

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

Ратко П. Павловић

Испитивање утицаја одабраних замена за
полен и нектар у исхрани медоносне пчеле
(*Apis mellifera* L.) на профил дигестивних
ензима, варење, дужину живота и масу
радилица

докторска дисертација

Београд, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Ratko P. Pavlović

Examining the influence of selected substitutes
for pollen and nectar in the diet of honey bee
(*Apis mellifera* L.) on the profile of digestive
enzymes, digestion, life span and worker weight

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Ментор:

Др Зоран Вујчић, редовни професор, Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Чланови комисије:

Др Биљана Дојнов, научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за хемију, технологију и металургију, Институт од националног значаја за Републику Србију

Др Јелена Радосављевић, доцент, Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Др Љубиша Станисављевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет

Др Радивоје Продановић, редовни професор, Универзитет у Београду - Хемијски факултет

Датум одбране: дан, месец, година

Ова теза је израђена при лабораторији 483, уз велику помоћ дивних људи окупљених око професора Зорана Вујчића који ми је и сам много помагао.

Још се захваљујем члановима комисије, породици, пријатељима и свима који су на било који начин помогли израду овога рада.

Испитивање утицаја одабраних замена за полен и нектар у исхрани медоносне пчеле (*Apis mellifera* L.) на профил дигестивних ензима, варење, дужину живота и масу радилица

Сажетак

У овој дисертацији је испитана повезаност утицаја различите исхране медоносне пчеле (*Apis mellifera* L.), са производњом дигестивних ензима, здрављем, дужином живота и масом пчела радилица.

Утврђено је да различите замене за полен изазивају производњу различитих изоформи амилаза и протеаза у средњем цреву, а ензимска активност се мења у току времена. Различите замене за нектар утичу на различит начин на способност пчела да га прераде, при чему пчеле додају више амилазе у сахарозни него у инвертни сируп, а мед који прерадом ових сирупа произведу има различит шећерни састав.

Пчеле у кавезима где су услови слични као зими у кошници, дуже живе када се хране што гушћим сирупом, а храна садржи што мање несварљивих честица, које оптерећују црева и увећавају масу целе пчеле. Услед превеликог нагомилавања течности и нерастворних честица у цревима пчеле или угину или дефецирају унутар кавеза.

Нове предложене замене за полен, на бази јестивих инсеката су еколошки прихватљивије и одрживије. Пчеле храњене брашном од ларви великог брашнара (*Tenebrio molitor* L.) су одржавале упоредиву масу тела са пчелама храњеним другим хранама, имале су највећу масу абдомена (где се налази већина резервног масног ткива), нису дефецирале, нити имале повећану смртност као другачије храњене пчеле, а при томе су користиле најмању количину хране, што показује да је ова нова замена веома хранљива.

Употреба нових замена за полен може допринети и сузбијању пчелињих болести као што је вароза (узрочник: *Varroa destructor* Anderson & Trueman), а у будућности можда и кречног легла (узрочник: *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive et Spiltoir). Показано је да ларве и мумије кречног легла имају једноличнији минерални састав у односу на здраве пчелиње ларве. Нове замене имају разноврстан елементарни састав, поготову трутовско брашно.

Кључне речи: протеазе, амилазе, глукозидазе, *Apis mellifera*, *Tenebrio molitor*, *Varroa destructor*, *Ascosphaera apis*, средње црево, инвертни сируп, полен

Научна област: Хемија

Ужа научна област: Биохемија

Examining the influence of selected substitutes for pollen and nectar in the diet of honey bee (*Apis mellifera* L.) on the profile of digestive enzymes, digestion, life span and worker weight

Abstract

This dissertation examines the relationship between different diets of honey bees (*Apis mellifera* L.), and the production of digestive enzymes, bee health, life span and mass of worker bees.

