

Indywidualne i społeczne mechanizmy odporności pszczoły miodnej¹⁾

ANETA STRACHECKA, ALEKSANDRA ŁOŚ, JOANNA FILIPCZUK, MICHAŁ SCHULZ

Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Wydział Biologii, Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950, Lublin

Otrzymano 22.08.2017

Zaakceptowano 15.12.2017

Strachecka A., Łoś A., Filipczuk J., Schulz M.

Individual and social immune mechanisms of the honey bee

Summary

Honey bees (*Apis mellifera*) are constantly exposed to contact with many types of pathogens. However, during evolution they developed a number of immune mechanisms. At the individual level, they comprise 1) resistance mechanisms associated with anatomical and physiological barriers of the body, 2) cell-mediated immunity involving hemocytes (including plasmocytes, lamellocytes, and granulocytes), 3a) congenital humoral resistance related to the activity of lysozyme (N-acetylmuramylhydrolase), the prophenylooxidase system (ProPO) and hemagglutinins (lectins), and 3b) induced humoral resistance based on the action of antimicrobial peptides: apidicines, hymenoptecin, and defensins. In addition to the individual resistance of each bee, there is also a defense mechanism activated at the colony level. Shared secretion resistance is connected with the presence of antipathogenic compounds in secretions and in bee products. Social immunity is associated with hygienic and nursing behaviors, as well as with age polyethism in the colony, swarming (and the emergence of rebel workers), and the changing behavior of sick individuals. Many aspects and interactions between different types of resistance and immunity still remain unexplored. However, current research trends revolve around clarifying uncertainties so as to strengthen the natural resistance of bees and fight against pathogens that threaten the insects.

Keywords: *Apis mellifera*, individual resistance, social immunity

Pszczola miodna (*Apis mellifera* L.) jest nieprzerwanie narażona na atak patogenów, tj. wirusy, bakterie, grzyby czy roztocza, a także na działania antropogeniczne m.in. poprzez kontakt ze środkami stosowanymi w rolnictwie przemysłowym, w szczególności insektycydami (78, 93, 110). W celu przeciwdziałania szkodliwym wpływom drobnoustrojów organizm pszczoły wykształcił szereg reakcji obronnych, przywracających zaburzoną homeostazę i mających za zadanie walkę z zakażeniem. *A. mellifera*, jako owad społeczny, posiada także mechanizmy obronne aktywowane na poziomie rodziny. Tak więc u pszczoły miodnej wyróżnia się dwa rodzaje odporności: indywidualną oraz społeczną/rodzinną. Oba te mechanizmy odporności współpracują i regulują się wzajemnie (ryc. 1) (26, 56, 86).

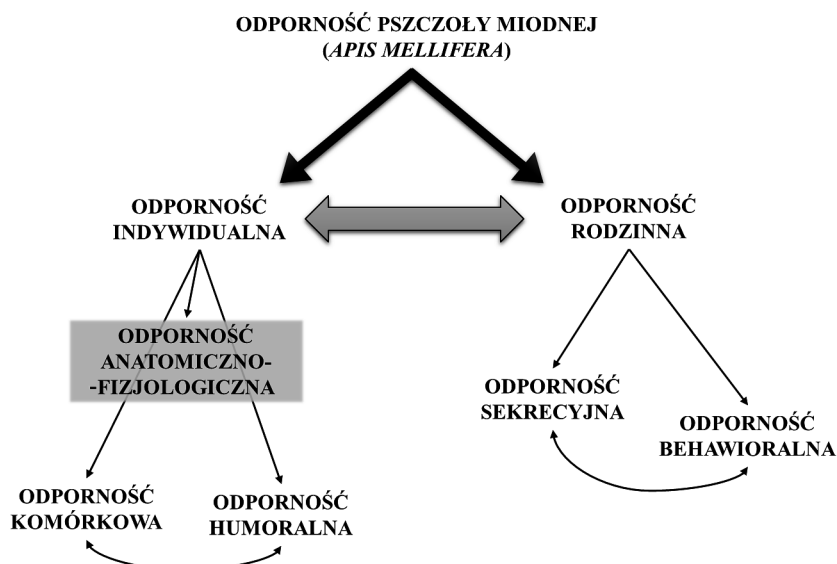
Odporność indywidualna

Na poziomie indywidualnym pszczoła miodna posiada trzy rodzaje mechanizmów odporności przeciwko

czynnikom chorobotwórczym: bariery anatomiczno-fizjologiczne ciała, a w przypadku przedostania się przez nie patogenów, kolejnymi liniami obrony są mechanizmy odporności komórkowej oraz humoralnej (60, 111). Podział odporności na komórkową i humoralną stanowi jednak kwestię dyskusyjną dla wielu badaczy, ponieważ te oba typy odporności immunologicznej wzajemnie się uzupełniają.

Pierwszą linię obrony wobec patogenów stanowią bariery fizyczne i chemiczne ciała utrudniające przyleganie bądź wnikanie do ciała mikroorganizmów chorobotwórczych (28). Twarda, impregnowana chityną oraz substancjami tłuszczowymi okrywa ciała zmniejsza ryzyko zranienia, a w konsekwencji także możliwość przedostania się drobnoustrojów do jamy ciała (40). Ponadto oskórek pszczoły pokrywa warstwa biologicznie czynnych białek, z których wiele przejawia aktywność proteaz oraz inhibitorów proteaz, także przeciwdziałając wnikaniu patogenów (3, 44, 92-94, 96, 97, 103). Układ tchawkowy, stworzony z sieci rozgałęzionych tchawek, połączonych ze środowiskiem zewnętrznym za pomocą przetchlinek, tak jak oskórek

¹⁾ Praca finansowana z projektu Narodowego Centrum Nauki: 2014/15/B/NZ9/00425 (ZKB/PB/138).



Ryc. 1. Podział typów odporności występującej u pszczoł miodnych i zachodzące między nimi interakcje

pokrytych warstwą chitynową, która wraz z wiekiem ulega sklerotyzacji, stwarza wydajną barierę przeciwzakaźną. Włoski, które otaczają przetchlinki I pary, przyczyniają się również do zahamowania wnikania szkodliwych drobnoustrojów (40). W identyczny sposób jak powłoka ciała, chitynowa wyściółka jelita przedniego i tylnego chroni pszczołę przed przenikaniem patogenów. W jelicie środkowym takie czynniki, jak pokarm, wartość pH treści pokarmowej czy enzymy trawienne tworzą środowisko biochemiczne, które skutecznie chroni przed infekcją bakteryjną. Kolejną barierę przeciwzakaźną przewodu pokarmowego mogą stanowić zasiedlające go okresowo drobnoustroje, hamujące rozwój patogenów poprzez wydzielanie enzymów, a także współzawodnicząc o zasoby pokarmowe. Błona perytroficzna, oddzielająca treść pokarmową od komórek nabłonka jelita środkowego również chroni pszczołę zarówno przed mechanicznym uszkodzeniem, jak i bezpośrednim kontaktem z mikroorganizmami chorobotwórczymi (39, 40).

