

**BADANIA HISTOCHEMICZNE JELITA ŚRODKOWEGO PSZCZOŁ  
ROBOTNIC ODŻYWIANYCH NAMIASTKAMI PYŁKU KWIATOWEGO**

Aleksandra Hartwig

Zakład Chorób Owadów Użytkowych SGGW w Warszawie

**WSTĘP**

Pyłek kwiatowy stanowi pokarm białkowy pszczół — konieczny dla właściwego rozwoju i wychowania czerwiu. Pszczelarze w czasach rzymskich, przy niedostatecznej ilości pyłku kwiatowego, podawali pszczołom wyciągi z fig i pomarańczy i świeże mleko owcze. W literaturze pszczelarskiej (Haydak 1943, Schönfeld 1954, Bysiek 1960, Gunderska 1963, Konopacka 1963) spotykamy informacje o różnym pożywieniu pszczół, jak mięso kurcząt i ryb, pasta z jajek i miodu, odtłuszczona mąka sojowa, wysuszone drożdże itp.

Wobec intensyfikacji produkcji pszczelej, szczególnie w pasiekach produkujących mleczko pszczele, uzupełnianie pokarmu białkowego w odżywianiu pszczół nabrało dużego znaczenia. Zagadnienie to jest tym bardziej aktualne, że baza pożytków naturalnych — nektaru i pyłku — zmniejsza się przez likwidację chwastów i nieużytków.

W przedstawionej pracy zajmowano się dwiema najczęściej stosowanymi namiastkami pyłku kwiatowego, drożdżami piekarskimi i mąką sojową. „Sojapyl” jest jedyną dostępną paszą białkową dla pszczół, specjalnie w tym celu produkowaną w Czechosłowacji. Drożdże piekarskie zyskały pozytywną ocenę niektórych hodowców (Teichert 1965) jako pożywienie dobrze uzupełniające niedobory pyłku kwiatowego.

W badaniach stosowano metodykę cytochemiczną, pozwalającą na obserwacje nie tylko morfologiczne, ale także fizjologiczne badanych struktur komórkowych. Z obserwacji cytochemicznych nad przewodem pokarmowym innych owadów wiadomo, że różnice w pożywieniu oraz głodzenie mogą spowodować zmiany cytofizjologiczne komórek nabłonka przewodu pokarmowego. Na przykład w komórkach nabłonka jelita środkowego gąsienicy *Galleria mellonella*, których naturalnym pokarmem jest woszczyzna — zmiana pożywienia na inny pokarm białkowy, jak również głodzenie, powodują znaczne różnice w aktywności fosfatazy alkalicznej (Przełęcka 1963).

Celem naszych badań było ustalenie, czy w przypadku podawania pszczołom namiastek pyłku kwiatowego pojawiają się w jelitach środkowych tych pszczoł jakieś zmiany w obrazie cytofizjologicznym komórek nabłonka. W związku z tym u pszczoł robotnic żywionych normalnie oraz żywionych namiastkami pyłku, badano występowanie niektórych związków, kwasów nukleinowych, fosfolipidów oraz enzymów z grupy hydrolaz. W tej ostatniej grupie poza 5-bromoindoksylerazą badano fosfotazę alkaliczną i fosfotazę kwaśną, o których wiadomo z badań Rocksteina i Horrona (1955), że wykazują w organizmie pszczoły wysoką aktywność.

## MATERIAŁ I METODA

Materiał do badań cytochemicznych stanowiły jelita środkowe pszczoł robotnic różnego wieku. Robotnice pobierano z 10 zdrowych rojów, przez strząsanie ich z plastrów. Pszczoły umieszczono w czterech wkładkach do ulików weselnych typu Zandera, w każdym około 100 sztuk, bez czerwiu i matki. Pożywienie tych pszczoł w każdym uliku było inne, a mianowicie:

1. drożdże piekarskie plazmolizowane cukrem pudrem (10 g drożdży + 100 g cukru);
2. drożdże piekarskie zabite przez gotowanie (1 g drożdży + 10 g cukru ogrzewano przez 10 minut na łaźni wodnej);
3. mieszanina mąki sojapyl z miodem (1 g mąki + 10 g miodu);
4. mieszanina miodu i pyłku (1 g pyłku + 10 g miodu).