Different pollen substitutes were found to induce the production of different amylase and protease isoforms in the midgut, and enzyme activity changed over time. Different nectar substitutes affect bees' ability to process it differently, with bees adding more amylase to sucrose syrup than to invert syrup, and the honey produced by processing these syrups has different sugar compositions.

Bees in cages, where the conditions are similar to those in the hive in winter, live longer when they are fed with dense syrup, and the food contains as few indigestible particles as possible, which inflate the gut and increase the mass of the whole bee. Following high accumulation of liquid and insoluble particles in the guts, the bees die or defecate inside the cage.

The newly proposed substitutes for pollen, based on edible insects, are more environmentally friendly and sustainable. Bees fed with flour from the yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) maintained a comparable body mass with the bees fed with other food, had the largest abdominal mass (location of main reserves of fat tissue), did not defecate, and did not show increased mortality as differently fed bees. Doing so they ate the least amount of food, which shows that this new substitute is highly nutritious.

Their use carries the possibility of serving not only as good substitutes for pollen, but also in the fight against bee diseases (caused by: *Varroa destructor* Anderson & Trueman), and maybe in the future also chalkbrood (caused by: *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive et Spiltoir). It has been shown that the larvae and mummies of chalkbrood have a more uniform mineral composition compared to healthy bee larvae. New substitutes have a diverse elemental composition, especially drone flour.

Key words: proteases, amylases, glucosidases, *Apis mellifera*, *Tenebrio molitor*, *Varroa destructor*, *Ascosphaera apis*, midgut, invert syrup, pollen

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Садржај

1. УВОД	1
2. ОПШТИ ДЕО	2
2.1 Исхрана медоносних пчела	3
2.1.1 Промене унутар пчелиње заједнице услед различите исхране	3
2.1.2 Летње и зимске пчеле	4
2.1.3 Трофилакса	5
2.1.4 Нектар и мед	5
2.1.5 Полен и перга	7
2.2 Повезаност здравља пчела и пчелиње хране	8
2.2.1 Болест кречног легла	9
2.2.2 Вароза	10
2.3 Особености биологије медоносне пчеле	11
2.3.1 Дигестивни систем и дигестивни ензими	11
2.3.1.1 Морфологија дигестивног система медоносне пчеле	11
2.3.1.2 Микробиота у цреву медоносне пчеле	13
2.3.2 Дигестивни ензими	14
2.3.2.1 Варење протеина	15
2.3.2.1.1 Пептидазе	15
2.3.2.2 Варење угљених хидрата	16
2.3.2.2.1 Дигестија скроба (амилаза)	16
2.3.2.2.2 Дигестија сахарозе (α -глукозидаза)	16
2.4 Замена и допуне у пчелињој исхрани	18
2.4.1. Замена за полен	18
2.4.1.1 Ентомофагија (исхрана инсектима)	19
2.4.1.2 Канибализам у пчелињој заједници	19
2.4.2 Замена за нектар	20
2.5 Испитивање својстава хране у лабораторијским условима	21
2.5.1 Поређење ензимских профила код различито храњених пчела	21
2.5.2 Поређење концентрације минерала	21
3. НАШИ РАДОВИ	23
3.1 Нове замене за полен	23
3.1.1 Нова замена за полен – брашно од ларви великог брашнара	23
3.1.2 Нова замена за полен - брашно од трутовског легла	24
3.1.2.1 Узгајање трутовског легла и припрема трутовског брашна	24
3.2 Гајење пчела, узимање и припрема узорак	25
3.2.1 Гајење пчела ради поређења замена за полен	25
3.2.2 Гајење пчела ради поређења замена за нектар	26
3.2.3 Узимање узорак ларви и мумија кречног легла	27
3.2.4 Узимање и припрема узорак за карактеризацију α -глукозидазе	27
3.2.5 Припрема сировог екстракта средњег црева и глава пчела радилица	28
3.2.6 Гел хроматографија	29
3.3 Утицај одабраних замена на морталитет, потрошњу хране и масу радилица	29
3.3.1 Утицај замена за полен на морталитет и потрошњу хране	29
3.3.2 Утицај замена за полен на промену масе пчела	32
3.3.3 Утицај замена за полен на промену масе црева	35
3.3.4 Утицај замена за нектар на потрошњу сирупа, морталитет и масу пчела	37

