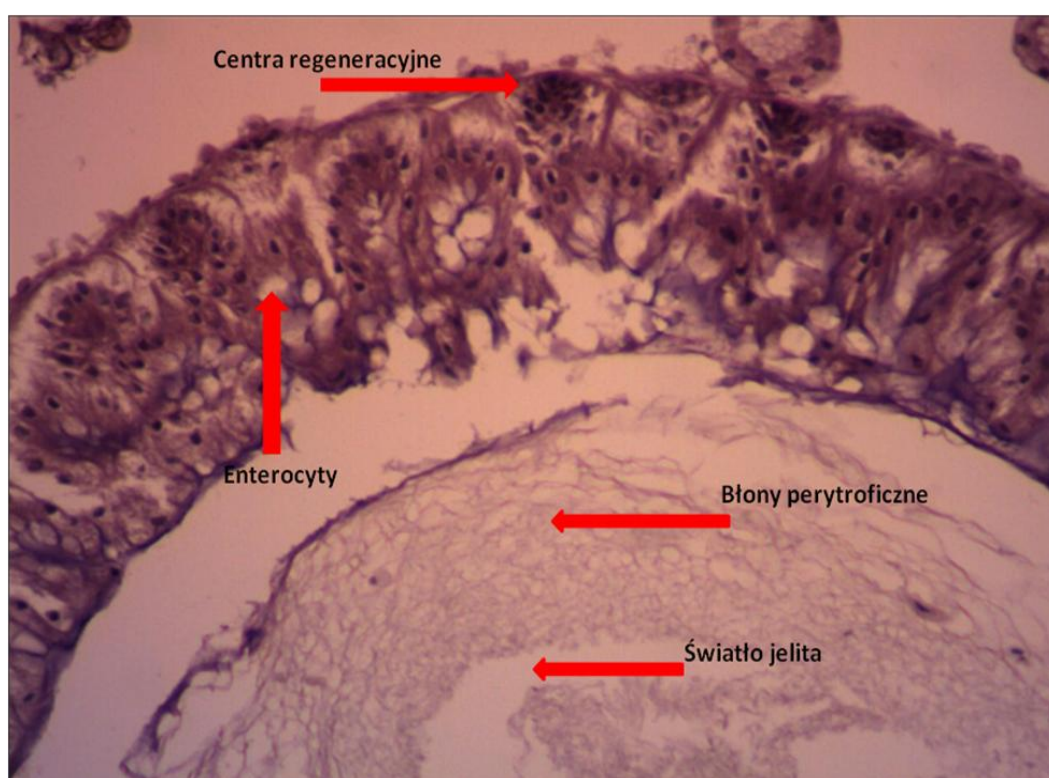
Fot. 13. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego jelit środkowych pszczół po 14 dobie od zastosowania kwasu mrówkowego 83% - barwienie H&E (fot. M. Howis)

6.3.2. Obraz histologiczny jelita środkowego po stosowaniu kwasu szczawiowego 3,2%

W 2009 roku w obrazie histologicznym preparatów z pierwszej doby po zastosowaniu kwasu szczawiowego 3,2 % zaobserwowano lekkie obrzmienie jąder przy błonie podstawnej i lekkie wydłużenie samych enterocytów (fot. 14). Natomiast w siódmej od zastosowania kwasu stan fizjologiczny ścian jelit środkowych pszczół było prawidłowy (fot. 15). W 2010 roku obserwowano w tym samym doświadczeniu wzmożoną aktywność centrów regeneracyjnych.



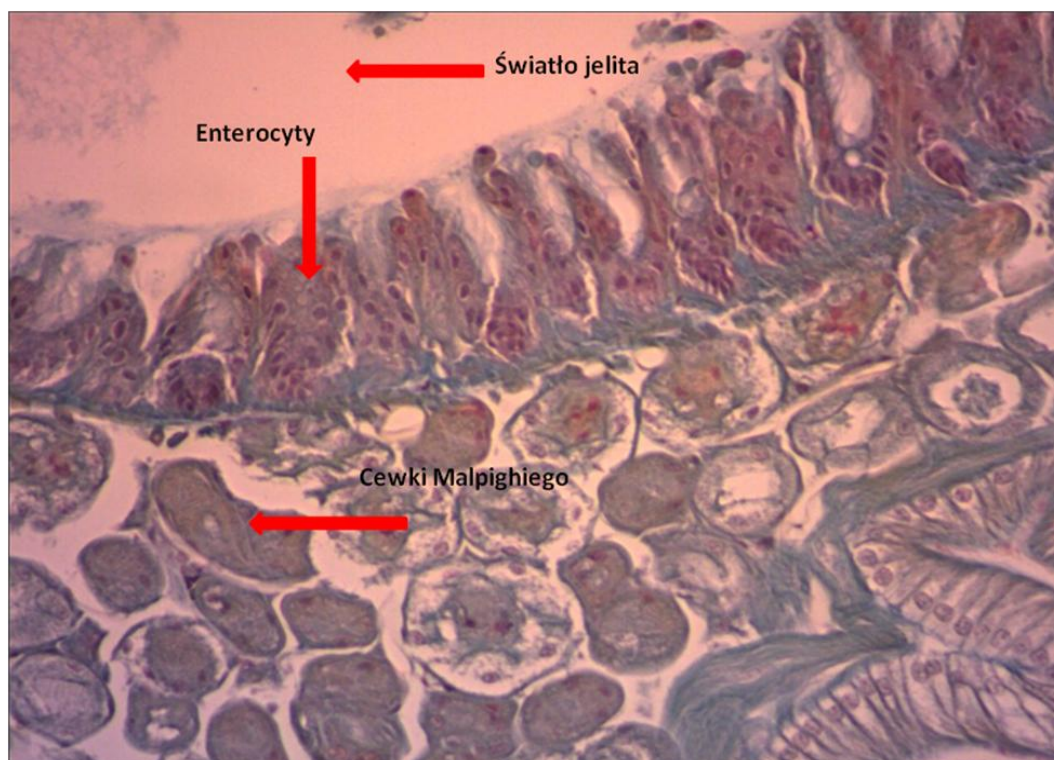
Fot. 14. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego jelit środkowych po pierwszej dobie od zastosowania kwasu szczawiowego 3,2% - barwienie AZAN (fot. M. Howis)



Fot. 15. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego jelit środkowych po 7 dobie od zastosowania kwasu szczawiowego 3,2% - barwienie H&E (fot. M. Howis)

6.3.3. Obraz histologiczny jelita środkowego po stosowaniu kwasu mlekowego 15%

Zastosowany kwas mlekowy 15% zarówno w 2009 jak i 2010 roku nie spowodował zmian fizjologicznych w ścianach jelit środkowych pszczół robotnic. Wykonane preparaty histologiczne z jelit środkowych pszczół charakteryzowały się prawidłowym obrazem histologicznym (fot. 16). W obrazie preparatów były dobrze widoczne błony perytroficzne.



Fot. 16. Obraz mikroskopowy preparatu histologicznego jelit środkowych pszczół robotnic o prawidłowej budowie po zastosowaniu kwasu mlekowego 15% - barwienie AZAN (fot. M. Howis)

6.4. Ekspozycja pszczół na kwasy organiczne a aktywności enzymatyczna jelita środkowego

6.4.1. Wpływ kwasów organicznych na aktywność enzymatyczną jelita młodych pszczół (1 - 11 doba życia)

Stosowanie kwasów organicznych do ograniczania populacji *Varroa destructor* podczas przygotowywania się rodzin do zimowli wpłynęło na aktywności enzymatyczną jelita środkowego pszczół robotnic. Biorąc pod uwagę wpływ zastosowanych kwasów na ogólny poziom aktywności enzymatycznej (19 enzymów) to różnice istotne w stosunku do grupy kontrolnej wystąpiły po ekspozycji pszczół na kwas mrówkowy i szczawiowy (tabela 17). W przypadku zastosowania obu kwasów poziom aktywności enzymatycznej uległ obniżeniu, natomiast zastosowanie kwasu mlekowego nie miało wpływu na poziom aktywności enzymatycznej (wykres 14). Analizując esterazy (6 enzymów) nie stwierdzono wpływu stosowania kwasów na ich aktywność. Aktywność proteaz (5 enzymów) różniła się istotnie ($P = 0,006$) pod wpływem zastosowanego kwasu szczawiowego (2,53) i mrówkowego (2,80) i była niższa w stosunku do grupy kontrolnej (3,80). Glikozydazy (8 enzymów) okazały się również mniej aktywne po ekspozycji pszczół na działanie kwasu szczawiowego (2,54) i mrówkowego (2,72) w stosunku do grupy kontrolnej (3,33; $P = 0,032$). (wykres 15). W grupie proteaz i glikozydaz nie wystąpiły różnice istotne po zastosowaniu kwasu mlekowego (wykres 15 i 16).

Tabela 17. Ogólny poziom aktywności enzymatycznej jelita środkowego młodych pszczół robotnic po ekspozycji na kwasy ($n = 3$ grupy wiekowe $\times$ 2 powtórzenia $\times$ liczba enzymów)(wartości średnie $\pm$ SD)

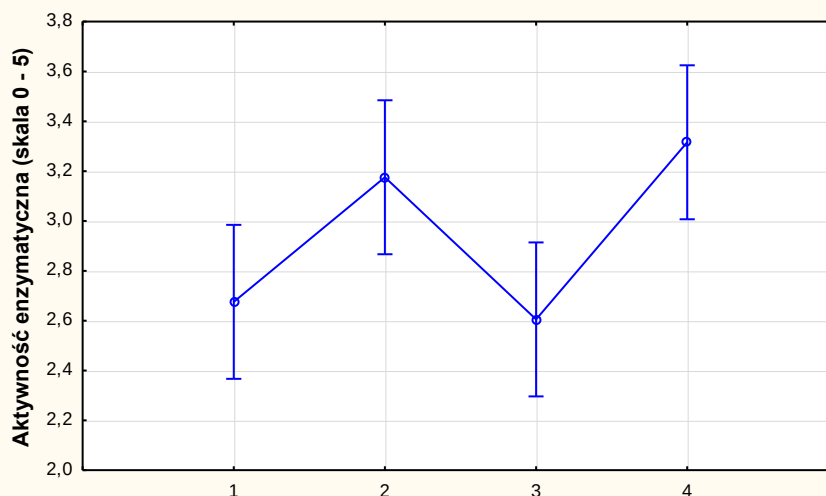
Grupa enzymów (n)	Mrówkowy	Mlekowy	Szczawiowy	Kontrola	Poziom istotności różnic
Wszystkie (114)	2,67 ^a $\pm$ 1,61	3,17 ^b $\pm$ 1,75	2,60 ^a $\pm$ 1,57	3,31 ^b $\pm$ 1,76	0,002
Esterazy (36)	2,50 $\pm$ 1,68	2,72 $\pm$ 1,90	2,75 $\pm$ 1,85	2,88 $\pm$ 2,05	0,851
Proteazy (30)	2,80 ^b $\pm$ 1,76	3,60 ^a $\pm$ 1,58	2,53 ^b $\pm$ 1,58	3,80 ^a $\pm$ 1,44	0,006
Glikozydazy (48)	2,72 $\pm$ 1,46	3,25 ^a $\pm$ 1,68	2,54 ^b $\pm$ 1,38	3,33 ^a $\pm$ 1,66	0,032

* średnie oznaczone różnymi literami w tych samych wierszach różnią się statystycznie istotnie

Wpływ ekspozycji kwasów na aktywność enzymatyczną jelita środkowego: (1 - mrówkowy, 2 - mlekowy, 3 - szczawiowy, 4 - kontrola)

Bieżący efekt: $F(3, 452)=5,1076$, $p=,00175$

Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności

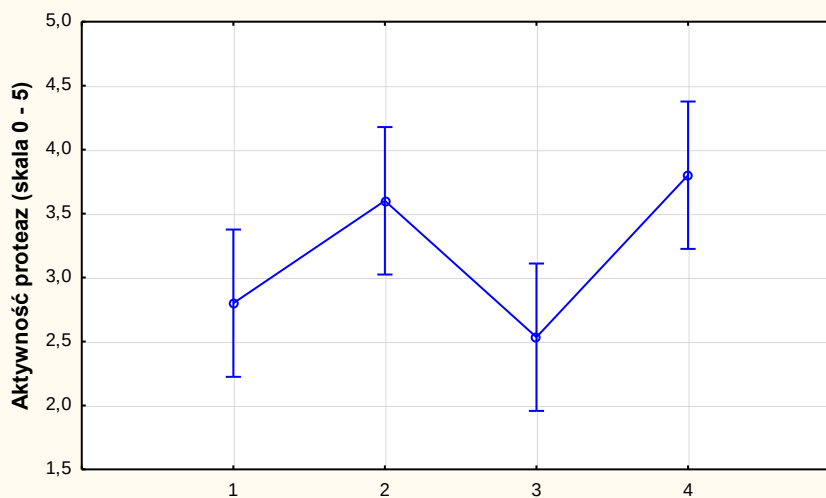


Wykres 14. Poziomy ogólnej aktywności enzymatycznej jelita środkowego pszczoł robotnic po ekspozycji rodzin na kwasy organiczne