Drugą linią obrony *A. mellifera* jest odporność komórkowa zależna od krążących w hemolimfie komórek „krwi” zw. hemocytami, stanowiących bezpośredni (uruchamiany natychmiast po wykryciu zakażenia) wrodzony system odpornościowy (89). Mechanizm działania komórek hemolimfy opiera się na czterech procesach: fagocytozie, nodulacji, inkapsulacji organizmów patogennych oraz gojeniu się ran (8, 24, 106). Kluczową rolę w uruchomieniu tych mechanizmów odporności pełni rozróżnienie substancji jako obcej (non-self) (39) – następuje to dzięki rozpoznaniu znajdujących się na powierzchni drobnoustrojów wzorców molekularnych (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) przez specjalne receptory (Pattern Recognition Receptors, PRRs) (11). Do hemocytów zalicza się różne typy komórek (np. prohemocyty, granulocyty, plazmatocyty, komórki krystaliczne, lamellocyty) pełniących odmienne, uzupełniające

się w odporności komórkowej funkcje. Prohemocyty są prekursorami innych typów komórek hemolimfy. Plazmatocyty stanowiące największą grupę komórek (90-95%) i odpowiadające za najstarszy mechanizm obronny – fagocytozę małych ciał obcych (o średnicy nie większej niż 0,5 μm) (39, 80), rozpoznając patogen, szybko ulegają przekształceniu z nieprzylegających komórek spoczynkowych do aktywowanych komórek przylegających. W ten sposób adhezują do drobnoustroju w pierwszej kolejności jako jedna warstwa lub ogniskowo (71). Po zapoczątkowaniu serii szlaków sygnałowych i zmianie dynamiki błony plazmatycznej oraz cytoszkieletu, błona plazmatocytów rozciąga wokół obcej cząstki pseudopodia, tworząc pęcherzyk przemieszczający się do wnętrza komórki

fagocytarnej, w ciągu kilku minut przekształcając się w fagosom (80, 114). Za indukcję przyczepności oraz rozprzestrzenianie się komórek plazmatycznych na powierzchniach obcych organizmów odpowiada peptyd PSP (Plazmatocyte-Spreading Peptide) (24). Efektem działania plazmatocytów jest obniżenie liczby drobnoustrojów oraz zahamowanie wzrostu organizmów patogennych w hemolimfie (39). Kiedy jednak liczba patogenów – w szczególności złożeń bakterii, skupisk zarodników grzybów m.in. *Nosema apis*, strzępków grzybni oraz jedno- lub wielokomórkowych pasożytów – jest zbyt duża i niemożliwa do sfagocytowania, a ich rozmiary sięgają 10 μm , następuje proces nodulacji – pokrywanie dużej ilości drobnoustrojów przez wielokomórkowe agregaty hemocytów i w konsekwencji tworzenie zmelanizowanych lub niezmelanizowanych guzków zależnych od biosyntezy eikozanoidów (8, 22, 39, 80). Innym typem hemocytów są komórki krystaliczne – delikatne, ale z łatwością zakłócające uwalnianie profenylooksydazy (proPO) będącej kluczowym czynnikiem w procesie melanizacji. Natomiast lamellocyty to duże, płaskie, przylegające komórki, rzadko obecne w zdrowej hemolimfie, za to pojawiające się podczas zakażenia, inkapsulujące obiekty, takie jak pierwotniaki (m.in. wiciowce *Leptomonas apis* oraz zarodniki *N. apis*) i nicienie lub ciała obce o wielkości powyżej 10 μm średnicy (62, 64, 105). W zależności od budowy otoczki okalającej patogen, w inkapsulacji, oprócz lamellocytów, uczestniczą inne hemocyty i wyróżnia się inkapsulację komórkową niemelanotyczną, w której udział biorą plazmatocyty i granulocyty, inkapsulację komórkową melanotyczną, w której obok hemocytów uczestniczą melaniny odkładane w ścianie otoczki oraz inkapsulację humoralną, podczas której wokół pasożyta tworzy się otoczka zbudowana z warstwy melaniny, nie zawierająca hemocytów (22, 55). Hemocyty przyłączając się do powierzchni patogenu, uruchamiają ścieżkę produkcji melaniny, blokują

dostęp drobnoustroju do jamy ciała pszczoły, a także wytwarzają pośrednie produkty cytotoksyczne (60). Skuteczność inkapsulacji w dużej mierze zależy od ilości drobnoustrojów atakujących organizm (39). Wewnątrz kapsuły patogen zostaje zabity poprzez asfiksję lub przez działanie reaktywnych produktów cytotoksycznych (70). Marringa i wsp. (67) zauważyli, że hemocyty zaczynają agregować przy kontakcie z zewnętrzną powierzchnią ciała pszczoły, co sugeruje, że jest to naturalny mechanizm, mający za zadanie ograniczenie ubytku hemolimfy podczas zranienia. Z czasem początkowy miękki skrzep jest utwardzany poprzez krzyżowanie sieciowe (cross-linking) białek oraz melanizację, która stanowi szybką odpowiedź odpornościową w miejscu zranienia lub na powierzchni patogenów. Krzepnięcie hemolimfy w miejscu urazu może służyć nie tylko uszczelnieniu rany, ale także uchwyceniu i unieruchomieniu patogenów w miejscu tworzenia się skrzepu (29, 36, 54, 107). Gojenie rany rozpoczyna się z chwilą wydzielenia czynników krzepnięcia, tj. hemolektyny (hemolectin) i Eig71Ee przez plazmocyty w procesie egzocytozy. Częsteczki te oraz inne czynniki osocza usieciowane przez enzym transglutaminazę (TG) w mechanizmie zależnym od jonów wapnia tworzą skrzep pierwotny (23, 63). Za pomocą tych odczynów obrony komórkowej możliwe jest utrzymanie homeostazy organizmu pszczoły oraz szybkie jej przywrócenie w przypadku zaburzenia. Niestety, poziom wszystkich typów hemocytów w hemolimfie najstarszych pszczół – zbieraczek jest silnie zredukowany w porównaniu z młodszymi robotnicami opiekującymi się czerwem.

Trzecią linią obrony indywidualnej jest aktywowana dopiero w 6-12 godz. po zakażeniu odporność humoralna, definiowana jako niekomórkowy, przeciwdrobnoustrojowy składnik hemolimfy (89, 112). Podzielić ją można na odporność humoralną wrodzoną i odporność humoralną indukowaną.