Ulik przetrzymywano w temperaturze pokojowej przez okres 7 dni, w celu zaadoptowania pszczoł do nowego pożywienia. Okres krótszego przetrzymywania pszczoł jest niewskazany, gdyż pszczoły pobierane z plastrów mogą zabierać do wola miodowego zapas pożywienia wystarczający na 3 dni. A przetrzymywanie dłuższe niż 7 dni, z uwagi na długość życia pszczoł, także nie może być stosowane.

Każda seria (cztery uliki) była powtarzana pięciokrotnie, a do obserwacji cytochemicznych pobierano losowo około 20 osobników z serii.

Badano także w celach porównawczych jelita środkowe bardzo młodych pszczoł, prawie natychmiast po ich wygryzieniu się — bardzo jasno zabarwione, oraz zbieraczek powracających z obnóżami pyłku.

Doświadczenia przeprowadzono w okresie 15.VI.—10.VIII. 1966 r.

Pszczoły doświadczalne w poszczególnych ulikach zachowywały się podobnie, z wyjątkiem pszczoł odżywianych mąką sojapyl, u których występowała zawsze duża śmiertelność.

Wypreparowane jelita środkowe utrwalono w formol — calcium w temp. 4°C, utrwalaczu Carnoya, Lewitzkiego i Bouina.

W badaniach stosowano:

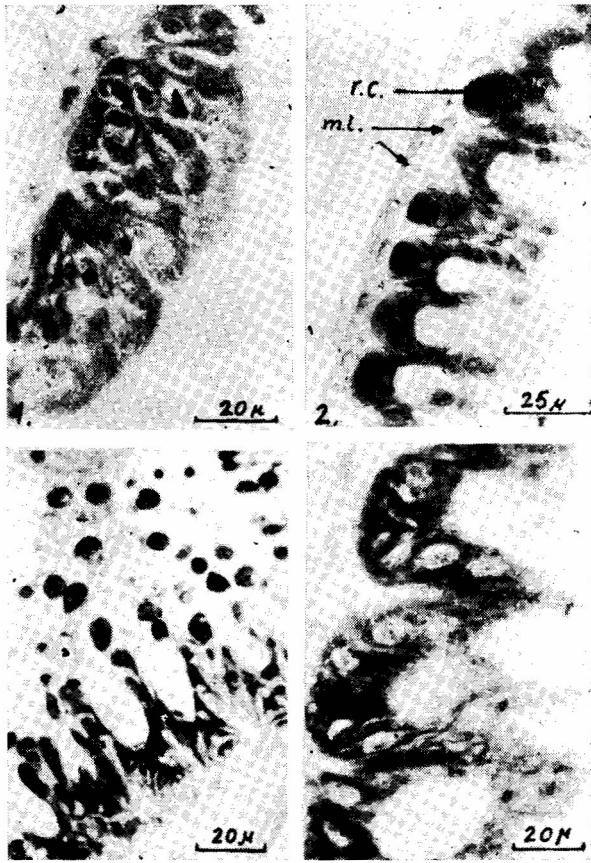
1. metodę **Bracheta** — polegającą na barwieniu mieszaniną zieleni metylowej z pyroniną i wytrawianiu równoległych preparatów rybonukleazą;
  2. metodę **Bakera** — barwienia fosfolipidów kwaśną hemateiną i przy reakcji kontrolnej przeprowadzonej po wyekstrahowaniu fosfolipidów pirydyną;
  3. dla wykrywania lokalizacji fosfatazy alkalicznej i fosfatazy **kwaśnej** stosowano metodę sprzęgania solami dwuazowymi wg **Mentena**, **Greena** i **Junga**. Metoda ta polega na ujawnianiu aktywności enzymów poprzez sprzęganie z solami dwuazowymi reszty alkoholowej substratu, powstałej na skutek hydrolizy substratu przez dany enzym;
  4. aktywność nieswoistej esterazy wykrywano metodą indygoogenną wg **Holt'a**; przy tej metodzie następuje utlenianie powstałego w miejscu reakcji bromoindoksyłu do nierozpuszczalnego indygo.
- Wymienione testy przeprowadzono według **Pearsa (1960)**, **Krygiera-Godlewskiego (1963)**.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Jelito środkowe (żołądek) pszczoły miodnej, podobnie jak jelito środkowe innych owadów jest pochodzenia endodermalnego i nie posiada wyściółki chitynowej, jaka występuje w pozostałych odcinkach przewodu pokarmowego. W jelicie środkowym odbywają się procesy trawienia i chłonięcia. Zbudowane jest ono z warstwy komórek nabłonka, z dwiema warstwami mięśni podłużnych i poprzecznych (ryc. 2). Komórki nabłonka wykazują dużą zmienność wyglądu, która jest prawdopodobnie spowodowana różnymi fazami trawienia i chłonięcia, w jakich się one aktualnie znajdują.