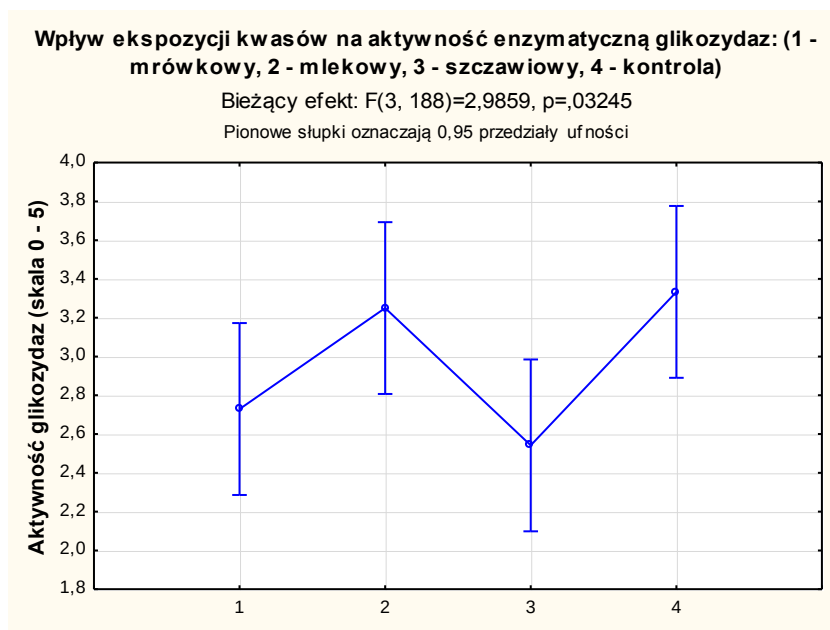
Wpływ ekspozycji kwasów na aktywność enzymatyczną proteaz: (1 - mrówkowy, 2 - mlekowy, 3 - szczawiowy, 4 - kontrola)

Bieżący efekt: $F(3, 116)=4,4282$, $p=,00551$

Pionowe słupki oznaczają 0,95 przedziały ufności



Wykres 15. Poziomy ogólnej aktywności enzymatycznej proteaz w jelicie środkowym pszczoł robotnic po ekspozycji rodzin na kwasy organiczne



Wykres 16. Poziomy ogólnej aktywności enzymatycznej glikozydaz w jelicie środkowym pszczoł robotnic po ekspozycji rodzin na kwasy organiczne

6.4.2. Wpływ wieku pszczoł robotnic (2, 6, 11 doba życia) na poziom aktywności enzymatycznej jelita środkowego po ekspozycji na kwasy

Analizując w grupie kontrolnej ogólną aktywność enzymatyczną jelita środkowego (esterazy + proteazy + glikozydazy) u pszczoł zaobserwowano najwyższą aktywność w drugiej dobie życia (3,68), natomiast w szóstej dobie nastąpił jej spadek (3,02; $P = 0,020$), a w dobie jedenastej poziom aktywności zbliżał się do poziomowi z drugiej doby życia (3,23) (tabela 18). Biorąc pod uwagę aktywność wszystkich enzymów wykazano istotnie niższą ich aktywność w drugiej dobie życia pszczoł (2,97) po zastosowaniu kwasów organicznych w porównaniu do grupy kontrolnej (3,68). Aktywność esteraz u pszczoł była podobna i nie zależała ani od wieku pszczoł ani od stosowania kwasów. W grupie proteaz po zastosowaniu kwasów organicznych nastąpiło obniżenie aktywności enzymatycznej w każdym analizowanym wieku - istotne różnice wykazano jedynie w szóstej dobie życia między grupą kontrolną (3,60) a pszczołami po ekspozycji na kwasy (2,40). Aktywność proteaz w drugiej dobie życia wykazała zróżnicowanie między grupą kontrolną (4,60) a pszczołami mającymi kontakt z kwasami (3,60), jednak różnica ta nie została udowodniona statystycznie z powodu małej liczebności obserwacji i stosunkowo dużej zmienności wartości cechy. W grupie glikozydaz, także zaobserwowano obniżenie aktywności enzymatycznej w każdej grupie wiekowej pszczoł po ekspozycji na kwasy w stosunku do grupy kontrolnej - istotne różnice wystąpiły w drugiej dobie życia pszczoł (2,66) w stosunku do grupy kontrolnej (3,87).

Uzyskane wyniki pokazują, iż największe zmiany w aktywności enzymatycznej po zastosowaniu kwasów wystąpiły w drugiej (wszystkie enzymy i glikozydazy) i w szóstej dobie (proteazy) od zastosowania kwasów, natomiast w jedenastej dobie aktywność enzymatyczna była podobna u pszczoł z grup kontrolnych doświadczalnych (tabela 18).

Tabela 18. Wpływ wieku i zastosowania kwasów na poziom aktywności enzymatycznej jelita środkowego (wartości średnie* $\pm$ SD)

Grupa enzymów	Zabieg	n	2 doba	6 doba	11 doba	Poziom istotności różnic
Wszystkie enzymy	+ kwasy	76	2,97 ^a $\pm$ 1,68	2,59 $\pm$ 1,64	2,88 $\pm$ 1,64	0,015
	- kwasy	38	3,68 ^b $\pm$ 1,62	3,02 $\pm$ 1,90	3,23 $\pm$ 1,73	0,020
Esterazy	+ kwasy	36	2,86 $\pm$ 1,82	2,52 $\pm$ 1,76	2,58 $\pm$ 1,85	0,885
	- kwasy	12	2,66 $\pm$ 1,87	2,75 $\pm$ 2,37	3,25 $\pm$ 2,00	0,763
Proteazy	+ kwasy	30	3,60 $\pm$ 1,67	2,40 ^a $\pm$ 1,67	2,93 $\pm$ 1,52	0,003
	- kwasy	10	4,60 $\pm$ 0,84	3,60 ^b $\pm$ 1,34	3,20 $\pm$ 1,75	0,079
Glikozydazy	+ kwasy	48	2,66 ^a $\pm$ 1,50	2,77 $\pm$ 1,56	3,08 $\pm$ 0,90	0,387
	- kwasy	16	3,87 ^b $\pm$ 1,45	2,87 $\pm$ 1,85	3,25 $\pm$ 1,61	0,234

* średnie oznaczone różnymi literami w wierszach różnią się statystycznie istotnie średnie w obrębie grupy wiekowej, w obrębie zabiegu (- kwas, + kwas) oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $P \leq 0,05$

Dokonano analizy korelacji prostych między wszystkimi badanymi enzymami w grupie kontrolnej i w poszczególnych grupach po ekspozycji rodzin na kwasy organiczne i wybrano reprezentatywne relacje obrazujące zaburzenia zachodzące w funkcjonowaniu enzymów trawiennych w jelitach środkowych pszczoł (tabela 19). W tabeli przedstawiono korelacje między poziomami aktywności wybranych enzymów w sytuacji ekspozycji pszczoł na kwas (kwas +) i braku tej ekspozycji (kwas -). Analizie poddano spójność trendów zarówno w mocy korelacji jak i jej wektorze (+ lub -) w obrębie obu grup (kwas – i +). Analiza aktywności lipazy (C14) wobec esterazy (C4), aryamidazy waliny, fosfohydrolazy naftylo-AS-BI i beta glikozydazy w warunkach ekspozycji na kwas mrówkowy jak i jej braku wykazała bardzo wysokie podobieństwo ($r = 0,52$ do $1,00$), co wskazuje na niezależność tego układu enzymatycznego od ekspozycji pszczoł na kwas. W przypadku analizy aktywności aryamidazy leucyny wobec esterazy (C4), aryamidazy waliny, fosfohydrolazy naftylo-AS-BI i beta glikozydazy w warunkach ekspozycji na kwas mrówkowy jak i jej braku okazało się że ekspozycja na kwas zmieniła relacje tego enzymu

w stosunku do esterazy (z $r = -0,60$ na $r = 1,00$) jaki i do beta glukozydazy (z $r = 0,92$ na $r = 0,00$) a więc układ enzymatyczny został zdestabilizowany, W grupie kontrolnej między fosfatazą alkaliczną a α -fukozydazą korelacja wynosiła $r = -0,54$ a po ekspozycji kwasu $r = 1,00$. Podobnie pomiędzy α -chymotrypsyną i β -glukozydazą a kwaśną fosfatazą $r =$ od $-0,46$ do $0,50$. Natomiast między α -fukozydazą a α -chymotrypsyną i β -glukozydazą w grupie kontrolnej korelacje wynosiły $r = 0,40$ i $0,58$ a po ekspozycji rodzin pszczelich na kwas były ujemne i wynosiły $r =$ od $-0,47$ do $r = -0,72$. Wszystkie korelacje proste aktywności enzymatycznej między poszczególnymi enzymami w grupie kontrolnej i po zastosowanych kwasach zostały zamieszczone w załącznikach 1 - 4.

Tabela 19. Wybrane korelacje proste między enzymami u pszczoł młodych w grupie kontrolnej i po ekspozycji rodzin pszczelich na kwasy organiczne

Kwas		Enzymy (*)	Enzymy (*)			
			Esteraza (C4)	Arylamidaza waliny (P)	Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI (E)	β -glukozydaza (G)
Mrówkowy	-	Lipaza (C14) (E)	0,52	0,92	1,00	1,00
	+	Lipaza (C14) (E)	1,00	1,00	1,00	1,00
	-	Arylamidaza leucyny (P)	- 0,60	0,92	1,00	0,92
	+	Arylamidaza leucyny (P)	1,00	0,83	0,55	0,00
	-	α -chymotrypsyna (P)	0,46	0,92	1,00	0,46
	+	α -chymotrypsyna (P)	1,00	0,90	0,81	0,55
	-	α -mannozydaza (G)	- 0,18	0,70	1,00	0,70
	+	α -mannozydaza (G)	1,00	- 0,16	0,18	0,92
	-	N-acetylo- β -glukozaminidaza (G)	- 0,91	0,63	1,00	0,63
	+	N-acetylo- β -glukozaminidaza (G)	1,00	- 0,21	0,18	0,72
Mlekowy			Kwaśna fosfataza (E)	β -galaktozydaza (G)	N-acetylo- β -glukozaminidaza (G)	α -fukozydaza (G)
	-	Fosfataza alkaliczna (E)	1,00	1,00	0,87	- 0,54
	+	Fosfataza alkaliczna (E)	1,00	1,00	1,00	1,00
	-	α -chymotrypsyna (P)	- 0,46	1,00	0,87	0,58
	+	α -chymotrypsyna (P)	0,87	0,87	1,00	- 0,47
	-	Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI (E)	1,00	1,00	1,00	1,00
	+	Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI (E)	0,44	0,44	0,65	- 0,24
	-	β -glukozydaza (G)	- 0,50	1,00	0,63	0,40
	+	β -glukozydaza (G)	0,44	0,44	0,65	- 0,72

Szczawiowy			Esteraza lipaza (C8) (E)	Lipaza (C14) (E)	Arylamidaza leucyny (P)	Arylamidaza waliny (P)
	–	Trypsyna (P)	0,65	0,25	0,46	0,25
	+		- 0,20	- 0,31	0,27	0,86
	–	α-chymotrypsyna (P)	0,12	0,46	0,71	0,46
	+		- 0,10	0,34	0,89	0,64
	–	β-glukuronidaza(G)	0,55	0,70	0,65	0,70
	+		- 1,00	- 0,63	0,00	0,10
	–	β-glukozydaza (G)	0,52	1,00	0,92	1,00
	+		- 1,00	- 0,63	0,00	0,10
	–	α-mannozydaza (G)	0,55	0,70	0,65	0,70
	+		- 0,63	- 0,25	0,43	0,17

*E - esterazy, P - proteazy, G - glikozydazy

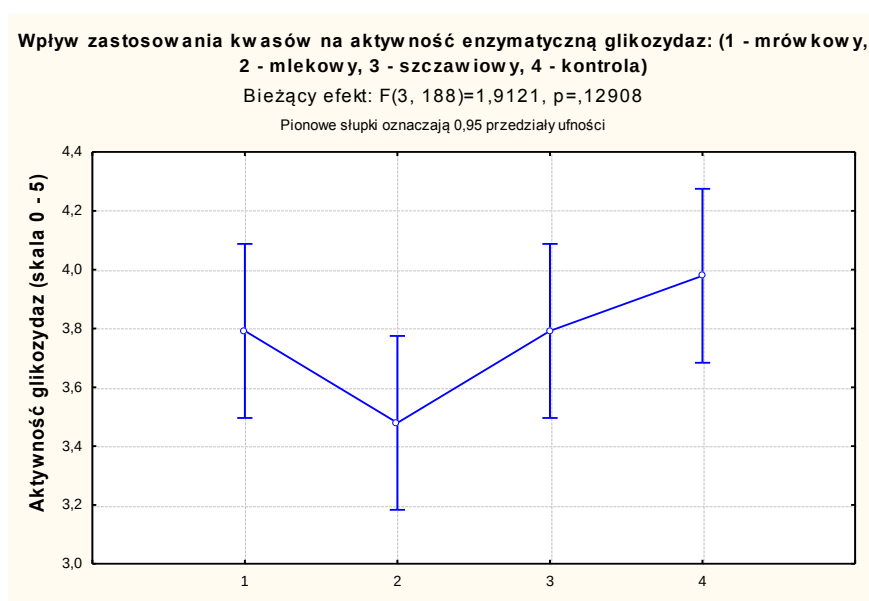
6.4.2. Wpływ kwasów organicznych na aktywność enzymatyczną jelita środkowego pszczoł przygotowanych do zimowli

Stosowanie kwasów organicznych do ograniczania populacji *Varroa destructor* w okresie jesiennym wpłynęło na aktywności enzymatyczną jelita środkowego. Analizując ogólny poziom aktywności enzymatycznej (esterazy + proteazy + glikozydazy) stwierdzono różnice statystycznie istotne w tej aktywności po zastosowaniu kwasu mrówkowego i szczawiowego w stosunku do grupy kontrolnej (tabela 20). Aktywność enzymatyczna po ekspozycji pszczoł na kwas mlekowy nie różniła się od aktywności w grupie kontrolnej. Rozpatrując aktywność enzymatyczną w grupach enzymów esteraz, proteaz i glikozydaz w jelicie środkowym pszczoł po ich ekspozycji na kwasy stwierdzono istotne ($P = 0,000$) obniżenie aktywności proteaz po zastosowaniu kwasu szczawiowego (2,50) i mrówkowego (3,03) w stosunku do aktywności w grupie kontrolnej (4,53). Nie wykazano negatywnego wpływu stosowania kwasów na aktywność esteraz i glikozydaz u pokolenia zimowego pszczoł robotnic. W grupie glikozydaz miały one najniższą aktywność u pszczoł po ekspozycji na kwas mlekowy (3,48) w stosunku do grupy kontrolnej (3,98; $P = 0,13$) – wykres 17.