Mechanizmy odporności humoralnej wrodzonej opierają się na działaniu substancji przeciwbakteryjnych, tj. lizozym (N-acetylmuramylohydrolaza), układ profenylooksydazy, hemaglutyniny (lektyny), które są stale obecne w hemolimfie (39). Lizozym jest zasadowym białkiem, zbudowanym z pojedynczego łańcucha peptydowego, w którego skład wchodzi 129 reszt aminokwasowych. W genomie pszczoły miodnej występują trzy rodzaje lizozymu – dwa typu c oraz jeden typu i (26). Przy zakażeniach bakteryjnych poziom lizozymu szybko wzrasta, osiągając maksimum po 24-48 godz. od momentu pobudzenia mechanizmów odpornościowych pszczoły. Synteza lizozymu w ciele tłuszczowym jest indukowana poprzez kontakt z substancjami biotycznymi, które posiadają PAMP. Proces ten zachodzi za pośrednictwem szlaku sygnalizacyjnego Toll. Aktywność bakteriologiczna lizozymu obejmuje zakres 4,0-8,0 pH. Mechanizm działania tego enzymu polega na hydrolizie wiązania

β -1,4-glikozydowego znajdującego się między kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozaminą peptydoglikanu w ścianach komórek Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych bakterii (34, 38). Lizozym jest obecny w hemolimfie wszystkich stadiów rozwojowych pszczoły, a jego zawartość determinuje ochronne funkcje organizmu i jest zależna od wielu czynników, np.: wieku, zawartości białka w pokarmie, obecności drobnoustrojów oraz stanu środowiska (61). Profenylooksydaza (ProPO) będąca nieaktywną formą fenylooksydazy, znajduje się w hemolimfie oraz kutikuli, gdzie jest aktywowana (15, 65). Kaskada proteazy serynowej i inne czynniki regulują aktywację profenylooksydazy w celu uniknięcia nadprodukcji związków wysoko toksycznych i reaktywnych (16). Układ aktywujący profenylooksydazę (prophenoloxidase activating system, ProPO-AS) zostaje uruchomiony po wykryciu obecności nawet niewielkich ilości związków pochodzenia patogenego. Są to między innymi β -1,3-glukany, lipopolisacharydy i peptydoglikany. Obecność specyficznych inhibitorów proteaz zapobiega niepotrzebnej aktywacji profenylooksydazy (1, 16). Aktywowana fenylooksydaza katalizuje utlenianie prekursorów dopaminy do chinonów. Reaktywowane chinony wywierają toksyczne działanie na patogeny i bezpośrednio przyczyniają się do ich likwidacji (66). Fenylooksydaza katalizuje także polimeryzację chinonów do melaniny, biorącej udział zarówno w humoralnej, jak i komórkowej odpowiedzi immunologicznej (16). Schmid i wsp. (83) zaobserwowali, że poziom fenylooksydazy u robotnic rośnie wraz z wiekiem, osiągając stabilny poziom w ciągu pierwszego tygodnia życia formy imago i utrzymując stały, wysoki poziom do 24 dnia. Inny element wrodzonej odporności humoralnej – hemaglutyniny wraz z układem proPO uczestniczą w rozpoznaniu immunologicznym, a także biorą udział w rozpoznaniu oraz metamorfozie obcych komórek, aglutynują bakterie, ułatwiając tym samym fagocytozę zdeintegrowanych komórek (38, 39). Natomiast według najnowszych badań, głównym mechanizmem odpowiedzialnym za wrodzoną odpowiedź immunologiczną przeciwko wirusom u owadów jest interferencja RNA (RNAi) (11, 35).

Peptydy antydnobnoustrojowe są kluczowym składnikiem w odporności humoralnej indukowanej przeciwko wielu rodzajom patogenów. Podstawowym mechanizmem ich działania jest uszkodzenie błony komórkowej, a także inhibicja translacji lub splicingu białek bakteryjnych. Pszczoła miodna posiada cztery rodzaje peptydów antydnobnoustrojowych: apidycyny, abycyna, hymenoptecyna oraz defensyny. Białka te są uwalniane głównie z ciała tłuszczowego do hemolimfy w następstwie zakażenia drobnoustrojami, a ich ekspresja jest regulowana głównie przez dwa wewnętrzne szlaki sygnałowe Toll oraz Imd/JNK. Szlak Toll odpowiada głównie za obronę w przypadku infekcji bakteriami Gram-dodatnimi i grzybami, natomiast

szlak Imd jest związany z obroną przeciwko bakteriom Gram-ujemnym. Ponadto oba te szlaki oddziałują ze sobą podczas współregulowania defensyn (18, 20, 26, 27, 39). Peptydy antydnobnoustrojowe są obecne w hemolimfie już po kilku godzinach od momentu infekcji, uzyskując najwyższy poziom po 24-48 godz., a po ok. 96 godz. ich aktywność spada do poziomu początkowego (38).

Współdziałanie mechanizmów odporności związanych z barierami anatomiczno-fizjologicznymi ciała (1), a także odporności komórkowej (2) z humoralną (3) umożliwia przeżycie i rozwój pszczoły miodnej w środowisku pełnym patogenów (39).

Odporność społeczna/rodzinna

Owady społeczne wykształciły na drodze ewolucji – jako efekt współpracy poszczególnych członków grupy w celu wyeliminowania zwiększonego ryzyka przenoszenia się chorób – zbiorowe układy odpornościowe przeciwko drobnoustrojom. Mechanizmy, które minimalizują natężenie i przenikanie patogenów na poziomie rodziny, definiowane są jako odporność społeczna/rodzinna (19). Do tej zbiorowej ochrony przed patogenami zalicza się odporność sekrecyjną oraz odporność behawioralną (74, 79, 86).

Odporność sekrecyjna definiowana jest jako składnik odporności naturalnej, zdeterminowany obecnością w wydzielinach i produktach pszczelich związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (85). Mleczko pszczele odgrywa rolę istotnego czynnika sanitującego, poprzez redukcję populacji bakterii dostających się wraz z pokarmem do przewodu pokarmowego larw. Działa bakteriobójczo i bakteriostatycznie, dzięki obecności w jego składzie: kwasu 10-hydroksy-D-decenowego, nadtlenku wodoru (aktywnych w stosunku do bakterii Gram-ujemnych) oraz polipeptydów: rojalizyny (skierowanej przeciw bakteriom Gram-dodatnim), a także jelleiny (działającej zarówno na bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne oraz niektóre drożdże) (30, 33, 39). Kit pszczeli zw. propolisem, w skład którego wchodzi substancje żywiczne i balsamiczne oraz związki biologicznie czynne, pyłek, wosk, enzymy trawienne śliny robotnic oraz mechaniczne domieszki, jest wykorzystywany głównie do uszczelniania gniazda oraz polerowania komórek plastra (14, 39). Aktywność przeciwbakteryjna propolisu związana jest z występowaniem w jego składzie flawonoidów: ganalginy, chryzyny i pinocembryny, a także hydroksykwasów i flawononów oraz kwasów tłuszczowych i pochodnych fenolokwasów. Kwas kawowy, flawonony i flawony, wspólnie ze swoimi estrami, spowalniają rozwój bakterii pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, które zanieczyszczają pyłek i nektar oraz wodę przyniesioną przez pszczoły zbieraczki do ula (38, 43). Pszczoły oblepiają kitem wlot do ula, co stanowi także mechaniczną barierę przed wnikaniem patogenów do gniazda oraz potencjalnie