W warstwie komórek nabłonka ułożone są regularnie centra regeneracji, gdzie następuje stałe odnawianie zniszczonych komórek. Po obu stronach centrów regeneracyjnych układają się wydłużone i silnie przewężone komórki kształtu gruszkowego, będące w fazie holokrycznego wydalania (ryc. 3). W dalszym etapie tego procesu następuje oderwanie komórki w miejscu przewężenia. Oderwane fragmenty komórek kulistego kształtu wchodzi w skład błony perytroficznej. U pszczoł młodych centra regeneracyjne ułożone są gęsto, komórki nabłonka ułożone są zwarcie (ryc. 1). Natomiast u osobników starszych następuje jak gdyby rozciągnięcie warstwy nabłonka i bardziej wyraźne zarysowanie centrów regeneracyjnych i komórek holokrycznego wydalania.

Komórki nabłonka wykazują dużą pyroninofilność. W centrach regeneracyjnych stwierdzono intensywne zabarwienie cytoplazmy pyroniną. Występowanie RNA wiąże się ze zdolnością danej komórki do przepro-



Materiał utrwalony w płynie Carnoya; skrawki parafinowe; barwione zielenią metylową z pyroniną

Carnoy's fixation, paraffin sections, methyl greenpyronin

Ryc. 1. Bardzo młoda pszczoła; komórki nabłonka ułożone zwarcie

Ryc. 2. Pszczoła zbieraczka; komórki nabłonka bardziej pofałdowane niż u pszczoły młodej (ryc. 1)

Ryc. 3. Pszczoła żywiona „sojapylem”; niektóre komórki nabłonka w fazie holokrynicznego wydzielania

Ryc. 4. Pszczoła żywiona drożdżami plazmolizowanymi; brak różnic w pyrofilności pomiędzy komórkami nabłonka jelita środkowego pszczoły zbieraczki (rys. 2) a pszczoły żywionej sojapylem (ryc. 3) i pszczoły żywionej plazmolizowanymi drożdżami

Fig. 1. A very young bee. The epithelial cells closely compacted each to the other

Fig. 2. A foraging bee. The epithelium more folded, than that on fig 1

Fig. 3. A bee fed with the soja flour „sojapył”. Some of the epithelial cells in the phase of the holocrine secretion

Fig. 4. A bee fed with plasmolized yeast. No differences in the degree of pyroninophilia between the intestine epithelium of normally feeding foraging bee (fig. 2), bee fed with „sojapył” (fig. 3) and bee fed with plasmolized yeast is conspicuous