Tabela 20. Wpływ ekspozycji na kwasy aktywności enzymatycznej jelita środkowego pszczół robotnic przygotowanych do zimowli (wartości średnie* $\pm$ SD)

Grupa enzymów (n)	Mrówkowy	Mlekowy	Szczawiowy	Kontrola	Poziom istotności różnic
Wszystkie enzymy (114)	3,37 ^a $\pm$ 1,28	3,72 ^b $\pm$ 1,11	3,17 ^a $\pm$ 1,45	3,88 ^b $\pm$ 1,20	0,000
Esterazy (36)	3,11 $\pm$ 1,47	3,58 $\pm$ 1,20	2,92 $\pm$ 1,36	3,22 $\pm$ 1,37	0,208
Proteazy (30)	3,03 ^a $\pm$ 1,33	4,30 ^b $\pm$ 0,84	2,50 ^a $\pm$ 1,76	4,53 ^b $\pm$ 0,73	0,000
Glikozydazy (48)	3,79 $\pm$ 0,99	3,48 ^a $\pm$ 0,99	3,79 $\pm$ 1,00	3,98 ^b $\pm$ 1,06	0,129

* średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (P= 0,05) test Duncana



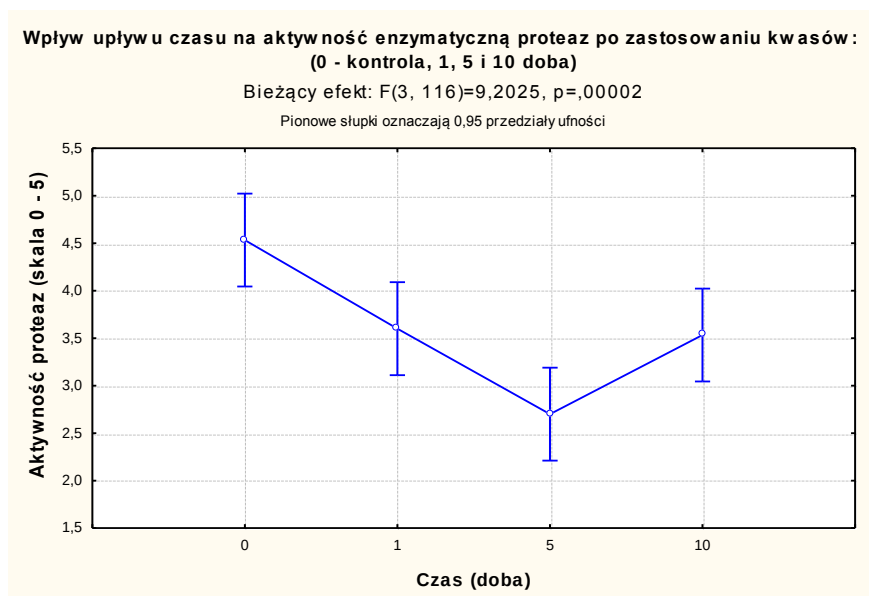
Wykres 17. Wpływ zastosowania kwasów aktywność enzymatyczną glikozydaz

Pobierając próbki zimowego pokolenia pszczół w 1, 5 i 10 dobie po ekspozycji na kwasy organiczne wykazano różnice w aktywności enzymatycznej jelita środkowego pszczół w relacji do czasu po ekspozycji. Analizując wpływ upływu czasu po zastosowaniu kwasów na ogólny poziom aktywności enzymatycznej jelita środkowego wykazano zaburzenie tej aktywności w pierwszej i piątej dobie, a w dobie dziesiątej powrót poziomu charakterystycznego do grupy kontrolnej (tabela 21). Stosowanie kwasów nie miało wpływu na aktywność esteraz badanych okresach czasu. Natomiast w grupie proteaz spadek aktywności enzymatycznej nastąpił w pierwszej, piątej i dziesiątej dobie po zastosowaniu kwasów (P=0,000) - wykres 18. W grupie glikozydaz aktywność w relacji czasowej była podobna jak w przypadku proteaz. (wykres 19). Obniżoną aktywność glikozydaz stwierdzono w pierwszej i piątej dobie (P = 0,04).

Tabela 21. Wpływ upływu czasu po zastosowaniu kwasów na poziom aktywności enzymatycznej jelita środkowego pszczoł robotnic przygotowanych do zimowli (wartości średnie* $\pm$ SD)

Grupa enzymów (n)	0 - kontrola	1 - doba	5 - doba	10 - doba	Poziom istotności różnic
Wszystkie enzymy (114)	3,89 ^a $\pm$ 1,20	3,49 ^b $\pm$ 1,47	3,09 ^c $\pm$ 1,22	3,69 ^a $\pm$ 1,14	0,00003
Esterazy (36)	3,22 $\pm$ 1,37	3,22 $\pm$ 1,53	2,92 $\pm$ 1,29	3,47 $\pm$ 1,23	0,394
Proteazy (30)	4,53 ^a $\pm$ 0,73	3,60 ^b $\pm$ 1,77	2,70 ^c $\pm$ 1,37	3,53 ^b $\pm$ 1,33	0,00002
Glikozydazy (48)	3,98 ^a $\pm$ 1,06	3,62 ^b $\pm$ 1,20	3,48 ^b $\pm$ 1,94	3,96 ^a $\pm$ 0,90	0,043

* średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ($P \leq 0,05$) test Duncana



Wykres 18. Wpływ upływu czasu po zastosowaniu kwasów na aktywność enzymatyczną proteaz



Wykres 19. Wpływ upływu czasu po zastosowaniu kwasów na aktywność enzymatyczną glikozydaz

Analiza korelacji prostych między wszystkimi badanymi enzymami w grupie kontrolnej i po zastosowanych kwasach u pszczoł pokolenia zimowego wykazała liczne rozbieżne relacje między enzymami (tabela 22). W tabeli 22 przedstawiono wybrane korelacje między poziomami aktywności niektórych enzymów w sytuacji ekspozycji pszczoł na kwas (kwas +) i braku tej ekspozycji (kwas -). Analizie poddano spójność trendów zarówno w mocy korelacji jak i jej wektorze (+ lub -) w obrębie obu grup (kwas - i +).

Korelacja w grupie kontrolnej i po zastosowaniu kwasu mrówkowego między α -chymotrypsyną a fosfatazą alkaliczną i esterazą lipazy (C8) są spójne i wysokie (r = od 0,82 do 1,00), a więc kwas mrówkowy nie miał wpływu na relacje między tymi enzymami. Zależności występujące między arylamidazą cystyny a esterazą lipazy (C8) (r = - 0,76) i fosfohydrolazą naftylo-AS-BI (r = - 0,84) są ujemne w grupie kontrolnej, natomiast po kwasie mrówkowym są dodatnie, odpowiednio r = 0,85 i r = 0,62. Podobna sytuacja zaistniała między β -galaktozydazą a kwaśną fosfatazą (r = - 0,82 dla kwas - i r = 0,87 dla kwas +). Korelacje w grupie kontrolnej i po zastosowaniu kwasu mlekowego między α -galaktozydazą a fosfohydrolazą naftylo-AS-BI wynosiły odpowiednio r = - 0,45 i 0,86. Odwrotne relacje korelacji między β -glukuronidazą a lipazą (C14) zaobserwowano w grupie kontrolnej (r = - 0,54) i po zastosowaniu kwasu mlekowego (r = 1,00). Po zastosowaniu kwasu szczawiowego również zaobserwowano rozbieżne wartości korelacji w stosunku do grupy kontrolnej. Na przykład: korelacje między arylamidazą cystyny a esterazą lipazy (C8) i α -chymotrypsyną wynosiły odpowiednio r = - 0,76 i r = 0,98 oraz r = - 0,61 i 0,97 w grupie kontrolnej

i w grupie z kwasem szczawiowym. Wszystkie korelacje proste aktywności enzymatycznej między poszczególnymi enzymami w grupie kontrolnej i po zastosowanych kwasach zostały zamieszczone w załącznikach 5 - 8.

Tabela 22. Wybrane korelacje proste między enzymami u pszczoł przygotowanych do zimowli w grupie kontrolnej i po ekspozycji kwasów w rodzinach pszczelich

Kwas		Enzymy (*)	Enzymy(*)			
			Arylamidaza cystyny (P)	α -chymotrypsyna (P)	β -galaktozydaza (G)	β -glukozydaza (G)
Mrówkowy	–	Fosfataza alkaliczna (E)	- 0,37	0,93	1,00	- 0,29
	+		0,63	0,95	0,80	0,88
	–	Esteraza lipaza (C8) (E)	- 0,76	1,00	1,00	-0,29
	+		0,85	0,82	0,80	0,88
	–	Kwaśna fosfataza (E)	- 0,57	0,70	- 0,82	- 0,44
	+		0,60	0,92	0,87	0,79
	–	Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI (E)	- 0,84	0,86	1,00	- 0,10
	+		0,62	0,70	0,31	0,46
Mlekowy			α -galaktozydaza (G)	β -glukuronidaza (G)	β -glukuronidaza (G)	α -fukozydaza (G)
	–	Lipaza (C14) (E)	1,00	- 0,54	- 0,54	- 0,03
	+		0,80	1,00	1,00	0,83
	–	Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI (E)	- 0,45	- 0,10	- 0,59	- 0,76
	+		0,89	0,40	- 0,40	0,29
	–	α -mannozydaza (G)	0,31	0,43	0,43	0,77
	+		0,58	0,91	0,91	0,94
Szczawiowy			Esteraza (C4) (E)	Esteraza lipaza (C8) (E)	α -chymotrypsyna (P)	N-acetylo- β -glukozaminidaza (G)
	–	Fosfataza alkaliczna (E)	- 0,29	0,71	0,92	- 0,29
	+		0,86	0,87	0,90	0,24
	–	Arylamidaza cystyny (P)	0,77	- 0,76	- 0,61	- 0,17
	+		0,86	0,98	0,97	- 0,22
	–	β -glukozydaza (G)	- 0,20	- 0,29	- 0,31	- 0,20
	+		0,15	0,13	0,16	0,89

*E - esterazy, P - proteazy, G – glikozydazy

7. DYSKUSJA

7.1. Rozwój populacji *Varroa destructor* w rodzinach pszczelich

Dynamika rozwoju populacji *Varroa destructor* w klimacie umiarkowanym mija się z dynamiką populacji rodziny pszczelej *Apis mellifera carnica*. Jesienią i zimą następuje spadek populacji gospodarza w stosunku do pasożyta (Amdam i wsp. 2004). Wieloletnie relacje między dynamiką populacji pasożyta i pszczoły miodnej prowadzą często do upadku rodzin pszczelich. W badaniach własnych stopień porażenia rodzin pasożytami jak również liczba pasożytów pozostałych do zimowli były istotnie niższe ($P \leq 0,001$) w pierwszym sezonie użytkowania rodzin w porównaniu do drugiego. W pierwszych latach pojawienia się *Varroa destructor* w Europie w rodzinach pszczelich jej populacja po czterech latach osiągała 7 do 11 tysięcy osobników i przy tym poziomie stanowiła zagrożenie dla rodziny pszczelej (Ritter i Perschil 1982, Fries i wsp. 1994). Aktualnie zagrożeniem dla rodziny okazuje się znacznie niższa liczba pasożytów. W badaniach własnych wykazano ginięcie rodzin pszczelich przy populacji pasożyta wynoszącej od 2205 do 5645 szt. Populacja pasożyta *Varroa destructor* jest bardzo zmienna i zależy zarówno od cech gospodarza – pszczoły miodnej jak i samego pasożyta, mając wpływ na reprodukcję i śmiertelność roztoczy (Fries i wsp., 1994, Calis i wsp. 1999b).

W badaniach własnych po drugim sezonie usunięto prawie 5 razy więcej pasożytów w porównaniu do sezonu pierwszego – po utworzeniu rodzin pszczelich. Równocześnie liczba pasożytów, które pozostały w rodzinach do zimowli wzrosła po drugim sezonie prawie ośmiokrotnie w stosunku do początku pierwszej zimowli. Siła rodzin pszczelich wyrażona liczbą pszczół w listopadzie była istotnie ($P \leq 0,001$) niższa po drugim sezonie użytkowania (2495 szt.) w stosunku do pierwszego (6421 szt.). Efektem zmniejszenia liczby pszczół było wypszczenie się (zginiecie) 60% rodzin po drugim sezonie użytkowania. Zaobserwowano, że po drugim sezonie zginęły rodziny, które po pierwszym sezonie charakteryzowały się z reguły wysoką liczebnością pszczół. Zaobserwowane upadki wystąpiły znacznie wcześniej niż dwadzieścia lat temu, kiedy w klimacie umiarkowanym rodziny nieleczone ginęły z powodu warrozy po 3 - 4 latach od początku inwazji (Korpela i wsp. 1993, Buchler 1994).