3.4. Утицај састава шећерног сирупа на његову прераду	39
3.4.1 Утицај врсте шећера у замени за нектар на прераду сирупа	39
3.4.2 Утицај замена за нектар на уклањање воде из сирупа	40
3.5 Утицај одабраних замена за полен и нектар на профил дигестивних ензима	41
3.5.1 Утицај замена за полен на профил дигестивних ензима	42
3.5.1.1 Упоредна анализа амилаза пчела храњених различитим погачама	42
3.5.1.1.1 Зимограмска детекција амилазне активности	43
3.5.1.2 Упоредна анализа протеаза пчела храњених различитим погачама	44
3.5.1.2.1 Зимограмска детекција протеазне активности	45
3.5.1.3 Анализа укупних протеина средњег црева пчела храњених заменама за полен	46
3.5.2 Утицај замена за нектар на профил дигестивних ензима	48
3.5.2.1 Утицај замена на гликозидазну активност у средњем цреву и глави	48
3.5.2.2 Зимограмска детекција ензима у сирупу прикупљеном из саћа	50
3.6 Карактеризација α-глукозидазе	51
3.6.1 Супстратна специфичност α -глукозидазе	51
3.6.2 Одређивање изоелектричне тачке (pI) α -глукозидазе	52
3.7 Елементарни састав пчелињег легла и пчелиње хране	53
3.7.1 Елементарни састав ларви и мумија	53
3.7.2 Поређење елементарног састава брашна од инсеката и полена	57
3.8 Закључци	60
4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	61
4.1 Нове замене за полен	61
4.1.1 Гајење ларви великог брашнара и производња брашна	61
4.1.2 Узгој трутовског легла и припрема брашна	62
4.2 Гајење пчела, узимање и припрема узорака	62
4.2.1 Гајење медоносне пчеле у лабораторијским условима	62
4.2.2 Исхрана радилица у кавезима	62
4.2.3 Сакупљање ларви и мумија кречног легла	63
4.2.4 Сакупљање излетница на лету кошнице	63
4.2.5 Дисекција и припрема сировог екстракта средњег црева пчела радилица	63
4.2.6 Гел хроматографија и ултрафилтрација	63
4.3 Утицај одабраних замена на морталитет, потрошњу хране и масу радилица	64
4.3.1 Мерење масе пчела и потрошње хране	64
4.4. Утицај састава шећерног сирупа на његову прераду	64
4.4.1 Одређивање густине сирупа и праћење кристализације у саћу	64
4.4.2 Квантификација сахара у сирупу HPLC методом	64
4.4.2.1 Припрема стандарда	65
4.4.2.2 HPLC анализа	65
4.5 Утицај одабраних замена за полен и нектар на профил дигестивних ензима	65
4.5.1 Одређивање ензимских активности	65
4.5.1.1 Одређивање амилазне и инвертазне активности	65
4.5.1.2 Одређивање протеолитичке активности	67
4.5.2 Одређивање концентрације протеина по Брадфорду	68
4.5.3 Електрофорезе	69
4.5.3.1 Нативна полиакриламидна гел електрофореза	69
4.5.3.2 Натријум-додецилсулфат полиакриламидна гел електрофореза	72
4.5.3.3 Изоелектрично фокусирање	73
4.5.4 Зимограмска детекција	74