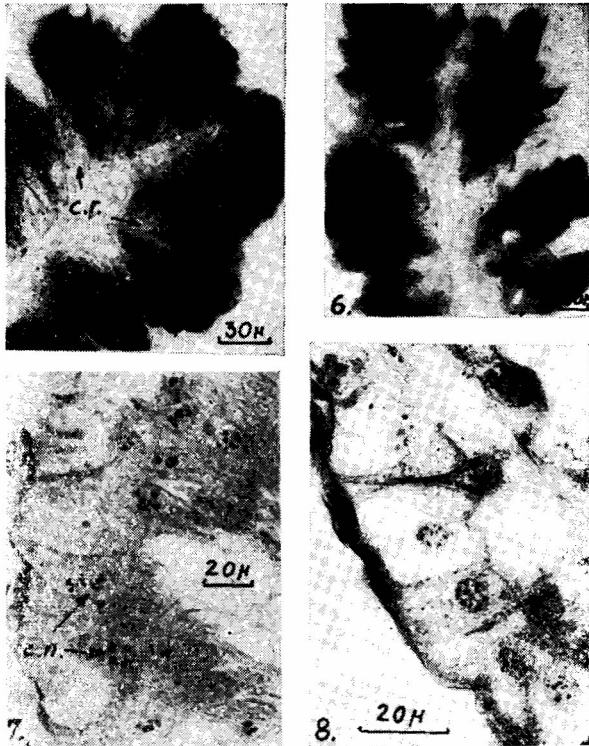
wadzenia syntezy białek. Przy szczególnie dużym nasileniu tych procesów komórki charakteryzują się bardzo silną pyroninofilnością, co świadczy, o obecności RNA (Brachet, 1957). W obserwacjach nad występowaniem kwasu rybonukleinowego w komórkach nabłonka jelita środkowego pszczoł robotnic nie stwierdzono zmian pod wpływem różnego pożywienia. Podawanie pokarmu zastępującego pyłek nie wpływa zatem na zdolność komórek nabłonka do produkcji białek. Potwierdzają to dalsze badania, w których śledzono aktywność niektórych enzymów z grupy hydrolaz: fosfatazy alkalicznej (ryc. 9 i 11), fosfatazy kwaśnej (ryc. 10 i 12), i 5-bromoindeksylesterazy (ryc. 5 i 6). W komórkach nabłonka pszczoł w poszczególnych grupach doświadczalnych nie zaobserwowano zasadniczych różnic w aktywności badanych enzymów. Należy jednak pamiętać, że zastosowanie ilościowych metod biochemicznych pozwoliłoby może na wykrycie pewnych różnic.

Bardzo intensywnie wypadła reakcja na 5-bromoindeksylesterazę w komórkach w stadium holokrynicznego wydzielania, natomiast bardzo słabe nagromadzenie tego enzymu stwierdzono w centrach regeneracyjnych (ryc. 5 i 6). Być może pozostaje to w związku z tym, że są to komórki funkcjonalnie niezróżnicowane, o charakterze embrionalnym.

Aktywność fosfatazy alkalicznej występuje w całej cytoplazmie komórki. W jelicie pszczoły, tylko w niektórych przypadkach, obserwuje się skupienia tego enzymu na rąbku brzeżnym, jak to obserwujemy u innych owadów, np. u *Galleria mellonella*, (Przełęczka A. 1963).

Fosfataza kwaśna wykazuje również intensywną aktywność. Gruboziarnisty strąd, równomiernie rozproszony w całej cytoplazmie, obserwowano we wszystkich komórkach nabłonka jelita środkowego (ryc. 10 i 12). Przy czym należy zaznaczyć, że fosfataza kwaśna, w odróżnieniu od fosfatazy alkalicznej i 5-bromoindeksylesterazy, wykazuje aktywność nie tylko w komórkach funkcjonalnie już zróżnicowanych, ale także w komórkach centrów regeneracyjnych.

Występowanie fosfolipidów (ryc. 7 i 8) w nabłonku jelita osobników doświadczalnych nie odbiegało zasadniczo od normy. Metodami cytochemicznymi udało się wykryć jedynie niewielkie ilości fosfolipidów w postaci ciemnogrnatowych skupień, rozrzuconych w nukleoplazmie.



Materiał utrwalany w Fo-Ca; skrawki mrożeniowe; lokalizacja niespecyficznej esterazy; octan 5-bromoindoksyli jako substrat; bardzo intensywna reakcja w komórkach nabłonka; brak pozytywnej reakcji w centrach regeneracyjnych.  
Cold Formol-Calcium fixation, frozen section. The localization of non-specific esterases, 5-Br-indoxyl-acetate used as substrate. A very intense reaction is visible in the epithelial cells, no positive reaction can be found in the regenerative cells.