W 2011 roku od sierpnia do połowy listopada wykonano badanie poziomu naturalnego osypu pasożytów w rodzinach produkcyjnych. Obserwacje wykazały, że w ciągu 10 tygodni osypało się naturalnie z rodzin od 189 do 6252 pasożytów z rodziny (średnio od 19 do 625 szt./tydzień). Po zastosowaniu leczenia trwającego 5 tygodni (1 raz 3,2% kwas szczawiowy + 3 razy Apiwarolem) usunięto następną populację pasożyta (od 296 do 2964 szt./rodzinę) (średnio od 59 do 593 szt./tydzień). Poziom osypu naturalnego był podobny do osypu

wymuszonego lekami. Na podstawie danych z osypów naturalnych i po leczeniu wyliczono ubytki naturalne pasożytów na średnim poziomie ponad 40% przy porównaniu do liczby ogółem usuniętych pasożytów z rodzin w okresie 15 tygodni. W okresie od sierpnia do początku października osyp naturalny charakteryzował się okresowymi wzrostami jak i spadkami liczby roztoczy. Zaobserwowano dwa szczyty liczby osypianych naturalnie pasożytów. Pierwszy "mały" szczyt wystąpił w drugim tygodniu sierpnia, a drugi "duży" na przełomie sierpnia i września - trzy tygodnie po pierwszym szczycie odnotowanych osypów. Zwiększenie liczby osypujących się naturalnie pasożytów świadczy o okresowym wzroście liczby roztoczy w rodzinach. Stwierdzony szczyt naturalnej śmiertelności pasożyta przypadający na początek sierpnia świadczy o dużej aktywnej populacji roztoczy w drugiej połowie lipca. W warunkach Dolnego Śląska aby nie dopuścić do dalszego wzrostu populacji należy zastosować zabieg przeciwko warrozie w drugiej połowie lipca. W przypadku nie zastosowania zabiegów przeciwko warrozie populacja szybko osiąga poziom zagrażający istnieniu rodziny pszczelej. Wybór spójnego terminu leczeniem rodzin zgodnego z wzrostem populacji pasożytów jest możliwy przy stałym monitoringu osypów naturalnych z użyciem osiatkowanych dennic w drugiej połowie sezonu pszczelarskiego. Znajomość liczby osypujących się roztoczy może istotnie wpłynąć na poziom skuteczności zabiegu ograniczającego liczbę pasożyta w rodzinach. Przy braku monitoringu populacji warrozy w pasiece stosowanie środków długo działających w rodzinach (6 - 8 tygodni) daje większą skuteczność ochrony rodzin w stosunku do jednorazowego zabiegu o krótkim czasie działania.

7.2. Wpływ stosowania kwasów organicznych na mikroklimat rodziny pszczelej

Poszczególne rejony gniazda pszczelego charakteryzują się różną temperaturą, jedynie temperatura gniazda z czerwiem regulowana jest z dużą dokładnością, gdyż czerw do swojego rozwoju naturalnego potrzebuje temperatury powyżej 33°C (Woyke 1998). W okresie zimy wewnątrz kłębu temperatura waha się od 20 do 30°C, zewnętrzne warstwy kłębu mają się temperaturę od 10 do 12°C (Chuda-Mickiewicz 1994). Dorosłe pszczoły znoszą wilgotność względną powietrza od 20 do 70% (Atmowidjojo i wsp. 1997, Muszyńska 1989). Obserwowane w badaniach własnych temperatury i wilgotności względne gniazda pszczelego rodzin nie poddanych zabiegom korespondowały z danymi literaturowymi. Stosowanie kwasów organicznych (mrówkowy 65 i 83%, mlekowy 15% i szczawiowy 3,2%) w rodzinach pszczelich nie wykazało ich istotnego wpływu na badane parametry mikroklimatu (temperatury w centrum i na brzegu gniazda, wilgotności względnej i stężenia

CO₂). Jedynie w przypadku stosowania kwasu mrówkowego 65% zaobserwowano podwyższoną średnią dobową wilgotność w pierwszym tygodniu aplikacji kwasu, mimo niskich średnich dobowych wilgotności względnych środowiska zewnętrznego. Zanotowana sytuacja była spowodowana obecnością umiarkowanego pożytku z nawłoci. Podwyższone temperatury gniazda (przy braku czerwii) zaobserwowano po stosowaniu kwasu mlekowego 15% w stosunku do okresu poprzedzającego zabieg, jednak z uwagi na małą liczbę badanych rodzin (n=2) poczynione obserwacje nie upoważniają do jednoznacznego wnioskowania. Uzyskane wyniki stężenia CO₂ monitorowanego 2 razy na dobę nie pokazały dużych zmian wartości podczas stosowania kwasów organicznych.

7.3. Wpływ stosowania kwasów organicznych na obraz histologiczny jelita środkowego

Błony perytroficzne owijają przechodzącą treść pokarmową i chronią nabłonek żołądka przed uszkodzeniem. Stare błony perytroficzne są stopniowo rozrywane i usuwane z żołądka razem z niestrawionymi resztkami pokarmowymi. W wyniku intensywnego działania komórki nabłonka błony śluzowej żołądka szybko się zużywają i muszą być zastąpione przez nowe. W tym celu działają tzw. centra (krypty) regeneracyjne, co pozwala na odtworzenie nabłonka (Morse i Hooper 1985, Kubišová 2003). Występowanie w obfitości błon perytroficznych wydłuża czas pobytu treści pokarmowych w jelicie środkowym, co zwiększa wykorzystanie składników pokarmowych. Prawidłowa budowa ścian jelita środkowego charakteryzuje się aktywnością centrów regeneracyjnych i widocznymi jądrami komórkowymi. Podawanie preparatu probiotycznego pszczołom w badaniach Crailsheim (1988) i Szymaś i Przybył (2007) wpłynęło na zwiększenie obecności błon perytroficznych w świetle jelit. Natomiast ekspozycja jelit pszczoł na toksyczne związki (np. fluorek sodu) spowodowała zmiany w obrazach jąder i cytoplazmie, które uległy wakuolizacji do błony podstawnej (Bielenin i Ibek 1980). W badaniach własnych przy prawidłowym obrazie mikroskopowym preparatów histologicznych ścian jelit środkowych wypełnionych pyłkiem stwierdzono występowanie enterocytów w różnych fazach wydzielniczych. W przekrojach jelit środkowych bez obecności pyłku obserwowano silną działalność wydzielniczą enterocytów w postaci nagromadzenia ziarnistości w ich cytoplazmie. Natomiast jelita wypełnione ziarnami pyłku charakteryzowały się obfitymi błonami perytroficznymi i wyraźną obecnością rąbka szczoteczkowego. Cewki Malpighiego i ich jądra były dobrze widoczne. W przekrojach jelit nie wypełnionych pyłkiem enterocyty były wydłużone (wysokie) w stadium fazy wydzielniczej. W świetle jelit bez ziaren pyłku widoczne były obfite błony perytroficzne.

Stosowanie kwasu mrówkowego 65 i 83% w badaniach własnych spowodowało nasilające się w czasie (od 1 do 14 doby obserwacji) występowanie stanów patologicznych jelita środkowego pszczół robotnic. W pierwszych 10 dniach od rozpoczęcia aplikacji kwasu 65% stanom patologicznym towarzyszyły procesy regeneracyjne jelit, które jednak uległy spowolnieniu pod koniec drugiego tygodnia. Procesy regeneracyjne były obserwowane głównie w przekrojach jelit bez ziaren pyłku. Po aplikacji kwasu mrówkowego 83% zaobserwowano szybsze wystąpienie ostrzejszych zmian w stanie jelit środkowych pszczół (od 1 doby) utrzymujących się do czternastej doby obserwacji w porównaniu do stanu jelit po zastosowaniu kwasu mrówkowego 65%. W pierwszej dobie po zastosowaniu kwasu mrówkowego 83% w obrazie mikroskopowym preparatów histologicznych zaobserwowano bardzo silne złuszczenie enterocytów - rozpad komórek częściowy do całkowitego po błonę podstawną oraz zatarcie struktury komórkowej enterocytów. W czternastej dobie po zastosowaniu kwasu mrówkowego obserwowano w jelitach środkowych pszczół silne zmniejszenie wysokości enterocytów i widoczne w nich objawy wakuolizacji i dystrofii. W komórkach widoczne było powiększenie jąder i przejaśnienie chromatyny jądrowej. Zaobserwowano brak światła między ścianą jelita a błonami perytroficznymi. Widoczny był rozplem (rozpad) komórek centrów regeneracyjnych. Błony perytroficzne były bardzo skąpe, a w przekrojach obserwowano obrzmienie cewek Malpighiego. Najbardziej odbiegający od prawidłowej budowy był stan jelit w czternastym dniu od rozpoczęcia aplikacji kwasu mrówkowego. Udokumentowane niekorzystne zmiany jelit pszczół do piętnastego dnia życia wywołane aplikacją kwasu mrówkowego mogą mieć niekorzystne implikacje dla prawidłowego funkcjonowania rodziny pszczelej – zwłaszcza w okresie wychowu czerwiu. Podobne niekorzystne zmiany w obrazie histologicznym przewodu pokarmowego larw pszczół przy stosowaniu kwasu mrówkowego 85% w rodzinach pszczelich zostały udokumentowane w badaniach Gregorc i wsp. (2004). Autorzy ci stwierdzili, iż kwas mrówkowy wywołuje rozległą śmiertelność komórek tkanek nabłonkowych i pod nabłonkowych. Po 21 godzinach od zastosowania kwasu mrówkowego u larw 3 dniowych stwierdzono 96% a u 5 dniowych 100% śmiertelność komórek.

Kwas szczawiowy jest jednym z najsilniejszych kwasów karboksylowych o działaniu drażniącym tkanki (Morrison i Boyd 1985). W pierwszej dobie po zastosowaniu kwasu szczawiowego 3,2 % w obrazie mikroskopowym preparatów histologicznych zaobserwowano lekkie powiększenie jąder przy błonie podstawnej i lekkie wydłużenie samych enterocytów. Natomiast w siódmej od zastosowania kwasu stan fizjologiczny ścian jelit środkowych pszczół było prawidłowy, z zauważalną wzmożoną aktywnością centrów regeneracyjnych.

W badaniach wykonanych przez Gregorc i wsp. (2004) z użyciem kwasu szczawiowego stwierdzono śmiertelność komórek nabłonka jelita środkowego na poziomie 25% po 5 godzinach od zastosowania kwasu u larw 3 i 5 dniowych.

Zastosowany w badaniach własnych kwas mlekowy 15% nie spowodował zmian w obrazie histologicznym jelit środkowych pszczoł robotnic. W preparatach były dobrze widoczne, obfite błony perytroficzne. Prawidłowy obraz mikroskopowy preparatów histologicznych uzyskany w badaniach własnych może świadczyć iż kwas mlekowy nie miał negatywnego wpływu na układ pokarmowy pszczoł robotnic. Brak negatywnego wpływu kwasu mlekowego na jelita środkowe pszczoł jest zgodny wynikami badań Szymaś (2007), w których pszczoły młode były karmione pokarmem z dodatkiem kwasu mlekowego.

7.4. Wpływ stosowania kwasów organicznych na aktywność enzymatyczną jelita środkowego

Pszczoły nowo wygryzione cechują się szybkim wzrostem aktywności enzymów proteolitycznych w przewodzie pokarmowym. Szczyt aktywności osiągają w ciągu pierwszego tygodnia życia (Grogan i Hunt 1980, Gilliam i wsp. 1988, Crailsheim i Stolberg 1989). U pszczoł występują sezonowe i zależne od wieku wahania aktywności proteolitycznej (Grogan i Hunt 1984). W badaniach Winston (1987) poziom aktywności trypsyny, elastazy i aminopeptydazy leucynowej wzrastał do 8 dnia życia pszczoły, a następnie ulegał obniżeniu, co jest to dowodem na duże znaczenie pokarmu białkowego w odżywianiu pszczoł w pierwszym tygodniu ich życia. Sagili i Pankiw (2007) wykazali że u młodych pszczoł (7 i 14 doba życia) dobrze odżywionych poziom aktywności enzymatycznej był wyższy w stosunku do pszczoł z ograniczonym poziomem białka w pokarmie. Poziom aktywności enzymatycznej jest uzależniony od diety. Zużycie pyłku ma szczyt u młodych pszczoł, których zachowanie i fizjologia są przystosowane do maksymalnego wykorzystania pokarmu białkowego przy produkcji mleczka pszczelego (Kroon i wsp. 1974), również w badaniach Grogan i Hunt (1980) aktywność chymotrypsyny była najwyższa w jelitach środkowych młodych pszczoł karmionych pyłkiem. W badaniach własnych aktywności enzymatycznej jelit młodych pszczoł robotnic wykazano wpływ stosowania kwasu mrówkowego i szczawiowego na ogólny poziom aktywności enzymatycznej (19 enzymów) - poziom ten uległ obniżeniu. Różnice istotne w poziomach aktywności enzymatycznej wystąpiły głównie w grupie proteaz i glikozydaz. Zastosowanie kwasu mlekowego nie miało wpływu na poziom aktywności enzymatycznej jelit środkowych pszczoł robotnic. Analizując wpływ wieku badanych pszczoł na ogólną aktywność enzymatyczną wykazano istotnie niższą aktywność

enzymatyczną w drugiej dobie życia pszczoł po zastosowaniu kwasów organicznych w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupie proteaz po zastosowaniu kwasów organicznych zaobserwowano trend w obniżeniu aktywności enzymatycznej w każdym analizowanym wieku (do 11 dnia życia), natomiast istotne różnice wykazano jedynie w szóstej dobie życia w stosunku do grupy kontrolnej. Mimo zróżnicowania aktywności enzymatycznej między grupami nie udowodniono statystycznie różnic z powodu małej liczebności obserwacji i stosunkowo dużej zmienności wartości cech. Uzyskane wyniki badań własnych pokazują, iż największe zmiany w aktywności enzymatycznej po zastosowaniu kwasów wystąpiły w drugiej (wszystkie enzymy i glikozydazy) i w szóstej dobie (proteazy) dobie życia, natomiast w jedenastej dobie aktywność enzymatyczna była podobna u pszczoł z grup kontrolnych i doświadczalnych. Uzyskane wyniki własne pokazują, iż aktywność enzymatyczna jelita środkowego obniżyła się po zastosowaniu kwasów organicznych, co u pszczoł nie traktowanych kwasami organicznymi w badaniach innych autorów nie zostało zaobserwowane.