przeciwdziała ich rozwojowi wewnątrz (14, 45, 85, 87). Najnowsze badania udowadniają, że propolis ma również wpływ na ekspresję genów związanych z układem odpornościowym. Simone i wsp. (85) udowodnili, iż propolis doprowadza do znacznego obniżenia ekspresji dwóch genów związanych z immunologią pszczoły miodnej (hymenoptecyny i AmEater) oraz do znacznego obniżenia obciążenia bakteryjnego w rodzinie. Stwierdzono także, że zmniejsza on inwestycje energii w funkcje odpornościowe u 7-dniowych pszczoł, co może mieć wpływ na zdrowie i wydajność całej rodziny (85). Układ antybiotyczny miodu, pyłku i nektaru dzięki swoim właściwościom fizykochemicznym hamuje rozwój drobnoustrojów, w efekcie czego ich liczba w zapasach miodu i pyłku spada (13, 39, 45). Właściwości antybiotyczne miodu są zdeterminowane poprzez obecność substancji o charakterze przeciwdrobnoustrojowym typu auksyn i flawonoidów, które są pochodzenia roślinnego i dostają się do miodu wraz z pyłkiem. Dodatkowo w niektórych miodach działanie przeciwdrobnoustrojowe warunkuje również lizozym. Z kolei wysokie aktywności antybiotyczne miodu manuka wynikają z obecności metyloglioksalu, który jest produktem pośrednim w przemianie metabolicznej fosforanów trioz (trójwęglowych pochodnych glukozy i fruktozy), tj. fosforanu dihydroacetonu i 3-fosforanu aldehydu glicerynowego. Metyloglioksal występuje w nektarze *Leptospermum scoparium* (82). Wysokie ciśnienie osmotyczne wynikające z dużego stężenia sacharydów oraz kwaśny odczyn (pH 3,2-4,5) spowodowany obecnością kwasów: glukawanowego, jabłkowego, cytrynowego, bursztynowego, mrówkowego, masłowego, malonowego, mlekowego, octowego i propionowego w dojrzałym miodzie działa hamująco na rozwój mikroorganizmów (38, 51). W miodzie wytwarzany jest także nadtlenek wodoru podczas procesu utleniania glukozy do kwasu glukonowego, katalizowanego przez enzym gruczołów ślinowych pszczoł – oksydazę glukozową. Miód jest złożonym środowiskiem chemicznym, składającym się z wielu różnych związków, które mogą oddziaływać z nadtlenkiem wodoru, powodując zwiększenie lub zmniejszenie jego aktywności przeciwdrobnoustrojowej (9, 10). Również obecność w miodzie defensyny-1, która jest białkiem wydzielanym przez gruczoły gardzielowe pszczoł, zwiększa jego aktywność przeciwbakteryjną (58). Mikroflora niepatogenna obecna w rodzinie pszczelej także odgrywa ważną rolę w układzie antybiotycznym miodu, pyłku i nektaru, ponadto rywalizując o pokarm spowalnia rozwój mikroflory patogennej dla rodziny (27). Fitohormony również odgrywają ważną rolę w poprawie zdrowia pszczoł, można je wykryć w miodzie, nektarze i pszczołach na wszystkich etapach rozwoju. Kwas abscysynowy, fitohormon syntezowany w roślinach w celu regulacji ich funkcji fizjologicznych, wzmacnia odpowiedź immunologiczną (komórkową i humoralną) pszczoł, a także usprawnia

proces gojenia się ran poszczególnych osobników oraz całej rodziny. Obecnie nie ma jednak wystarczającej ilości badań dotyczących potencjału antybiotycznego wszystkich fitohormonów oraz ich wpływu na zdrowie i kondycję pszczoł (25, 74). Niewiele jest także badań, które odnosiłyby się do biologicznych właściwości wosku w zwalczaniu patogenów i pasożytów (25, 39, 49). Próby *in vitro* potwierdziły jego antibakteryjne działanie przeciwko mikroorganizmom patogennym oraz grzybobójcze właściwości przeciwko *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* i *Aspergillus niger* (53). Za antybiotyczne właściwości wosku odpowiadają głównie kwasy tłuszczowe (42). Zarówno pszczoły, jak i czerw mogą skorzystać z antybiotycznego potencjału wosku, wynikającego z obecności w jego składzie substancji przeniesionych z magazynowanego miodu, propolisu i pyłków/pierzgi (25). Również białka zawarte w jadzie pszczelim – mellityna i apamina – mają właściwości antibakteryjne (39). Pszczoły robotnice i matki w celu sanityzacji własnej i gniazda rozsmarowują jad po powierzchni ciała oraz plastrach wosku (6, 7). Pomimo swoich antybiotycznych właściwości jad i jego rola w odporności pszczoły miodnej także nie jest dostatecznie zbadana.

Zdeterminowana genetycznie odporność behawioralna ma na celu zapobieganie rozwojowi zakażeń oraz eliminowanie z rodziny czynników chorobotwórczych, w szczególności pasożytów. Objawia się ona między innymi poprzez behavior higieniczny, mechaniczne czyszczenie powłok ciała, a także szczególną dbałość o czerw (21, 37, 39, 75, 76, 108). Umiejętność usuwania roztoczy z powłok ciała zwana jest zachowaniem pielęgnacyjnym (grooming behaviour) pszczoł. Jest to przykład jednego z mechanizmów odpornościowych, dzięki któremu zarażone osobniki mogą oczyścić się z roztoczy same (auto-grooming) lub z pomocą innych pszczoł (allo-grooming) (50, 56). Zachowanie pielęgnacyjne polega również na tańcu oczyszczającym (grooming dance) i oczyszczaniu grupowym, a także na oczyszczaniu czerwia z roztoczy. Robotnice, które wykonują taniec oczyszczający, mają większe szanse na oczyszczenie przez inne pszczoły niż te, które nie wykonują tego tańca (59). Jednym z rodzajów odporności rodzinnej są zachowania termoregulacyjne, w szczególności generowana przez robotnice behawioralna „gorączka społeczna” (social fever), w której pszczoły tymczasowo podnoszą własną temperaturę ciała (behavioural fever) w celu podwyższenia temperatury gniazda. Swoim biobójczym działaniem termoregulacja obejmuje patogeny wrażliwe na ciepło, takie jak grzyb *Ascospaera apis* atakujący czerw pszczeli (86, 90). Rójka służąca naturalnemu podziałowi rodziny, jest również głównym mechanizmem obrony m.in. przeciw roztoczom *Varroa destructor*. Rójka przerywa łańcuch epidemiologiczny poprzez oddzielenie rojącej się rodziny od poprzedniego gniazda, w którym mogły występować patogeny niebezpieczne dla zdrowia