Ryc. 5. Bardzo młoda pszczoła

Ryc. 6. Pszczoła żywiona sojapylem

Fig. 5. A very young bee

Fig. 6. A bee fed with soja flour „sojapyl”

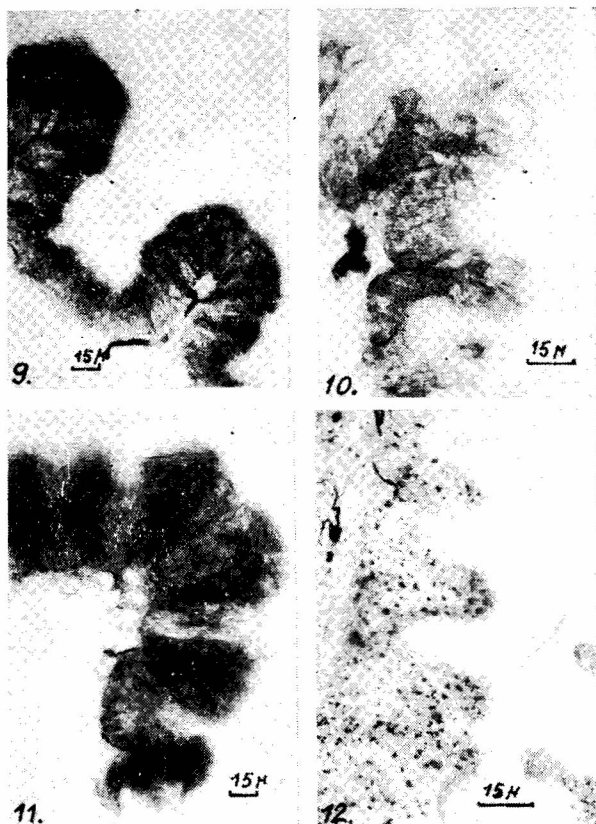
Materiał utrwalany w utrwalczu Lewickiego; wykonano reakcję z kwaśną hemateiną wg Bekera, pozytywna reakcja widoczna jedynie w jądrach komórkowych  
Levitzky fixation, paraffin section, Baker's acid haematein test. A positive reaction visible in cell nuclei only

Ryc. 7. Kontrolna pszczoła

Ryc. 8. Pszczoła żywiona drożdżami plazmolizowanymi

Fig. 7. A control bee

Fig. 8. A bee fed with plasmolized yeast



Skrawki mroźeniowe utrwalane w Fo-Ca; lokalizacja fosfatazy alkalicznej, badane metodą sprzęgania z solami dwuazowymi; jako substrat używano fosforanu sodu,  $\alpha$  naftyłu sodu oraz soli dwuazowej Fast. Blue RR

Cold Formol-Calcium fixation, frozen sections. The localization of the alkaline phosphatase, diazo-coupling method,  $\alpha$ -naphyl sodium, phosphate used as substrate, Fast Blue RR diazo salt as coupling agent.

Ryc. 9. Młoda pszczoła; pozytywna reakcja widoczna we wszystkich komórkach nabłonka

Ryc. 11. Pszczoła żywiona plazmolizowanymi drożdżami; wynik reakcji podobny jak na ryc. 9

Ryc. 10, 12. Materiał utrwalany w zimnym Fo-Ca; skrawki mroźeniowe; lokalizacja kwaśnej fosfatazy badana metodą sprzęgania z solami dwuazowymi jako substrat  $\alpha$  naftyłu fosforan sodu i sól Fast. Blue RC; gruby krystaliczny strąć widoczny w cytoplazmie wszystkich komórek nabłonka u pszczół żywionych drożdżami plazmolizowanymi (ryc. 10), jak i żywionych sojapylem

Fig. 9. A young bee. A positive reaction obtained in the all epithelial cells

Fig. 11. A bee fed with plasmolised yeast. The reaction is similar to that on fig 9.

Fig. 10, 12. Cold Formal-Calcium fixation, frozen sections.