W badania Schmidt i Buchmann (1985) wykazano, że aktywność chymotrypsyny w jelicie środkowym dorosłych pszczoł robotnic była wyższa w lecie w stosunku do zimy, jesieni i wiosny. Natomiast w badaniach Grogan i Hunt (1980) aktywność trypsyny nie była zależna od sezonu i rodzaju pyłku ale była związana z wiekiem pszczoł. Rozpatrując aktywność enzymatyczną pszczoł przygotowanych do zimowli w badaniach własnych stwierdzono, istotne obniżenie aktywności proteaz po zastosowaniu kwasu szczawiowego i mrówkowego w stosunku do aktywności w grupie kontrolnej. Nie wykazano natomiast negatywnego wpływu stosowania kwasów na aktywność esteraz i glikozydaz u pokolenia zimowego pszczoł robotnic. Wykazano różnice w aktywności enzymatycznej jelita środkowego pszczoł pokolenia zimowego w relacji do czasu po ekspozycji (w 1, 5 i 10 dobie). Stosowanie kwasów nie miało wpływu na aktywność esteraz. W grupie proteaz spadek aktywności enzymatycznej nastąpił w pierwszej, piątej i dziesiątej dobie, natomiast obniżoną aktywność glikozydaz stwierdzono w pierwszej i piątej dobie po zastosowaniu kwasów.

Zaobserwowane w badaniach własnych odwrotne, odległe w wartości, korelacje między aktywnością enzymów w grupie kontrolnej i w grupach zastosowanych kwasach świadczą o zmianach w produkcji enzymów w jelicie środkowym młodych pszczoł (do 1 do 11 doby życia). Kwas mlekowy, który nie wykazywał wpływu na aktywność enzymatyczną poszczególnych grup enzymów, to w korelacjach między pojedynczymi enzymami również zaobserwowano rozbieżności między grupą kontrolną i po zastosowanym kwasie.

Zaobserwowane rozbieżne korelacje między enzymami w grupie kontrolnej i w grupach po zastosowanych kwasach świadczą o zmianach aktywności enzymów w jelicie środkowych pszczoł pokolenia zimowego, co może zaburzać funkcje trawienne i obniżać ich żywotność.

8. WNIOSKI

1. W aktualnych warunkach utrzymywania rodzin pszczelich populacja roztoczy *Varroa destructor* pod koniec drugiego sezonu użytkowania rodziny osiąga poziom zagrażający ich istnieniu. Porównanie populacji *Varroa destructor* w dwóch sezonach użytkowania rodzin pszczelich wykazało 5 - krotnie liczniejszą ich populację po drugim sezonie użytkowania, doprowadzając do upadku 60% rodzin pszczelich.
2. Badanie dynamika rozwoju populacji roztoczy *Varroa destructor* w drugiej połowie sezonu pszczelarskiego wykazało krótko okresowe pojawianie się bardzo licznych osypów naturalnych, co utrudnia interpretację skuteczności działania środków ograniczających populację pasożyta. W związku z tym wybór optymalnego terminu usuwania roztoczy z rodzin jest szczególnie ważny przy stosowaniu zabiegów krótko działających (od kilku godzin do kilku dni), natomiast ma mniejsze znaczenie przy stosowaniu środków długo działających (6 - 8 tygodni).
3. Stosowanie kwasu mrówkowego 65 i 83% nie wpłynęło na badane cechy mikroklimatu rodzin pszczelich (temperatury, wilgotności względnej i stężenia CO₂), natomiast przy zastosowaniu kwasu mlekowego i szczawiowego w okresie bez czerwiovym zaobserwowano podwyższenie średnich dobowych temperatur w gnieździe pszczelim (o około 5°C) w pierwszych trzech dobach. Kilkundniowe podwyższenie temperatur po zastosowaniu w zalecanym okresie jesiennym kwasu mlekowego 15% i szczawiowego 3,2% do ograniczania populacji *Varroa destructor* może świadczyć o podwyższonym metabolizmie pszczół w tym okresie i skutkować zwiększonym spożyciem zapasów zimowych.
4. W obrazie mikroskopowym preparatów histologicznych z jelit środkowych pszczół poddanych ekspozycji na kwas mrówkowy 65 i 83% stwierdzono zmiany patologiczne: obniżenie obfitości błon perytroficznych, zaburzenie funkcjonowania centrów regeneracyjnych, zmniejszenie wysokości enterocytów z objawami wakuolizacji i dystrofii. Większe odstępstwa od obrazu prawidłowego zaobserwowano po zastosowaniu kwasu mrówkowego 83%. Zaobserwowane zmiany w budowie jelit środkowych pszczół robotnic w okresie przygotowania rodzin do zimowli sugerują osłabienie pszczół pokolenia zimowego.

5. Stosowanie kwasu mlekowego 15% i kwasu szczawiowego 3,2% w rodzinach pszczelich nie wpłynęło istotnie na obraz mikroskopowy preparatów histologicznych jelit środkowych pszczół robotnic.
6. Z trzech grup enzymów: esteraz ($n = 6$), proteaz ($n = 5$) i glikozydaz ($n = 8$) w jelitach środkowych pszczół najbardziej wrażliwe na działanie zastosowanych kwasów organicznych były proteazy i w nieco mniejszym stopniu glikozydazy.
7. Poziom aktywności enzymatycznej proteaz i glikozydaz w jelitach środkowych młodych pszczół robotnic (do 11 doby życia) uległ istotnemu obniżeniu po zastosowanie kwasu mrówkowego 65% i kwasu szczawiowego 3,2% w rodzinach pszczelich, natomiast zastosowanie kwasu mlekowego 15% nie wywołało istotnych zmian w poziomie aktywności enzymatycznej jelit środkowych u młodych pszczół robotnic.
8. Analizując pszczoły robotnice w wieku od 1 do 11 doby życia wystawione na ekspozycje kwasów organicznych (mrówkowego, szczawiowego, mlekowego) aktywność glikozydaz uległa istotnemu obniżeniu w drugiej dobie życia (pierwszej po zastosowaniu kwasów), natomiast proteaz w szóstej dobie życia (piątej po zastosowaniu kwasów).
9. Okresowe obniżenie się poziomu aktywności enzymatycznej jelita środkowego młodych pszczół robotnic po stosowaniu kwasu mrówkowego i szczawiowego może skutkować zaburzeniem w trawieniu białek i cukrów w stosunku do fizjologicznego wysokiego poziomu aktywności enzymatycznej w tym okresie.
10. Późno jesienne stosowanie kwasów organicznych zaburzało aktywność enzymatyczną jelita środkowego pszczół przygotowanych do zimowli - pszczoły robotnice charakteryzowały się istotnym obniżeniem poziomu aktywności enzymatycznej proteaz w jelitach środkowych po zastosowaniu kwasu mrówkowego 65% i szczawiowego 3,2%.
11. U dorosłych pszczół robotnic przygotowanych do zimowli zaobserwowano istotne obniżenie poziomu aktywności enzymatycznej jelit środkowych w pierwszej i piątej dobie po zastosowaniu kwasów w grupie proteaz i glikozydaz.

12. Korelacje między pojedynczymi enzymami w grupach kontrolnych i w grupach po zastosowanych kwasach w wielu przypadkach były odwrotne, co świadczy o zaburzeniu równowagi w produkcji enzymów i trawieniu składników pokarmowych u pszczoł eksponowanych na kwasy organiczne.
13. Z trzech badanych kwasów organicznych do ograniczania populacji *Varroa destructor* najmniej skutków ubocznych widocznych w obrazie mikroskopowym preparatów histologicznych i aktywności enzymatycznej jelit środkowych pszczoł wystąpiło po stosowaniu kwasu mlekowego 15%.

9. LITERATURA

1. Akyol E., Yeninar H., 2009. Use of oxalic acid to control *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 33 (4) . 285 - 288.
2. Amdam, G.V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W., 2004. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: *Apidae*) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: *Varroidae*): a factor in colony loss during overwintering? J. Econ. Entomol. 97 (3), 741–747.
3. Anderson, D.L., Trueman, J.W.H., 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: *Varroidae*) is more than one species. Exp. Appl. Acarol. 24, 165–189.
4. Applebaum S.W., 1985. Biochemistry of digestion . In : Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Pergamon Press, Oxford. 4, 279 - 311.
5. Apivar: www.apivar.co.nz (strona aktywna 1.05.2012).
6. Ardeshir A., Rahim E., Gholamhosein T., 2002. Laboratory evaluation of some plant essences to control *Varroa destructor* (Acari: *Varroidae*). Experimental and Applied Acarology 27, 319–327.
7. Arechavaleta-Velasco, M.E., Guzman-Novoa, E., 2001. Relative effect of four characteristics that restrain the population growth of the mite *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Apidologie 32 (2), 157–174.
8. Atmowidjojo A., H., Wheeler D., E., Erickson E., H., Cohen A., C., 1997. Temperature tolerance and water balance in feral and domestic honey bees, *Apis mellifera* L. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Physiology Elsevier 118 (4) 1399 - 1403 (5).
9. Bagiński S., 1969. Technika mikroskopowa. PWN, Warszawa.
10. Ball, B.V., Allen, M.F., 1988. The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. Ann. Appl. Biol. 113, 237–244.
11. Ball B. V. 1985. Acute paralysis virus isolated from honey bee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. J. Apicult. Res. 24, 115.
12. Baker R.J., Lehner Y., 1972. A look at honey bee gut functions . Am. Bee J. 112, 336 - 337.
13. Bayer: www.animalhealth.bayerhealthcare.com (strona aktywna 1.05.2012).
14. Beedol: www.beedol.cz (strona aktywna 1.05.2012).

15. Berthoud H., Imdorf A., Haueter M., Radloff S., Neumann P., 2010 Virus infections and winter losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*), J. Apic. Res. 49, 60–65.
16. Beevital: www.beevital.pl (strona aktywna 1.05.2012).
17. Bielenin I., Ibek Z., 1980. Wpływ fluorku sodu na nabłonek jelita środkowego pszczoły miodnej, *Apis mellifera* L. (Apidae, Hymenoptera). Zesz. Nauk. AR Krak. 159, 20: 49-67.
18. Biofaktor: www.biofaktor.pl (strona aktywna 1.05.2012).
19. Biowet: www.biowet.pl (strona aktywna 1.05.2012).
20. Boecking, O., 1992. Defences of bees against *Varroa jacobsoni* defence mechanisms in *Apis cerana* and *Apis mellifera*. Deut. Imker J. 11, 426–430.
21. Boecking, O., Genersch, E., 2008. Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping. J. Consum. Protect. Food Safety 3 (2), 221–228.
22. Bogdanov, S., 2006. Contaminants of bee products. Apidologie 37 (1), 1–18.
23. Bowen I.D., Mullarkey K., Morgan S.M., 1996. Programmed Cell Death during Metamorphosis in the Blow-Fly *Calliphora vomitoria*, Microsc. Res. Tech. (MRT) 34, 202–217.
24. Bowen-Walker, P.L., Martin, S.J., Gunn, A., 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera*) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. J. Invertebr. Pathol. 73, 101–106.
25. Brodsgaard C.J., Nielsen A.A., Hansen H., 2003. Detoxifying enzymes activities in different instarsof honey bees (*Apis mellifera ligustica*) infested by *Varroa* mites (*Varroa destructor*) or affectedby the brood disease caused by *Paenibacillus* larvae larvae. Final Programme and Book of Abstracts XXXVIIIth Apimondia Int. Apicult. Congr. Ljubljana, August 24–29, 2003. p. 128.
26. Büchler R., 1994. *Varroa* tolerance in honey bees – occurrence, characters and breeding. Bee World 49, 6–18.
27. Büchler R., Berg S., Le Conte Y., 2010. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe. Apidologie 41, 393 - 408.
28. Calis, J.N.M., Boot, W.J., Beetsma, J., van den Eijnde, J.H.P.M., de Ruijter, A., van der Steen, J.J.M., 1999a. Effective biotechnical control of *Varroa*: applying knowledge on brood cell invasion to trap honey bee parasites in drone brood. J. Apicult. Res. 38 (1–2), 49–61.

29. Calis, J.N.M., Fries, I., Ryrie, S.C., 1999b. Population modelling of *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30, 111–124.
30. Chen Y. P., Zhao J., Hsu H., Evans J., Feldlaufer M., 2004. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 87, 84–93.
31. Chen Y.P., Evans J., Feldlaufer M., 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honeybee, *Apis mellifera*, *J. Invertebr. Pathol.* 92, 152–159.
32. Chmielewski M., Buczek K., Pliszczynski M., 2007. Odporność pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.) w inwazjach pasożytniczych . *Ann. UMCS, sec. DD, vol. LXII* (1), 15 - 19.
33. Chorbiński P., 2008. Pokonaj warrozę. Wydawnictwo BEE&HONEY Sp. z o.o., wydanie I, 6 - 61.
34. Chorbiński P., 2012. Pokonaj warrozę. Wydawnictwo BEE&HONEY Sp. z o.o., wydanie II - poszerzone, 6 - 77.
35. Chuda-Mickiewicz B., 1994. Wpływ temperatury otoczenia na zachowanie kłębu zimującej rodziny pszczelej. *Akademia Rolnicza Szczecin, Rozprawy*, 162: 1 – 68.
36. Colin M.E., Belzunces L.C., 1992. Evidence of synergy between Prochloraz and Deltamethrin in *Apis mellifera* L: a convenient biological approach. *Pestic. Sci.* 36, 115–119.
37. Cornuet J.M., Beaumont M.A., Estoup A., Solignac M., 2006. Inference on microsatellite mutation processes in the invasive mite, *Varroa destructor*, using reversible jump Markov chain Monte Carlo, *Theor. Popul. Biol.* 69, 129–144.
38. Correa-Marques, M.H., Medina Media, L., Martin, S.J., De Jong, D., 2003. Comparing data on the reproduction of *Varroa destructor*. *Genet. Mol. Res.* 2, 1-6.
39. Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Brieseman, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J.H., Cui, L.W., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318 (5848), 283–287.
40. Crailsheim K., 1988. Transport of leucine in the alimentary canal of the honeybee (*Apis mellifera* L.) and its dependence on season. *J. Insect. Physiol.* 34, 12: 1093-1100.