pszczoł. Jednocześnie w starym gnieździe następuje okres, w którym matka nie składa nowych jaj, przez co utrudnia rozwój drobnoustrojów (32, 39, 56). W tym czasie wykluwające się larwy, najprawdopodobniej za sprawą feromonów, wyczuwają brak matki i rozwijają się w bardziej egoistyczne osobniki – rebeliantki, które przebudowują swój organizm i pod względem wielu cech przypominają robotnice, a pod innymi matkę. Rebeliantki mają więcej rureczek jajnikowych, dzięki czemu mogą składać niezapłodnione jaja, z których wykluwają się wyłącznie trutnie. Ponadto, rebeliantki mają gorzej rozwinięte gruczoły produkujące pokarm dla matki i larw, przez co nie mogą wystarczająco mocno angażować się w wychowanie kolejnych pokoleń pszczoł (113). Innym typem rójki jest rojenie niereprodukcyjne (zapobiegawcze). Występuje, kiedy wszystkie dorosłe pszczoły wraz z matką roją się, pozostawiając w starym gnieździe tylko czerw oraz większość zapasów. Podczas tego procesu w gnieździe zostają pozostawione również wszystkie drobnoustroje żerujące na czerwiu, a także patogeny zawarte w zapasach pokarmu (56). Inną metodą na zmniejszenie transmisji chorób wewnątrz rodziny jest usunięcie zakażonych osobników lub unikanie z nimi kontaktu. Pszczoły potrafią wykryć i usunąć chore robotnice poprzez rozpoznanie profilu węglowodorów kutikularnych (5). Pszczoły atakują zainfekowane siostry poprzez gryzienie, żądlenie i ściganie, w konsekwencji zabijając potencjalne źródło infekcji (28, 69). Ponadto udowodniono, że zainfekowane robotnice odstupują od swoich funkcji społecznych i popełniają altruistyczne samobójstwo, usuwając się poza obręb rodziny (81). Podział pracy i sieć interakcji pomiędzy osobnikami w rodzinie zmniejszają transmisję chorób wewnątrz gniazda, ponieważ mikroorganizmy bywają patogenne w stosunku do zadaniowo wyspecjalizowanych osobników (28, 72). Pszczoły zbieraczki są bardziej narażone na zakażenie patogenami, przez co z czasem zmniejsza się ich interakcja z młodymi osobnikami (52, 81). Połączone efekty separacji matki od osobników bardziej narażonych na infekcje oraz kategoryzacja różnych zadań także stanowią czynnik ograniczający przenoszenie się choroby wewnątrz rodziny (86).

Aktualne kierunki badań

Mechanizmy odpornościowe pszczoł obejmują bariery profilaktyczne, zapobiegające zakażeniu lub w przypadku, gdy do niego już dojdzie, wyzwalają odpowiedź immunologiczną. Elementy odporności indywidualnej – obrona mechaniczna, fizjologiczna i immunologiczna stanowią naturalny schemat walki z infekcją. Uzupełnienie tych mechanizmów przez odporność społeczną, której celem jest zmniejszenie prawdopodobieństwa wystąpienia epidemii w rodzinie, stanowi bardzo silną barierę przeciwdrobnoustrojową. Pełne zrozumienie reakcji immunologicznych i interakcji pomiędzy poszczególnymi elementami układu

odpornościowego może dać naukowcom wskazówki do prawidłowego oraz skutecznego wzmacniania naturalnej bariery przeciwdrobnoustrojowej pszczół. Badania pozwalające w pełni zrozumieć istotę układu odpornościowego pszczół mogą być także niezwykle pomocną dla osób prowadzących gospodarstwo pasieczną, pozwolić na prowadzenie testów przesiewowych, ułatwiać utrzymywanie odpowiedniej siły w rodzinach oraz zabezpieczać je na okres zimowli (46, 109). Dopiero pełne rozszyfrowanie mechanizmów zachodzących w organizmie pszczoły oraz w całej pszczołej rodzinie pozwoli na optymalne zabezpieczenie i utrzymywanie zdrowych populacji owadów.

Naturalne linie obrony są niezwykle istotne zarówno dla pszczół utrzymywanych w pasiece, jak i w barciach. Oba typy populacji pszczół miodnych są zagrożone ze strony innych owadów zapylających – trzmieli i pszczół samotnic. Te dziko żyjące owady są rezerwuarem patogenów oraz w łatwy sposób mogą być źródłem inwazji drobnoustrojów w rodzinie pszczołej (41, 84, 88, 95). Poznanie dokładnych dróg transmisji mikroorganizmów, sposobów rozprzestrzeniania się epidemii wśród owadów oraz chorób niewyspecjalizowanych gatunkowo może przyczynić się do zmniejszenia inwazyjności patogenów (88). Istotne jest również poznanie biochemicznych mechanizmów działania drobnoustrojów, ich wpływu na poszczególne gatunki owadów zapylających oraz sposobów pojawiania się w populacji, jak i szlaków wędrówki kontynentalnej oraz międzykontynentalnej. Także badania nad formami przetrwalnikowymi i metodami walki z nimi mogą mieć kolosalny wpływ na zachowanie zdrowotności pszczół.

Wiele praktyk pszczelarskich jest opartych na stosowaniu leków i środków przeciwko patogenom – metody te mogą jednak prowadzić do skażenia produktów pszczelich, a nawet ula, a ponadto powodować uodpornienie się patogenów i ich większą zjadliwość (77, 91). Część substancji jest w związku z tym zakazana i nielegalna, zarówno w krajach UE, jak i poza nią, dlatego kluczowe wydaje się dążenie do podtrzymania naturalnej odporności pszczół poprzez testowanie i udowadnianie negatywnego wpływu niektórych substancji – w tym antybiotyków (np. amfoterycyna B (2)) – na organizm owadów, a także wykazywanie możliwości zastosowania alternatywnych środków wspomagających system odpornościowy pszczół miodnych, tj. akarycydów (104), kwasu szczawiowego (48), kwasu mrówkowego (101), probiotyków (57) lub suplementów diety, np.: HiveAlive™ (17), kofeina (98), kurkumina (99), koenzym Q10 (100). Ponadto wykazywanie wpływu diety, a także poszczególnych elementów środowiska zewnętrznego na organizm pszczoły miodnej, w tym na jej genom pozwoli zrozumieć i niewątpliwie wykazać znaczenie, jakie dla populacji owadów ma działalność ludzka oraz mody-

fikacje i zmiany zachodzące w środowisku (4, 12, 31, 47, 68, 102).

Dodatkowym kierunkiem badań wzbogacającym wiedzę na temat immunologii pszczół miodnych są analizy produktów pszczelich i wskazanie konkretnych substancji wpływających na odporność owadów. Takie dokładne dane mogłyby przyczynić się również do rozwoju apiterapii i mieć wpływ na wspieranie zdrowotności człowieka oraz zwierząt.

Dążenie do poznania przyczyn występowania różnych typów behawioru pszczół i ich znaczenia w utrzymywaniu dobrej kondycji rodziny pozwoliłoby pszczelarzom-praktykom na podtrzymywanie oraz pielęgnowanie tego typu zachowań w utrzymywanych przez nich populacjach. Natomiast dla naukowców te wyniki miałyby niewątpliwą wartość wyjaśniającą ewolucję zachowań społecznych pszczół oraz równoległą do niej ewolucję drobnoustrojów, a także pozwoliłyby na pełniejsze wyjaśnienie interakcji gospodarz–patogen.