The localization of the acid phosphatase, diazo coupling method,  $\alpha$ -naphthyl sodium phosphate used as substrate, Fast Red RC diazo salt. Coarse crystalline precipitation is obtained in the cytoplasm of all the epithelial cells as well in those of the bee fed with plasmolized yeast (fig.10) and of bec fed with soja flour „sojapyl”

| Skróty |                       |
|--------|-----------------------|
| m.l.   | — mięśniówka          |
| ep.c.  | — komórki nabłonka    |
| r.c.   | — centrum regeneracji |
| c.n.   | — jądro komórkowe     |

| Abbreviations |                      |
|---------------|----------------------|
| m.l.          | — muscular layer     |
| ep.c.         | — epithelial cells   |
| r.c.          | — regenerative cells |
| c.n.          | — cell nucleus       |

## WNIOSKI

Przeprowadzone badania cytochemiczne sugerują, że różnice w pożywieniu białkowym nie wpływają na zmiany występowania RNA, fosfolipidów i niektórych enzymów hydrolitycznych, jak fosfataza alkaliczna, fosfataza kwaśna i 5-bromoindoksylesteraza w komórkach nabłonka jelita środkowego pszczół robotnic.

Wobec tych wyników można przypuszczać, że podawane namiastki pożywienia białkowego nie powodują widocznych zakłóceń w aktywności fizjologicznej komórek nabłonka środkowego pszczół i mogą być przez nie w równym stopniu przyswajane. Zastrzeżenia budzi jedynie celowość podawania mąki sojowej „sojapyl”, po której obserwowano dużą śmiertelność pszczół doświadczalnych.

## LITERATURA

- Brachet J. (1957) — *Biochemical Cytology*. Academia Press Inc., New York
- Bysiek Z. (1960) — Podkarmienie pszczół ciastem drożdżowym. *Pszczelarstwo* 10, 320
- Guderska J. (1963) — *Hodowla Pszczół*. PWR, Warszawa
- Mykola Haydak (1943) — Pollen and Pollen Substitutes in the Nutrition of the honeybee. University of Minnesota Agricultural Experiment Station
- Konopacka Z. (1963) — Zastosowanie pyłku i jego namiastek w pasiece. *Pszczelarstwo*, 3, 68—72
- Krygier, Godlewski (1963) — *Metody Cytochemiczne*. Skrypt PTHC Warszawa
- Pearse A. G. (1960) — *Histochemistry theoretical and applied*. J. A. Churchill, London
- Przełęcka A. (1963) — Cytochemical Investigations on Lipid Assimilation by the Caterpillars *Galleria mellonella* L. *Folia Biol.* 11, 3
- Rockstein, Haron (1951) — Phosphatase in the adult worker honey bee. *J. Cell and Comp. Physiol.* 38, 3, 451—467
- Schönfeld A. (1955) — *Anatomie, morfologie a fysiologie včeli medonosne*. Praha
- Teichert F. (1965) — Podkarmianie ciastem drożdżowym i jego wyniki. *Pszczelarstwo* 5, 10



## ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СРЕДНЕЙ КИШКИ РАБОЧИХ ПЧЕЛ, КОРМЛЕННЫХ ЗАМЕНИТЕЛЯМИ ПЫЛЬЦЫ

Александра Гартвиг

В исследованиях использовано хлебопекарные дрожжи, соевую муку и пыльцу. Изучались изменения в цитофизиологическом эпителии клеток у рабочих пчел относительно нуклеиновой кислоты, фосфолипидов и энзимов из группы гидролаз. Разницы в белковом питании не вызывают перемен в указанном отношении и не нарушают питания рабочих пчел.

## HISTOCHEMICAL INVESTIGATIONS OF THE MIDGUT OF WORKER HONEY BEE WHICH WERE FED POLLEN SUBSTITUTES

Aleksandra Hartwig

In the experiments were used the following substances for feeding bees: beaker yeast, soja flour and pollen. The goal of the investigations was to look for the changes in the epithelial cells of digestive system in connection to nucleic acids, phospholipids and the enzymes from the group of hydrolaz. The differences in the protein food seems to have no influence on the activity of the investigated enzymes. Furthermore, the different kinds of protein food did not have bad effect on the nutrition of the workers of honeybee.