41. Crailsheim K., Stolberg E., 1989. Influence of diet, age and colony condition upon intestina of proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). J. Insect Physiol. 35, 595 - 602.
42. Currie, R.W., Tahmasbi, G.H., 2008. The ability of high- and low-grooming lines of honey bees to remove the parasitic mite *Varroa destructor* is affected by environmental conditions. J. Can. Zool. 86 (9), 1059–1067.
43. Czekońska K., 2009. Problemu pszczelarstwa początku XXI wieku. Materiały z Naukowej Konferencji Pszczelarskiej, Puławy 10 - 11, 65 - 66.
44. Dade H.A., 1994. Anatomy and dissection of the honeybee. IBRA Cardiff, s. 158.
45. Dahlmann B., Jany K.D., Pfeleiderer G., 1978. The midgut endopeptidases of the honey bee *Apis mellifica*: comparison of the enzymes in different ontogenetic stages. Insect Biochem. 8, 203 - 211.
46. Dandeu J. P., Lux M., Colin M. E., Rabllon J., David B. 1991. Étude immuno-chimique del`hemolymph d`abeille ouvrière adulte (*Apis mellifera* L.) saine ou infestee par *Varroa jacobsoni* Oud. Apidologie 22, 37.
47. De Guzman, L.I., Rinderer, T.E., 1999. Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees. Apidologie 30, 85–95.
48. Delfinado-Baker, M., Aggarwal, K., 1987. A new *Varroa* (Acari: *Varroidae*) from the nest of *Apis cerana* (Apidae). Int. J. Acarol. 13, 233–237.
49. De Guzman, L.I., Delfinado-Baker, M., 1996. A new species of *Varroa* (Acari: *Varroidae*) associated with *Apis koschevnikovi* (Apidae: *Hymenoptera*) in Borneo. Int. J. Acarol. 22, 23–27.
50. De Jong, D., Goncalves, L.S., Morse, R.A., 1984. Dependence of climate of the virulence of *Varroa jacobsoni*. Bee World 65, 117–121.
51. Eguaras, M., Marcangeli, J., Oppedisano, M., Fernandez, N., 1994. Seasonal changes in *Varroa jacobsoni* reproduction in temperate climates of Argentina. Bee Sci. 3, 120–123.
52. Elzen, P.J., Baxter, J.R., Spivak, M., Wilson, W.T., 2000. Control of *Varroa jacobsoni* Oud resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. Apidologie 31, 437–441.
53. Ferreira C., Terra W. R., 1980. Intracellular distribution of hydrolases in the midgut caeca cells from on insect with emphasison plasma membrane - brauna enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 66b, 467 - 473.

54. Floris, I., Satta, A., Cabras, P., Garau, V.L., Angioni, A., 2004. Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. J. Econ. Entomol. 97 (2), 187–191.
55. Fries, I., Camazine, S., Sneyd, J., 1994. Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. Bee World 75, 5–28.
56. Fries, I., Hansen, H., Imdorf, A., Rosenkranz, P., 2003. Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. Apidologie 34, 389–398.
57. Fries, I., Imdorf, A., Rosenkranz, P., 2006. Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate. Apidologie 37, 564–570.
58. Fries, I., Perez-Escala, S., 2001. Mortality of *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies during winter. Apidologie 32, 223–229.
59. Gałuszka H., 1998. Anatomia pszczoły. Pszczelnictwo. Wydawnictwo promocyjne "Albatros", 144 - 149.
60. Garcia-Fernandez, P., Rodriguez, R.B., Orantesbermejo, F.J., 1995. Influence of climate on the evolution of the population-dynamics of the Varroa mite on honeybees in the south of Spain. Apidologie 26 (5), 371–380.
61. Gerula D., Tofilski A., Węgrzynowicz P., Skowronek W., 2009. Computer-assisted discrimination of honeybee subspecies used for breeding in Poland. Journal of Apicultural Science. 53 (2), 105 - 114.
62. Giebel W., Zwillling R., Pfeleiderer G., 1971. The evolution of endopeptidases-XII. The proteolytic enzymes of the honeybee (*Apis mellifica* L.). Comp. Biochem. Physiol. 38B, 197 - 210.
63. Gilliam M., Lorenz B.J., Richardson G.V., 1988. Digestive enzymes and micro-organisms in honey bees *Apis mellifera*: influence of streptomycin, age, season and pollen. Microbios. 55, 95 - 114.
64. Gliński Z., Jarosz J., 1984. Alterations in haemolymph proteins of drone honey bee larvae parasitized by *Varroa jacobsoni*. Apidologie 15, 329 - 338.
65. Gliński Z., Jarosz J. 1988a. Deleterious effects of *Varroa jacobsoni* on the honey bee. Apiacta 23, 42.
66. Gliński Z., Jarosz J. 1988b. *Varroa jacobsoni* invasion and the level of cell-free immunity in upright larvae of the worker honey bee, *Apis mellifera*. Folia Vet. (Kosice) 32, 39.

67. Gliński Z., Jarosz J., 1992. *Varroa jacobsoni* as a carrier of bacterial infections to a recipient bee host. *Apidologie* 23, 25 - 31.
68. Greatti, M., Milani, N., Nazzi, F., 1992. Reinfestation of an acaricide-treated apiary by *Varroa jacobsoni* Oud. *Exp. Appl. Acarol.* 16, 279–286.
69. Goodwin, R.M., Taylor, M.A., McBrydie, H.M., Cox, H.M., 2006. Drift of *Varroa destructor*-infested worker honey bees to neighbouring colonies. *J. Apicult. Res.* 45 (3), 155–156.
70. Gregorc A., Bowen I.D., 1998. Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease, *Cell Biol. Int.* 22, 137–144.
71. Gregorc A., Bowen I.D., 2000. The histochemical characterisation of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus larvae*, Amitraz and Oxytetracycline, *Cell Biol. Int.* 24, 319–324.
72. Gregorc A., Pogačnik A., Bowen I.D., 2004. Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. *Apidologie* 35, 453 - 460.
73. Grogan D. E., Hunt J. U., 1979. Pollenproteases: their potential role in insect digestion. *Insect Biochem.* 9: 309 - 313.
74. Grogan D. E., Hunt J. U., 1980. Age correlated changes in midgut protease activity of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: *Apidae*). *Experientia* 36: 1347 - 1348.
75. Grogan D. E., Hunt J. U., 1984. Chymotrypsinlike activity in the honeybee midgut: patterns in a three-year study. *J. Apic. Res.* 23, 61 - 63.
76. Hamilton W. D., 1964a. The genetic evolution of social behaviour. I. *J. Theor. Biol.* 7, 1–16.
77. Hamilton W. D., 1964b. The genetic evolution of social behaviour II. *J. Theor. Biol.* 7, 17–52.
78. Hamilton W. D., 1987. Kinship, recognition, disease, and intelligence; constraints of social evolution. *Animal Society: Theory and factors*. Ito Y., Brown J. L., Kikkawa J. (red.). Japanese Scientific Society Press, Tokyo, 81–102.
79. Harris, J.W., Harbo, J.R., 1999. Low sperm counts and reduced fecundity of mites in colonies of honey bees (Hymenoptera: *Apidae*) resistant to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: *Varroidae*). *J. Econ. Entomol.* 92, 83–90.
80. Harris, J.W., Harbo, J.R., Villa, J.D., Danka, R.G., 2003. Variable population growth of *Varroa destructor* (Mesostigmata: *Varroidae*) in colonies of honey bees

- hymenoptera: *Apidae*) during a 10-year period. Environ. Entomol. 32 (6), 1305–1312.
81. Hendrikx P., Chauzat M.P., Debin M., Neuman P., Fries I., Ritter W., Brown M., Mutinelli F., Le Conte Y., Gregorc A., 2009, Bee Mortality and Bee Surveillance in Europe, EFSA-Report, <http://www.efsa.europa.eu>.
 82. Higes M., 2005. El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España, Vida Apícola 15–21.
 83. Highfield A.C., El Nagar A., Mackinder L.C.M., Noel L., Hall M.J., Martin S.J., Schroeder D.C., 2009. Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses, Appl. Environ. Microbiol. 75, 7212–7220.
 84. Hillesheim E., Ritter W., Bassand D., 1996. First data on resistance mechanisms of *Varroa jacobsoni* (OUD.) against tau-fluvalinate. Exp. Appl. Acarol. 20, 283 - 296.
 85. Howis M., Berezowski M., Nowakowski P., 2010. Monitorowanie mikroklimatu rodziny pszczołej - system WMA cz. I. Pasięka, 1/2010, 41 - 44.
 86. Howis M., Chorbiński P., Janiszewska K., Nowakowski P., 2011. Skuteczność stosowania kwasu szczawiowego w rodzinach pszczelich do usuwania roztoczy *Varroa destructor*. Med. Weter. (67), 757 - 759.
 87. Howis M., Nowakowski P., 2010. Wpływ poziomu inwazji *Varroa destructor* na produkcję miodu i średnią masę pojedynczej pszczoły w rodzinach przygotowanych do zimowli. Zesz. Nauk. UP Wroc. , Biol. Hod. Zwierz., LXI, 579: 125 - 130.
 88. Jimenez D.R., Gilliam M., 1990. Ultrastructure of the ventriculus of the honey, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. Cell Tissue Res. 261,431 - 443.
 89. Johnson, R.M., Pollock, H.S., Berenbaum, M.R., 2009. Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. J. Econ. Entomol. 102 (2), 474–479.
 90. Kelly R.B., 1975. Pathways of protein secretion in eukaryotes. Science 230. 25 - 32.
 91. Kubišová S., 2003. Stavba Těla včely. Včelařství, Těšínské papírny, spol. s r. o., Český Těšín. s. 5 - 35.
 92. Kefuss J., Vanpoucke J., de Lahitte J.D., Ritter W., 2004. *Varroa* tolerance in France of Intermissa bees from Tunisia and their naturally mated descendants: 1993–2004, Am. Bee J. 144, 563–568.

93. Koeniger, N., Koeniger, G., Wijayagunasekera, N.H.P., 1981. Observations on the adaptation of *Varroa jacobsoni* to its natural host *Apis cerana* in Sri Lanka. *Apidologie* 12, 37–40.
94. Korpela, S., Aarhus, A., Fries, I., Hansen, H., 1993. *Varroa jacobsoni* Oud. in cold climates: population growth, winter mortality and influence on survival of honey bee colonies. *J. Apicult. Res.* 31, 157–164.
95. Kovac H., Crailsheim K., 1988. Lifespan of *Apis mellifera carnica* Pollm. infested by *Varroa jacobsoni* Oud. in relation to season and extent of infestation, *J. Apic. Res.* 27, 230–238.
96. Kraus B., 1992. Further results on lactic acid application as treatment for varroaosis. *Apidologie* 23(4): 385-387.
97. Kraus B., Berg S., 1994. Effect of a lactic acid treatment during winter in temperate climate upon *Varroa jacobsoni* Oud. and the bee (*Apis mellifera* L.) colony. *Experimental and Applied Acarology* 18(8): 459-468.
98. Kroon G.H., Van Praagh J.P., Velthuis H.H.W., 1974. Osmotic shock as a prerequisite to pollen digestion in the alimentary tract of the worker honeybee. *J. Apicult. Res.* 13, 177 -181.
99. Le Conte, Y., Navajas, M., 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Revue scientifique et technique. Office Int. Epizoot.* 27 (2), 499–510.
100. Le Conte, Y., de Vaublanc, G., Crauser, D., Jeanne, F., Rousselle, J.-C., Becard, J.-M., 2007. Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*. *Apidologie* 38 (6), 566 - 572.
101. Lindberg, C.M., Melathopoulos, A.P., Winston, M.L., 2000. Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: *Varroidae*), a honey bee (Hymenoptera: *Apidae*) parasite. *J. Econ. Entomol.* 93 (2), 189–198.
102. Lipiński Z., 2002. Istota oraz mechanizm porzucania gniazd przez roje pszczół miodnych. *Drukarnia Bleman, Olsztyn*, 31 - 35.
103. Lodesani, M., Crailsheim, C., Moritz, R.F.A., 2002. Effect of some characters on the population growth of mite *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* L. colonies and results of a bi-directional selection. *J. Appl. Entomol.* 126, 130–137.
104. Martin, S., 1998. A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Ecol. Model.* 109, 267–281.

105. Martin, S.J., Kemp, D., 1997. Average number of reproductive cycles performed by *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. J. Apicult. Res. 36, 113–123.
106. Martel, A.C., Zeggane, S., Aurieres, C., Drajnudel, P., Faucon, J.P., Aubert, M., 2007. Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar (R) or Asuntol (R) 50. Apidologie 38 (6), 534–544.
107. Martin, S., 1998. A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Ecol. Model. 109, 267–281
108. Martin, S.J., 2001a. The role of *Varroa* and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. J. Appl. Ecol. 38 (5), 1082–1093.
109. Martin, S., 2001b. *Varroa destructor* reproduction during the winter in *Apis mellifera* colonies in UK. Exp. Appl. Acarol. 25, 321–325.
110. Martins G.F., Neves C.A., Campos L.A.O., Serrão J.E., 2006. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. Micron 37, 161–168.
111. Massivholz-tischler: www.massivholz-tischler.at (strona aktywna 1.05.2012).
112. Milani, N., 1995. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids – alaboratory assay. Apidologie 26, 415–429.
113. Milani, N., 1999. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. Apidologie 30, 229–234.
114. Miranda J., Cameron C., Camazine S. 2003. Bees, *Varroa* and viruses. Final Programme and Book of Abstracts XXXVIIIth Apimondia Int. Apicult. Congr. Ljubljana, August 24–29, 2003, s. 520.
115. Moraes R.L.M.S., Bowen I.D., 2000. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L.), Cell Biol. Int. 24, 734–737.
116. Morrison R.T., Boyd R.N., 1985. Chemia organiczna. PWN, Warszawa, s. 697.
117. Morse R. A., Hooper T., 1985. The Illustrated Encyclopedia of Beekeeping. E.P. Dutton, Inc. s. 432.
118. Mortiz B., Crailsheim K., 1987. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). J. Insect Physiol. 33, 923 - 931.
119. Moritz, R.F., Mautz, D., 1990. Development of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera carnica*. Apidologie 21, 53–58.