Piśmiennictwo

1. *Ajamhassani M., Sendi J. J., Farsi M. J., Zibae A.*: Purification and characterization of phenoloxidase from the hemolymph of *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae). ISJ 2012, 9, 64-71.
2. *Bajda M., Łoś A., Merska M.*: Effect of amphotericin B on the biochemical markers in the haemolymph of honey bees. Med. Weter. 2014, 70, 766-769.
3. *Bajda M., Łoś A., Schulz M., Kasperek K.*: Mammalian and insect metalloproteases. Med. Weter. 2016, 72, 408-412.
4. *Bajda M., Strachecka A., Paleolog J.*: Reversion of senescence in honey bees (*Apis mellifera*)? Med. Weter. 2013, 69, 707-711.
5. *Baracchi D., Fadda A., Turillazzi S.*: Evidence for antiseptic behaviour towards sick adult bees in honey bee colonies. J. Insect Physiol. 2012, 58, 1589-1596.
6. *Baracchi D., Francese S., Turillazzi S.*: Beyond the antipredatory defence: Honey bee venom function as a component of social immunity. Toxicon. 2011, 58, 550-557.
7. *Baracchi D., Turillazzi S.*: Differences in venom and cuticular peptides in individuals of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS. J. Insect Physiol. 2010, 56, 366-375.
8. *Bedick J. C., Tunaz H., Nor Aliza A. R., Putnam S. M., Ellis M. D., Stanley D. W.*: Eicosanoids act in modulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers. Comp. Biochem. Phys. C 2001, 130, 107-117.
9. *Bizerra F. C., Da Silva P. I. Jr., Hayashi M. A. F.*: Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. Front. Microbiol. 2012, 3, 398.
10. *Brudzynski K., Abubaker K., St-Martin L., Castle A.*: Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. Front. Microbiol. 2011, 2, 213.
11. *Brutscher L. M., Daughenbaugh K. F., Flenniken M. L.*: Antiviral defense mechanisms in honey bees. Curr. Opin. Ins. Sci. 2015, 10, 71-82.
12. *Büchler R., Costa C., Hatjina F., Andonov S., Meixner M. D., Le Conte Y., Uzunov A., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Drazic M., Dyrba W., Kryger P., Panasiuk B., Pechhacker H., Petrov P., Kezić N., Korpela S., Wilde J.*: The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe. J. Apicult. Res. 2014, 53, 205-214.
13. *Burgett D. M.*: Antibiotic systems of honey, nectar and pollen, [w:] Morse R. A., Flottum K.: Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. Root Co/London 1997, 455-468.
14. *Çelemlı Ö. G., Hatjina F., Charistos L., Schiesser A., Özkurum A.*: More insight into the chemical composition of Greek propolis; differences and similarities with Turkish propolis. Z. Naturforsch. C 2013, 68, 429-438.
15. *Cerenius L., Lee B. L., Söderhäll K.*: The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends. Immunol. 2008, 29, 263-271.
16. *Cerenius L., Söderhäll K.*: The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol. Rev. 2004, 198, 116-126.

17. Charistos L., Parashos N., Hatjina F.: Long term effects of a food supplement HiveAlive™ on honey bee colony strength and *Nosema ceranae* spore counts. *J. Apicult. Res.* 2015, 54, 420-426.
18. Chobotow J., Strachecka A.: Morphology and function of insect fat bodies taking into account *Apis mellifera* L. honey bees. *Med. Weter.* 2013, 69, 712-715.
19. Cremer S., Armitage S. A. O., Schmid-Hempel P.: Social Immunity. *Curr. Biol.* 2007, 17, 693-702.
20. Danihlik J., Aronstein K., Petřivalský M.: Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *J. Apicult. Res.* 2015, 54, 123-136.
21. De Roode J. C., Lefevre T.: Behavioral Immunity in Insects. *Insects* 2012, 3, 789-820.
22. Dubovskiy I. M., Kryukova N. A., Glupov V. V., Ratcliffe N. A.: Encapsulation and nodulation in insects. *ISJ-Invert. Surviv. J.* 2016, 13, 229-246.
23. Dushay M. S.: Insect hemolymph clotting. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009, 66, 2643-2650.
24. Eleftherianos I., Xu M., Yadi H., Ffrench-Constant R. H., Reynolds S. E.: Plasmacyte-spreading peptide (PSP) plays a central role in insect cellular immune defenses against bacterial infection. *J. Exp. Biol.* 2009, 212, 1840-1848.
25. Erler S., Moritz R. F. A.: Pharmacophagy and pharmacophory: mechanisms of self-medication and disease prevention in the honeybee colony (*Apis mellifera*). *Apidologie* 2016, 47, 389-411.
26. Evans J. D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J. L., Jiang H., Kanost M., Thompson G. J., Zou Z., Hultmark D.: Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect. Mol. Biol.* 2006, 15, 645-656.
27. Evans J. D., Lopez D. L.: Bacterial Probiotics Induce an Immune Response in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 2004, 97, 752-756.
28. Evans J. D., Spivak M.: Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 2010, 103, 62-72.
29. Feldhaar H., Gross R.: Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes. Infect.* 2008, 10, 1082-1088.
30. Fontana R., Mendes M. A., De B. M., Konno K., Cesar L. M., Malaspina O., Palma M. S.: Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* 2004, 25, 919-924.
31. Francis R. M., Amiri E., Meixner M. D., Kryger P., Gajda A., Andonov S., Uzunov A., Topolska G., Charistos L., Costa C., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Dyrba W., Hatjina F., Ivanova E., Kezic N., Korpela S., Le Conte Y., Panasiuk B., Pechhacker H., Tsoktouridis G., Wilde J.: Effect of genotype and environment on parasite and pathogen levels in one apiary – a case study. *J. Apicult. Res.* 2014, 53, 230-232.
32. Fries I., Hansen H., Imdorf A., Rosenkranz P.: Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie* 2003, 389-397.
33. Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K.: A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 11333-11341.
34. Gajda E., Bugla-Płokońska G.: Lizozym – występowanie w przyrodzie, właściwości biologiczne i możliwości zastosowań. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2014, 68, 1501-1515.
35. Gammon D. B., Mello C. C.: RNA interference-mediated antiviral defense in insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015, 8, 111-120.