120. Moretto, G., Goncalves, L.S., De Jong, D., Bichuette, M.Z., 1991. The effects of climate and bee race on *Varroa jacobsoni* Oud. infestations in Brazil. *Apidologie* 22, 197–203.
121. Muszyńska J., 1989. Zimowanie pszczół. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i leśne, Warszawa, 4 – 35.
122. Mutinelli, F., Cremasco, S., Irsara, A., Baggio, A., Nanetti, A., Massi, S., 1996. Organic acids and Api Life VAR in the control of varroosis in Italy. *Apicoltura Moderna* 87(3): 99-104.
123. Narayanappa N., Rajagopal D., Gowda G. 2003. Resistance mechanism of European honeybee (*Apis mellifera*) against brood mite, *Tropilaelaps clareae*. Final Programme and Book of Abstracts XXXVIIIth Apimondia Int. Apicult. Congr. Ljubljana, August 24–29, 2003. s. 196.
124. Navajas, M., Migeon, A., Alaux, C., Martin-Magniette, M.L., Robinson, G.E., Evans, J.D., Cros-Arteil, S., Crauser, D., Le Conte, Y., 2008. Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* associated with *Varroa destructor* infection. *BMC Genom.* 9, 301.
125. Oldroyd, B.P., 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends Ecol. Evol.* 14, 312–315.
126. Oudemans A.C., 1904. On a new genus and species of parasitic acari. Notes from the Leyden Museum. 24, 216–222.
127. Palade G, 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis, *Science* 189, 347-358.
128. Papaefthimiou C., Pavlidou V., Gregorc A., Theophilidis G., 2002. The action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the isolated heart of insect and amphibia, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11, 127– 140.
129. Peng, Y.S., Fang, Y., Xu, S., Ge, L., Nasr, M.E., 1987. Response of foster Asian honey bee (*Apis cerana* Fabr.) colonies to the brood of European honey bee (*Apis mellifera* L.) infested with parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *J. Invertebr. Pathol.* 49, 259–264.
130. Peters W., Kalnis M., 1985. Aminopeptidases as immobilized enzymes on the peritrophic membranes of insects. *Entomol. Gen.* 11, 25 - 32.
131. Pettis J.S., Delaplane K.S., 2010. Coordinated Responses to Honey Bee Decline in the USA, *Apidologie* 41, 256 - 263.

132. Renz, M., Rosenkranz, P., 2001. Infestation dynamics and reinvasion of *Varroa destructor* mites in honey bee colonies kept isolated and in groups. *Apidologie* 32, 492–494.
133. Rinderer T.E., Harris J.W., Hunt G.J., Guzman de L.I., 2010. Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America, *Apidologie* 41, 409–424.
134. Ritter W., Perschil F., 1982. Controlling *Varroa* Disease with Folbex Va Neu, *Apidologie* 13, 323–324.
135. Ritter W., Leclercq E., Koch W., 1984. Observations on Bee and *Varroa* Mite Populations in Infested Honey Bee Colonies, *Apidologie* 15, 389–399.
136. Rosenkranz, P., 1993. A bioassay for the test of the host finding behaviour of *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 24, 486–488.
137. Rosenkranz, P., Kirsch, R., Renz, R. 2006. Population dynamics of honey bee colonies and *Varroa* tolerance: a comparison between Uruguay and Germany In: Santana, Lobo, Hartfelder (Eds.), *Proceedings 7th Encontro Sobre Abelhas*, USP, Ribeirao Preto, Brazil.
138. Rosenkranz P., Tewarson N. C. 1992. Experimental infection of *Apis cerana indica* worker brood with *Varroa* females. *Apidologie* 23, 365 - 367.
139. Ruttner, F., Ritter, W., 1980. Das Eindringen von *Varroa jacobsoni* nach Europa im Ruckblick. *Allg. Deut. Imkerz.* 14, 130–134.
140. Satta, A., Floris, I., Eguaras, M., Cabras, P., Garau, V.L., Melis, M., 2005. Formic acid based treatments for control of *Varroa destructor* in a mediterranean area. *J. Econ. Entomol.* 98 (2), 267–273.
141. Sagili R. R., Pankiw T., 2007. Effects of protein-constrained brood food on honey bee (*Apis mellifera* L.) pollen foraging and colony growth. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 61, 1471 - 1478.
142. Sawicki W., 2005. Techniki używane w histologii. *Histologia wydanie IV* (dodruk). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa. 17 - 22.
143. Schmidt J.O., Buchmann S.L., 1985. Pollen digestion and nitrogen utilization by *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79, 804 - 807.
144. Schumaker T.T.S., Cristofolletti P.T., Terra W.D., 1993. Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteinases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: *Meliponinae*) larvae, *Apidologie* 24, 3–17.
145. Seeley, T.D., 2007. Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States. *Apidologie* 38, 19–29.

146. Serrão J.E., Cruz-Landim C., 1996. A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera Apidae: *Meliponinae*). J. Adv. Zool. 17, 1 - 6.
147. Stanley R. G., Linskens H F., 1974. Pollen: Biology, Biochemistry and Management. Springer Verlag, New York.
148. Stabentheiner A., 2001. Thermoregulation of dancing bees: thoracic temperature of pollen and nectar foragers in relation to profitability of foraging and colony need. Journal of Insect Physiology 47, 385 - 392.
149. Szymaś B., 1976. Histologiczna ocena zmian nabłonka jelita środkowego pszczół miodnych żywionych namiastkami pyłku. Roczn. AR Pozn. 88, Zoot. 22: 141 - 147.
150. Szymaś B., 1994. Ocena wartości odżywczej surogatów pyłku kwiatowego dla pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.). Roczn. AR Pozn. Rozpr. Nauk. 256: 1 - 68.
151. Szymaś B., Przybył A., 2007. Midgut histological picture of the honey bee (*Apis mellifera* L.) following consumption of substitute feeds supplemented with feed additives. Nauka Przyr. Technol. 1, 4, 1 - 9.
152. Tautz J., 2008. Fenomen pszczół miodnych. Galaktyka Sp. z o.o., Łódź: 217 – 248.
153. Tentcheva D., Gauthier L., Bagny L., Fievet J., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E., Bergoin M., 2006. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. Apidologie 37, 41 - 50.
154. Thrybom B., Fries I., 1991. Development of infestations by *Varroa jacobsoni* in hybrid colonies of *Apis mellifera monticola* and *Apis mellifera ligustica*. J. Apicult. Res. 30, 151.
155. Tofilski A., 2009. Shorter-lived workers start foraging earlier. Insect Soc. 56, 359 - 366.
156. Tomaszewska B., Chorbiński P., 2000. Choroby owadów użytkowych. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu. 26 - 28.
157. Van Engelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B.K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarpay D.R., Pettis J.S., 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. PLoS One 4 (8): e6481,
158. Vasquez A., Olofsson T.C., Sammartaro D., 2009. A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA – A comparison with bees from Sweden, Apidologie 40, 26–28.
159. Vita-europe: www.vita-europe.com (strona aktywna 1.05.2012).

160. Wallner, K., 1999. Varroa cides and their residues in bee products. *Apidologie* 30, 235–248.
161. Weinberg K. P., Madel G. 1985. The influence of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. on the protein concentration and the haemolymph volume of the blood of worker bees and drones of the honey bee *Apis mellifera* L. *Apidologie* 16, 421 - 436.
162. Whitcomb W., Wilson H.F., 1929. Mechanics of digestion of pollen by the adult honey bee and the relation of undigested parts to dysentery of bees, Wisconsin Agriculture Experiment Station Research Bulletin. 92, 1 -27.
163. Wilde, J., Fuchs, S., Bratkowski, J., Siuda, M., 2005. Distribution of *Varroa destructor* between swarms and colonies. *J. Apicult. Res.* 44 (4), 190–194.
164. Wilde J., Koeniger N., 1992. Selektion auf Verkürzung der Zellverdecklungsdauer (ZVD) der Arbeiterinnenbrut von *Apis mellifera carnica*. *Ann. UMCS, sec. DD*, 47, 133.
165. Winston M. L., 1987: The Biology of the Honey Bee. Cambridge, MA: Harvard University Press, s. 281.
166. Wilson E. O., 1971. The insect societies. Belknap Press of Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts; s. 548.
167. Woyciechowski M., 1985. Socjobiologia, ewolucja altruizmu a pszczelarstwo. *Przegląd Zoologiczny* 29, 269–292.
168. Woyciechowski M., Moroń D., 2009. Life expectancy and onset of foraging in the honeybee (*Apis mellifera*). *Ins. Soc.* 56, 193–201.
169. Woyciechowski M., Kozłowski J., 1998. Division of labor by division of risk according to worker life expectancy in the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 29, 143–157.
170. Woyke J., 1998. Biologia pszczół., Pszczelnictwo. Wydawnictwo Promocyjne „Albatros”, Szczecin: 183 – 238.
171. Woyke J., 2008. Biologia pszczół. Hodowla Pszczół. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań, 77 - 103.
172. Yue C., Schroder M., Bienefeld K., Genersch E., 2006. Detection of viral sequences in semen of honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for vertical transmission of viruses through drones, *J. Invertebr. Pathol.* 92, 105–108.
173. Yue C., Schroder M., Gisder S., Genersch E., 2007. Vertical-transmission routes for deformed wing virus of honeybees (*Apis mellifera*), *J. Gen. Virol.* 88, 2329–2336.

174. Zhrebkin M.V., 1967. Secretion of digestive enzymes in the midgut of the worker bee. The XXist International Apicultural Congress, Maryland. Apimondia Publishing House . Bucharest. s. 476.

10. ZAŁĄCZNIKI

W załącznikach 1 - 8 wartości korelacji pogrubione czcionką są istotne przy $P \leq 0,05$.
Oznaczeniom w załącznikach 1 - 8 odpowiadają następujące nazwy enzymów:

- E - esterazy: 1E - fosfataza alkaliczna, 2E - esteraza C4, 3E - esteraza lipaza C8, 4E - lipaza C14, 10E - kwaśna fosfataza, 11E - fosfohydrolazanaftylo-AS-BI
- P - proteazy: 5P - aryamidaza leucyny, 6P - aryamidaza waliny, 7P - aryamidaza cystyny, 8P - tripsyna, 9P - α -chymotrypsyna
- G - glikozydazy: 12G - α -galaktozydaza, 13G - β -galaktozydaza, 14G - β -glukuronidaza, 15G - α -glukozydaza, 16G - β -glukozydaza, 17G - N-acetylo- β -glukozamidaza, 18G - α -mannozydaza, 19G - α -fukozydaza

Załącznik 1. Korelacje proste między poziomami aktywności enzymatycznej poszczególnych enzymów u pszczoł młodych w grupie kontrolnej

	1E	2E	3E	4E	5P	6P	7P	8P	9P	10E	11E	12G	13G	14G	15G	16G	17G	18G	19G
1E	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2E		1,00	0,17	-0,26	-0,61	-0,26	-0,66	-0,66	-0,85	0,13	0,00	0,91	0,00	-0,19	0,00	-0,26	-0,91	-0,19	-0,17
3E			1,00	0,53	0,36	0,53	0,13	0,13	0,12	0,13	0,00	-0,08	0,00	0,56	0,00	0,53	0,08	0,56	0,33
4E				1,00	0,93	1,00	0,25	0,25	0,46	-0,50	0,00	-0,63	0,00	0,71	0,00	1,00	0,63	0,71	0,63
5P					1,00	0,93	0,46	0,46	0,71	-0,46	0,00	-0,88	0,00	0,65	0,00	0,93	0,88	0,65	0,59
6P						1,00	0,25	0,25	0,46	-0,50	0,00	-0,63	0,00	0,71	0,00	1,00	0,63	0,71	0,63
7P							1,00	1,00	0,93	-0,50	0,00	-0,63	0,00	0,71	0,00	0,25	0,63	0,71	0,63
8P								1,00	0,93	-0,50	0,00	-0,63	0,00	0,71	0,00	0,25	0,63	0,71	0,63
9P									1,00	-0,46	0,00	-0,88	0,00	0,65	0,00	0,46	0,88	0,65	0,59
10E										1,00	0,00	0,32	0,00	-0,71	0,00	-0,50	-0,32	-0,71	-0,79
11E											1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
12G												1,00	0,00	-0,45	0,00	-0,63	-1,00	-0,45	-0,40
13G													1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14G														1,00	0,00	0,71	0,45	1,00	0,89
15G															1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16G																1,00	0,63	0,71	0,63
17G																	1,00	0,45	0,40
18G																		1,00	0,89
19G																			1,00

Załącznik 2. Korelacje proste między poziomami aktywności enzymatycznej poszczególnych enzymów u pszczoł młodych w grupie po zastosowaniu kwasu mrówkowego

	1E	2E	3E	4E	5P	6P	7P	8P	9P	10E	11E	12G	13G	14G	15G	16G	17G	18G	19G
1E	1,00	0,00	0,20	0,00	0,58	0,40	0,29	0,55	0,58	0,77	0,45	0,00	0,77	0,11	0,63	0,45	0,11	0,58	0,54
2E		1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3E			1,00	0,00	0,42	0,80	-0,29	0,55	0,42	0,77	0,45	0,00	0,00	0,54	-0,63	-0,45	-0,76	-0,58	0,11
4E				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5P					1,00	0,83	0,61	0,91	0,79	0,64	0,56	0,00	0,64	0,50	0,13	0,56	0,23	0,38	0,05
6P						1,00	0,29	0,82	0,58	0,77	0,45	0,00	0,39	0,76	-0,32	0,00	-0,22	-0,17	-0,11
7P							1,00	0,53	0,36	0,00	0,22	0,00	0,76	0,48	0,46	0,65	0,79	0,61	-0,16
8P								1,00	0,91	0,71	0,82	0,00	0,71	0,59	0,00	0,41	0,00	0,23	0,30
9P									1,00	0,64	0,93	0,00	0,64	0,23	0,13	0,56	-0,05	0,38	0,59
10E										1,00	0,58	0,00	0,50	0,42	0,00	0,00	-0,42	0,00	0,42
11E											1,00	0,00	0,58	0,24	0,00	0,33	-0,24	0,19	0,73
12G												1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13G													1,00	0,42	0,61	0,58	0,42	0,64	0,42
14G														1,00	-0,34	-0,24	-0,06	-0,32	-0,29
15G															1,00	0,71	0,69	0,92	0,34
16G																1,00	0,73	0,93	0,24
17G																	1,00	0,77	-0,29
18G																		1,00	0,32
19G																			1,00