36. Gerula D., Bienkowska M.: Performance of artificially inseminated honeybee queens that have bodily injuries. *J. Apic. Sci.* 2008, 52, 13-20.
37. Gerula D., Węgrzynowicz P., Panasiuk B., Bienkowska M., Skowronek W.: Hygienic Behaviour of Honeybee Colonies with Different Levels of Polyandry and Genotypic Composition. *J. Apic. Sci.* 2015, 59, 107-113.
38. Gliński Z., Buczek K., Marc M.: Zjawiska i mechanizmy odporności przeciwzakaźnej pszczoły miodnej – nowe osiągnięcia. *Życie Wet.* 2011, 86, 687-694.
39. Gliński Z., Jarosz J.: Immunobiologia pszczoły miodnej. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Lublinie, 1995.
40. Gliński Z., Kostro K., Luft-Deptuła D.: Choroby pszczół. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa 2006.
41. Goulson D.: Impacts of non-native bumblebees in Western Europe and North America. *Appl. Entomol. Zool.* 2010, 45, 7-12.
42. Gołębiowski M., Cerkowniak M., Boguś M. I., Włóka E., Dawgul M., Kamysz W., Stepnowski P.: Free fatty acids in the cuticular and internal lipids of *Calliphora vomitoria* and their antimicrobial activity. *J. Insect. Physiol.* 2013, 59, 416-429.
43. Greenaway W., Scaysbrook T., Whatley F. R.: Composition of propolis in Oxfordshire, UK and its relation to poplar bud exudate. *Z. Naturforsch.* 1988, 43, 301-307.
44. Grzywnowicz K., Ciolek A., Tabor A., Jaszek M.: Profiles of the body-surface proteolytic system of honey bee queens, workers and drones: Ontogenetic and seasonal changes in proteases and their natural inhibitors. *Apidologie* 2009, 40, 4-19.
45. Hatjina F.: Hive-entrance fittings as a simple and cost-effective way to increase cross-pollination by honey bees. *Bee World* 1998, 79, 71-80.
46. Hatjina F., Bieńkowska M., Charistos L., Chlebo R., Costa C., Dražić M. M., Filipi J., Gregorc A., Ivanova E. N., Kezic N., Kopernicky J.: A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *J. Apicult. Res.* 2014, 53, 337-363.
47. Hatjina F., Costa C., Buchler R., Uzunov A., Dražić M., Filipi J., Charistos L., Ruottinen L., Andonov S., Meixner M. D.: More Population dynamics of European honey bee genotypes under different environmental conditions. *J. Apicult. Res.* 2014, 53, 233-247.
48. Hatjina F., Haristos L.: Indirect effects of oxalic acid administered by trickling method on honey bee brood. *J. Apicult. Res.* 2005, 44, 172-174.
49. Hepburn H. R., Pirk C. W. W., Duangphakdee O.: Honeybee Nests: Composition, Structure, Function. Springer, Heidelberg 2014, 319-320.
50. Invernizzi C., Zefferino I., Santos E., Sánchez L., Mendoza Y.: Multilevel assessment of grooming behavior against *Varroa destructor* in Italian and Africanized honey bees. *J. Apicult. Res.* 2016, 54, 1-7.
51. Israili Z. H.: Antimicrobial Properties of Honey. *Am. J. Ther.* 2014, 21, 304-323.
52. Johnson B. R.: Division of labor in honeybees: Form, function, and proximate mechanisms. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2010, 64, 305-316.
53. Kacániová M., Vuković N., Chlebo R., Haščík P., Rovná K., Cubon J., Džugan M., Pasternakiewicz A.: The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Arch. Biol. Sci.* 2012, 64, 927-934.
54. Kanost M. R., Jiang H., Yu X. Q.: Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.* 2004, 198, 97-105.
55. Kucharska K., Kucharski D., Zajdel B.: Bakterie *Xenorhabdus* i *Photobacterium* nicienie entomopatogeniczne i owady – funkcjonowanie w złożonym układzie symbiont – pasażer – żywiciel. *Post. Mikrobiol.* 2015, 54, 154-164.
56. Kurze A. Ch., Routtja J., Moritz R. F. A.: Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology* 2016, 119, 290-297.
57. Kuzysinova K., Mudronova D., Toporcak J., Molnar L., Javorsky P.: The use of probiotics, essential oils and fatty acids in the control of American foulbrood and other bee diseases. *J. Apicult. Res.* 2016, 55, 386-395.
58. Kwakman P. H. S., Te Velde A. A., De Boer L., Speijer D., Vandenbroucke-Grauls C. M. J. E., Zaaij S. A. J.: How honey kills bacteria. *FASEB J.* 2010, 24, 2576-2582.
59. Land B. B., Seeley T. D.: The Grooming Invitation Dance of the Honey Bee. *Ethology* 2004, 110, 1-10.
60. Loughton A. M., Boots M., Siva-Jothy M. T.: The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *J. Insect. Physiol.* 2011, 57, 1023-1032.
61. Lazarov S., Zhelyazkova I., Salkova D., Shumkova R., Takova S.: Lysozyme levels in haemolymph of worker bees (*Apis mellifera* L.) from bee colonies with different degree of expression of hygienic behaviour. *J. Agr. Sci. Tech.* 2016, 8, 201-204.
62. Lemaitre B., Hoffmann J.: The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 2007, 25, 697-743.
63. Lesch C., Goto A., Lindgren M., Bidla G., Dushay M. S., Theopold U.: A role for Hemolymph in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Comp. Immunol.* 2007, 31, 1255-1263.
64. Ling E., Yu X. Q.: Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immunectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 2006, 30, 289-299.
65. Lourenço A. P., Zufelato M. S., Bitondi M. M., Simões Z. L.: Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect. Biochem. Molec.* 2005, 35, 541-552.
66. Lu Z., Jiang H.: Regulation of phenoloxidase activity by high- and low-molecular-weight inhibitors from the larval hemolymph of *Manduca sexta*. *Insect. Biochem. Molec.* 2007, 37, 478-485.
67. Marringa W. J., Krueger M. J., Nancy L., Burritt N. L., Burritt J. B.: Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry. *PLoS ONE* 2004, 9.
68. Meixner M. D., Francis R. M., Gajda A., Kryger P., Andonov S., Uzunov A., Topolska G., Costa C., Amiri E., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Dyrba W., Gurgulova K., Hatjina F., Ivanova E., Janes M., Kezic N., Korpela S., Le Conte Y., Panasiuk B., Pechhacker H., Tsoktouridis G., Vaccari G., Wilde J.: Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used

- in a European genotype-environment interactions experiment. *J. Apicul. Res.* 2015, 53, 215-229.
69. Müller S., Garcia-Gonzalez E., Genersch E., Stüssmuth R. D.: Involvement of secondary metabolites in the pathogenesis of the American foulbrood of honey bees caused by *Paenibacillus* larvae. *Nat. Prod. Rep.* 2015, 32, 765-778.
 70. Nappi A., Poirié M., Carton Y.: The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Adv. Parasit.* 2009, 70, 99-121.
 71. Nardi J. B., Pilas B., Bee C. M., Zhuang S., Garsha K., Kanost M. R.: Neuroglian-positive plasmatocytes of *Manduca sexta* and the initiation of hemocyte attachment to foreign surfaces. *Dev. Comp. Immun.* 2006, 30, 447-462.
 72. Naug D., Camazine S.: The role of colony organization on pathogen transmission in social insects. *J. Theor. Biol.* 2002, 215, 427-439.
 73. Negri P., Maggi M. D., Ramirez L., De Feudis L., Szwariski N., Quintana S., Eguaras M. J., Lamattina L.: Abscisic acid enhances the immune response in *Apis mellifera* and contributes to the colony fitness. *Apidologie* 2015, 46, 542-557.
 74. Otti O., Tragust S., Feldhaar H.: Unifying external and internal immune defences. *Trends Ecol. Evol.* 2014, 29, 625-634.
 75. Panasiuk B., Skowronek W., Bienkowska M.: Influence of genotype and method of brood killing on brood removal rate in honey bee. *J. Api. Sci.* 2008, 52, 55-65.
 76. Panasiuk B., Skowronek W., Bienkowska M., Gerula D., Węgrzynowicz P.: Age of worker bees performing hygienic behaviour in a honeybee colony. *J. Api. Sci.* 2010, 54, 109-115.
 77. Ptaszynska A. A., Mullenko W.: Selected aspects of the structure, development, taxonomy and biology of microsporidian parasites belonging to the genus *Nosema*. *Med. Weter.* 2013, 69, 716-725.
 78. Raport techniczny Laboratorium Badawczego Greenpace 01/2013 [dostęp: 07.06.2017]
 79. Richard F. J., Aubert A., Grozinger C. M.: Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biol.* 2008, 6, 50.
 80. Rosales C.: Phagocytosis, a cellular immune response in insects. *ISJ-Invert. Surviv. J.* 2011, 8, 109-131.
 81. Rueppell O., Hayworth M. K., Ross N. P.: Altruistic self-removal of health-compromised honey bee workers from their hive. *J. Evol. Biol.* 2010, 23, 1538-1546.
 82. Rückriemen J., Klemm O., Henle T.: Manuka honey (*Leptospermum scoparium*) inhibits jack bean urease activity due to methylglyoxal and dihydroxyacetone. *Food Chem.* 2017, 230, 540-546.
 83. Schmid M. R., Brockmann A., Pirk C. W. W., Stanley D. W., Tautz J.: Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *J. Insect Physiol.* 2008, 54, 439-444.
 84. Schulz M., Ścibior R., Badurowicz K., Łoś A., Bajda M., Tyszczyk J., Skowronek P., Piotrowski B., Strachecka A.: Is Preparing a Nesting Box And Luring the Extremely Rare Large Solitary Carpenter Bee, *Xylocopa Valga*, a Feasible Option? *J. Api. Sci.* 2017, 61, doi: 10.1515/JAS-2017-0017.
 85. Simone M., Evans J. D., Spivak M.: Resin collection and social immunity in honey bees. *Evolution* 2009, 63, 3016-3022.
 86. Simone-Finstrom M.: Social Immunity and the Superorganism: Behavioral Defenses Protecting Honey Bee Colonies from Pathogens and Parasites. *Bee World* 2017, 94, 21-29.
 87. Simone-Finstrom M., Spivak M.: Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 2010, 41, 295-311.
 88. Singh R., Levitt A. L., Rajotte E. G., Holmes E. C., Ostiguy N., Vanengelsdorp D., Lipkin W. I., Depamphilis C. W., Toth A. L., Cox-Foster D. L.: RNA Viruses in Hymenopteran Pollinators: Evidence of Inter-Taxa Virus Transmission via Pollen and Potential Impact on Non-*Apis* Hymenopteran Species. *PLoS one* 2010, 5, e14357.
 89. Stanley D. W., Miller J. S.: Eicosanoid actions in insect cellular immune functions. *Entomol. Exp. Appl.* 2006, 119, 1-13.
 90. Starks P. T., Blackie C. A., Seeley T. D.: Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* 2000, 87, 229-231.
 91. Strachecka A., Borsuk G., Olszewski K., Paleolog J.: A new detection method for a newly revealed mechanism of pyrethroid resistance development in *Varroa destructor*. *Parasitol. Res.* 2015, 114, 3999-4004.
 92. Strachecka A., Borsuk G., Paleolog J., Olszewski K., Bajda M., Chobotow J.: Body-surface compounds in broodfast and caucasian honey bee workers (*Apis mellifera*). *J. Api. Sci.* 2014, 58, 5-15.
 93. Strachecka A., Borsuk G., Paleolog J., Olszewski K., Chobotow J.: Antipathogenic activity on the body surface of adult workers of *Apis mellifera*. *Med. Weter.* 2012, 68, 290-292.
 94. Strachecka A., Borsuk G., Paleolog J., Olszewski K., Chobotow J., Skoczylas D.: Body-surface metalloprotease activity in *Apis mellifera* L. workers relative to environmental pollution. *Med. Weter.* 2012, 68, 406-410.
 95. Strachecka A., Chobotow J., Paleolog J., Łoś A., Schulz M., Teper D., Kucharczyk H., Grzybek M.: Insights into the biochemical defence and methylation of the solitary bee *Osmia rufa* L: A foundation for examining eusociality development. *PLoS one* 2017, 12, e0176539.
 96. Strachecka A., Demetraki-Paleolog J.: System proteolityczny powierzchni ciała *Apis mellifera* w zachowaniu zdrowotności rodzin pszczoł. *Kosmos. Probl. Nauk Biol.* 2011, 60, 43-51.
 97. Strachecka A., Gryzińska M. M., Krauze M., Grzywnowicz K.: Profile of the body surface proteolytic system in *Apis mellifera* queens. *Czech. J. Anim. Sci.* 2011, 56, 15-22.
 98. Strachecka A., Krauze M., Olszewski K., Borsuk G., Paleolog J., Merska M., Chobotow J., Bajda M., Grzywnowicz K.: Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). *Biochemistry (Moscow)* 2014, 79, 1192-1201.
 99. Strachecka A., Olszewski K., Paleolog J.: Curcumin Stimulates Biochemical Mechanisms of *Apis mellifera* Resistance and Extends the Apian Life-Span. *J. Api. Sci.* 2015, 59, 129-141.
 100. Strachecka A., Olszewski K., Paleolog J., Borsuk G., Bajda M., Krauze M., Merska M., Chobotow J.: Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera*. *Arch. Insect Biochem.* 2014, 86, 165-179.
 101. Strachecka A. J., Paleolog J., Borsuk G., Olszewski K.: The influence of formic acid on the body surface proteolytic system at different developmental stages in *Apis mellifera* L. workers. *J. Apicul. Res.* 2012, 51, 252-262.
 102. Strachecka A., Paleolog J., Borsuk G., Olszewski K., Bajda M.: DNA methylation in the honey bee (*Apis mellifera*) and its importance for biological research. *Med. Weter.* 2012, 68, 391-396.
 103. Strachecka A., Paleolog J., Grzywnowicz K.: The surface proteolytic activity in *Apis mellifera*, *J. Api. Sci.* 2008, 52, 57-68.
 104. Strachecka A., Sawicki M., Borsuk G., Olszewski K., Paleolog J., Bajda M., Chobotow J.: Use of acaricides for fighting *Varroa destructor* mites in bee colonies: efficiency and risk. *Med. Weter.* 2013, 69, 219-222.
 105. Strand M. R.: The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 2008, 15, 1-14.
 106. Strand M. R., Beck M. H., Lavine M. D., Clark K. D.: Microplitis demolitor bracovirus inhibits phagocytosis by hemocytes from *Pseudoplasia includens*. *Arch. Insect Biochem.* 2006, 61, 134-145.
 107. Theopold U., Schmidt O., Söderhäll K., Dushay M. S.: Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends Immunol.* 2004, 25, 289-294.
 108. Uzunov A., Costa C., Panasiuk B., Meixner M., Kryger P., Hatjina F., Bouga M., Andonov S., Bienkowska M., Le Conte Y.: Swarming, defensive and hygienic behaviour in honey bee colonies of different genetic origin in a pan-European experiment. *J. Apicult. Res.* 2014, 53, 248-260.
 109. Węgrzynowicz P., Gerula D., Bienkowska M., Panasiuk B.: Causes and scale of winter flights in honey bee (*Apis mellifera carnica*) colonies. *J. Api. Sci.* 2014, 58, 135-143.
 110. Wilde J., Frączek R. J., Siuda M., Bąk B., Hatjina F., Myszczak A.: The influence of sublethal doses of imidacloprid on protein content and proteolytic activity in honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Apicul. Res.* 2016, 55, 212-220.
 111. Wilson-Rich N., Dres S. T., Starks P. T.: The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 2008, 54, 1392-1399.
 112. Wilson-Rich N., Spivak M., Fefferman N. H., Starks P. T.: Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 2009, 54, 405-423.
 113. Woyciechowski M., Kuszewska K.: Swarming generates rebel workers in honeybees. *Curr. Biol.* 2012, 22, 707-711.
 114. Yeung T., Ozdamar B., Paroutis P., Grinstein S.: Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006, 18, 429-437.