Załącznik 3. Korelacje proste między poziomami aktywności enzymatycznej poszczególnych enzymów u pszczoł młodych w grupie po zastosowaniu kwasu mlekowego

	1E	2E	3E	4E	5P	6P	7P	8P	9P	10E	11E	12G	13G	14G	15G	16G	17G	18G	19G
1E	1,00	0,20	0,00	-0,32	-0,20	-0,20	-0,32	0,54	0,88	1,00	0,45	0,32	1,00	0,63	1,00	0,45	0,88	0,20	-0,54
2E		1,00	0,00	0,32	0,20	0,20	0,32	0,76	0,29	0,20	-0,45	0,63	0,20	0,32	0,20	0,45	0,29	1,00	-0,11
3E			1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4E				1,00	-0,32	0,63	0,25	0,34	-0,46	-0,32	-0,71	-0,25	-0,32	-0,50	-0,32	0,00	-0,46	0,32	-0,34
5P					1,00	-0,20	-0,32	-0,11	0,29	-0,20	0,45	0,32	-0,20	-0,32	-0,20	0,45	0,29	0,20	0,11
6P						1,00	0,63	0,54	-0,29	-0,20	-0,45	-0,63	-0,20	-0,32	-0,20	-0,45	-0,29	0,20	0,11
7P							1,00	0,34	-0,46	-0,32	-0,71	-0,25	-0,32	0,25	-0,32	-0,71	-0,46	0,32	0,69
8P								1,00	0,48	0,54	-0,24	0,17	0,54	0,34	0,54	0,24	0,48	0,76	-0,29
9P									1,00	0,88	0,65	0,46	0,88	0,46	0,88	0,65	1,00	0,29	-0,48
10E										1,00	0,45	0,32	1,00	0,63	1,00	0,45	0,88	0,20	-0,54
11E											1,00	0,00	0,45	0,00	0,45	0,33	0,65	-0,45	-0,24
12G												1,00	0,32	0,50	0,32	0,71	0,46	0,63	-0,17
13G													1,00	0,63	1,00	0,45	0,88	0,20	-0,54
14G														1,00	0,63	0,00	0,46	0,32	0,17
15G															1,00	0,45	0,88	0,20	-0,54
16G																1,00	0,65	0,45	-0,73
17G																	1,00	0,29	-0,48
18G																		1,00	-0,11
19G																			1,00

Załącznik 4. Korelacje proste między poziomami aktywności enzymatycznej poszczególnych enzymów u pszczoł młodych w grupie po zastosowaniu kwasu szczawiowego

	1E	2E	3E	4E	5P	6P	7P	8P	9P	10E	11E	12G	13G	14G	15G	16G	17G	18G	19G
1E	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2E		1,00	0,45	0,00	0,41	0,73	0,22	0,45	0,24	0,33	1,00	0,00	0,00	-0,45	0,00	-0,45	0,24	0,00	0,45
3E			1,00	0,63	0,00	-0,11	-0,29	-0,20	-0,11	-0,45	0,45	-0,63	-0,63	-1,00	-0,63	-1,00	-0,76	-0,63	-0,20
4E				1,00	0,43	-0,17	0,00	-0,32	0,34	-0,71	0,00	-1,00	-1,00	-0,63	-1,00	-0,63	-0,69	-0,25	0,16
5P					1,00	0,59	0,53	0,27	0,89	0,00	0,41	-0,43	-0,43	0,00	-0,43	0,00	0,30	0,43	0,82
6P						1,00	0,79	0,87	0,65	0,24	0,73	0,17	0,17	0,11	0,17	0,11	0,65	0,17	0,54
7P							1,00	0,88	0,79	-0,22	0,22	0,00	0,00	0,29	0,00	0,29	0,48	0,00	0,29
8P								1,00	0,54	0,00	0,45	0,32	0,32	0,20	0,32	0,20	0,54	-0,16	0,10
9P									1,00	-0,24	0,24	-0,34	-0,34	0,11	-0,34	0,11	0,29	0,17	0,54
10E										1,00	0,33	0,71	0,71	0,45	0,71	0,45	0,73	0,71	0,45
11E											1,00	0,00	0,00	-0,45	0,00	-0,45	0,24	0,00	0,45
12G												1,00	1,00	0,63	1,00	0,63	0,69	0,25	-0,16
13G													1,00	0,63	1,00	0,63	0,69	0,25	-0,16
14G														1,00	0,63	1,00	0,76	0,63	0,20
15G															1,00	0,63	0,69	0,25	-0,16
16G																1,00	0,76	0,63	0,20
17G																	1,00	0,69	0,54
18G																		1,00	0,79
19G																			1,00

Załącznik 5. Korelacje proste między poziomami aktywności enzymatycznej poszczególnych enzymów u pszczoł przygotowanych do zimowli w grupie kontrolnej

	1E	2E	3E	4E	5P	6P	7P	8P	9P	10E	11E	12G	13G	14G	15G	16G	17G	18G	19G
1E	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,38	0,59	0,93	0,65	0,79	-0,29	0,00	-0,27	0,00	-0,29	-0,29	-0,46	-0,63
2E		1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,77	-0,40	-0,32	-0,45	-0,76	-0,20	0,00	0,55	0,00	-0,20	-0,20	0,32	0,80
3E			1,00	0,00	0,00	0,00	-0,76	0,00	0,93	0,65	0,79	-0,29	0,00	-0,53	0,00	-0,29	-0,29	0,00	-0,27
4E				1,00	0,00	0,00	-0,42	-0,11	0,69	0,73	0,41	-0,54	0,00	-0,59	0,00	-0,54	0,11	-0,17	-0,03
5P					1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6P						0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7P							1,00	0,00	-0,61	-0,58	-0,84	0,00	0,00	0,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48
8P								1,00	0,32	0,45	0,43	0,20	0,00	-0,27	0,00	-0,40	0,20	-0,79	-0,80
9P									1,00	0,71	0,86	-0,32	0,00	-0,43	0,00	-0,32	-0,32	-0,25	-0,49
10E										1,00	0,73	-0,45	0,00	-0,82	0,00	-0,45	0,45	-0,71	-0,69
11E											1,00	-0,11	0,00	-0,59	0,00	-0,11	-0,11	-0,34	-0,77
12G												1,00	0,00	0,00	0,00	-0,20	-0,20	0,32	0,06
13G													1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14G														1,00	0,00	0,55	-0,55	0,43	0,50
15G															1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16G																1,00	-0,20	0,32	0,06
17G																	1,00	-0,63	-0,31
18G																		1,00	0,78
19G																			1,00

Załącznik 6. Korelacje proste między poziomami aktywności enzymatycznej poszczególnych enzymów u pszczoł przygotowanych do zimowli w grupie po zastosowaniu kwasu mrówkowego

	1E	2E	3E	4E	5P	6P	7P	8P	9P	10E	11E	12G	13G	14G	15G	16G	17G	18G	19G
1E	1,00	0,50	0,91	0,77	0,87	0,87	0,63	0,94	0,95	0,87	0,63	0,79	0,80	0,77	0,80	0,88	0,45	0,16	-0,63
2E		1,00	0,33	0,39	0,00	0,00	-0,16	0,22	0,25	0,11	-0,16	0,63	0,40	0,07	0,40	0,59	0,45	-0,16	-0,32
3E			1,00	0,64	0,86	0,86	0,85	0,94	0,96	0,77	0,66	0,53	0,58	0,67	0,58	0,61	0,19	-0,13	-0,66
4E				1,00	0,67	0,67	0,31	0,64	0,77	0,84	0,61	0,61	0,77	0,81	0,77	0,76	0,00	0,00	0,00
5P					1,00	1,00	0,82	0,96	0,95	0,94	0,82	0,55	0,69	0,85	0,69	0,68	0,26	0,27	-0,55
6P						1,00	0,82	0,96	0,95	0,94	0,82	0,55	0,69	0,85	0,69	0,68	0,26	0,27	-0,55
7P							1,00	0,83	0,79	0,60	0,63	0,13	0,32	0,55	0,32	0,23	0,00	-0,13	-0,63
8P								1,00	0,97	0,87	0,70	0,61	0,72	0,79	0,72	0,73	0,37	0,18	-0,70
9P									1,00	0,92	0,79	0,63	0,70	0,80	0,70	0,73	0,22	0,08	-0,55
10E										1,00	0,86	0,69	0,76	0,87	0,76	0,79	0,24	0,34	-0,34
11E											1,00	0,50	0,32	0,55	0,32	0,46	0,00	0,25	-0,25
12G												1,00	0,63	0,44	0,63	0,93	0,71	0,50	-0,50
13G													1,00	0,91	1,00	0,88	0,45	0,32	-0,32
14G														1,00	0,91	0,72	0,16	0,22	-0,22
15G															1,00	0,88	0,45	0,32	-0,32
16G																1,00	0,65	0,46	-0,46
17G																	1,00	0,71	-0,71
18G																		1,00	-0,25
19G																			1,00

Załącznik 7. Korelacje proste między poziomami aktywności enzymatycznej poszczególnych enzymów u pszczoł przygotowanych do zimowli w grupie po zastosowaniu kwasu mlekowego

	1E	2E	3E	4E	5P	6P	7P	8P	9P	10E	11E	12G	13G	14G	15G	16G	17G	18G	19G
1E	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2E		1,00	0,00	1,00	-0,20	-0,29	-0,32	-0,42	-0,29	0,45	-0,40	0,80	-0,29	1,00	-0,45	0,20	-0,63	0,91	0,84
3E			1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4E				1,00	-0,20	-0,29	-0,32	-0,42	-0,29	0,45	-0,40	0,80	-0,29	1,00	-0,45	0,20	-0,63	0,91	0,84
5P					1,00	0,88	0,63	0,58	0,29	0,45	0,80	0,20	0,88	-0,20	0,45	0,20	0,32	-0,08	-0,24
6P						1,00	0,93	0,61	0,14	0,22	0,88	0,00	0,71	-0,29	0,22	0,29	0,46	-0,12	-0,35
7P							1,00	0,53	0,00	0,00	0,79	-0,16	0,46	-0,32	0,00	0,32	0,50	-0,13	-0,38
8P								1,00	0,85	0,56	0,42	0,17	0,85	-0,42	0,56	0,42	0,66	-0,59	-0,79
9P									1,00	0,65	0,00	0,29	0,71	-0,29	0,65	0,29	0,46	-0,61	-0,70
10E										1,00	0,00	0,89	0,65	0,45	0,33	0,45	0,00	0,19	0,00
11E											1,00	-0,20	0,59	-0,40	0,45	0,40	0,63	-0,17	-0,30
12G												1,00	0,29	0,80	0,00	0,40	-0,32	0,58	0,42
13G													1,00	-0,29	0,65	0,29	0,46	-0,36	-0,52
14G														1,00	-0,45	0,20	-0,63	0,91	0,84
15G															1,00	0,45	0,71	-0,56	-0,53
16G																1,00	0,63	0,08	-0,12
17G																	1,00	-0,66	-0,76
18G																		1,00	0,94
19G																			1,00

Załącznik 8. Korelacje proste między poziomami aktywności enzymatycznej poszczególnych enzymów u pszczoł przygotowanych do zimowli w grupie po zastosowaniu kwasu szczawiowego

	1E	2E	3E	4E	5P	6P	7P	8P	9P	10E	11E	12G	13G	14G	15G	16G	17G	18G	19G
1E	1,00	0,86	0,87	0,86	0,94	0,90	0,87	0,83	0,90	0,17	0,34	-0,24	0,17	-0,76	0,54	0,54	0,24	0,23	-0,04
2E		1,00	0,88	0,92	0,88	0,85	0,87	0,88	0,85	-0,25	0,25	0,00	-0,25	-0,32	0,63	0,16	0,00	-0,13	-0,44
3E			1,00	0,90	0,86	0,93	0,98	0,92	0,93	-0,22	0,22	-0,47	0,11	-0,49	0,35	0,14	-0,16	0,15	-0,17
4E				1,00	0,76	0,76	0,83	0,75	0,76	-0,13	0,13	-0,19	-0,13	-0,42	0,58	0,33	0,19	0,24	-0,15
5P					1,00	0,97	0,91	0,93	0,97	0,06	0,50	-0,18	0,06	-0,63	0,55	0,32	0,00	-0,07	-0,22
6P						1,00	0,98	0,98	1,00	-0,07	0,46	-0,37	0,13	-0,58	0,42	0,17	-0,19	-0,03	-0,20
7P							1,00	0,97	0,98	-0,16	0,40	-0,45	0,08	-0,50	0,40	0,10	-0,22	0,04	-0,17
8P								1,00	0,98	-0,22	0,44	-0,31	0,00	-0,42	0,42	0,00	-0,31	-0,17	-0,34
9P									1,00	-0,07	0,46	-0,37	0,13	-0,58	0,42	0,17	-0,19	-0,03	-0,20
10E										1,00	0,50	0,00	0,25	-0,63	0,32	0,79	0,71	0,53	0,77
11E											1,00	0,00	-0,25	-0,32	0,63	0,16	0,00	-0,13	0,22
12G												1,00	-0,71	0,45	0,45	0,00	0,33	-0,56	-0,47
13G													1,00	-0,63	-0,63	0,32	0,00	0,53	0,44
14G														1,00	-0,20	-0,80	-0,45	-0,58	-0,49
15G															1,00	0,40	0,45	-0,08	-0,07
16G																1,00	0,89	0,66	0,56
17G																	1,00	0,56	0,47
18G																		1,00	0,84
19G																			1,00