4.5.4.1 Зимограмска детекција α -амилазе	74
4.5.4.2 Симултана зимограмска детекција α -амилазе и глуко-амилазе	76
4.5.4.3 Зимограмска детекција протеаза	77
4.5.4.4 Зимограмска детекција α -глукозидазе и β -фруктофуранозидазе	78
4.6 Карактеризација α-глукозидазе	78
4.6.1 Ензимски есеј са рафинозом и танкослојна хроматографија	78
4.6.2 Одређивање рI α -глукозидазе помоћу ИЕФ	79
4.7 Елементарни састав пчелињег легла и пчелиње хране	80
4.7.1 Потребни раствори и стандарди	80
4.7.2 Припрема узорака	80
4.7.3 Одређивање концентрације елемената	80
5. ЛИТЕРАТУРА	82

Листа скраћеница

АА - акрил-амид

АПС - амонијум-персулфат

СВВ - боја комаси брилијантно плава (енг. „*Coomassie brilliant blue*")

ДНС - динитросалицилни реагенс

НPLC - течна хроматографија под високим притиском (енг. „*high-performace liquid chromatography*")

P - вредност вероватноће (енг. „*probability value*")

SDS - натријум-додецилсулфат (енг. „*sodium dodecil sulphate*")

ТЕМЕД - N,N,N',N'-тетраметил-етилендиамин

ТРИС - трис (хидроксиметил) аминометан

НБТ – нитроплаво-тетразолијум-хлорид (енг. „*nitroblue tetrazolium chloride*")

ТНБС - тринитро бензен сулфонска киселина

ИЕФ - изоелектрично фокусирање

ИМ - инвертни мед (мед који су пчеле направиле у кавезима од инвертног сирупа)

ИС - инвертни сируп

КП - шећерне погаче са квасцем

МЦ - укупна маса средњег и задњег црева пчеле радилице

МП - укупна маса пчеле радилице

ПП - шећерне погаче са поленом

СД - стандардна девијација

СМ - сахарозни мед (мед који су пчеле направиле у кавезима од сахарозног сирупа)

СС - сахарозни сируп

ТП - шећерне погаче са брашном од великог брашнара

ХФЖ - Хипофарингеална жлезда

ШП - шећерне погаче

1. Увод

Опрашивање гајених биљака инсектима је есенцијално за светску пољопривреду и производњу хране (1), међу њима пчеле су најважније, од којих је медоносна пчела (*Apis mellifera* L.) кључни полинатор (2). Процењује се да је опрашивање неопходно за производњу 1/3 укупне хране на свету, па је медоносна пчела због тога најзначајнији узгајани инсект за пољопривреду (3). Пчелари често наводе лошу исхрану као водећи узрок смртности пчелињих заједница (4), што указује да је одговарајућа исхрана пчела од суштинског значаја, јер омогућава развој здравих пчелињих заједница.

Познато је да су исхрана, дужина живота, маса појединачних радилица и здравље пчелиње заједнице међусобно условљени и тесно повезани. Међутим, ове везе нису потпуно јасне, па су потребна даља истраживања да би се унапредила исхрана пчела, па тако и здравље пчелињих заједница. Посебно је важно утврдити како је повезан састав хране са појединим пчелињим болестима.

Анализа и поређење профила дигестивних ензима у цревном тракту пчела као и у меду који оне производе, када су храњене различитом храном, може помоћи у одабиру што бољих замена за полен и нектар у исхрани током њиховог узгајања. Праћење процеса варења мерењем масе средњег и задњег црева, као и промене у активности дигестивних ензима у току времена такође могу допринети одабиру хране. У овом тренутку идеална замена за полен не постоји, па је потребан рационалнији приступ заснован на екологији и физиологији пчела (5).

Развој такве замене за полен је значајан за пчеларство. То је због тога што су, иако за пољопривреду изузетно важне, пчелиње заједнице изложене великом притиску од саме пољопривреде. Оне су широм света хронично слабо исхрањене, што је последица великих површина под монокултурама. Природна пчелиња паша, шуме и ливаде, уништавају се да би се ослободио простор за интензивно сточарство и за узгајање монокултура као што су кукуруз и соја. Поред тога, стално је присутна и прекомерна употреба пестицида, али и неодговарајућа пчеларска пракса (6, 7). Ради економске исплативости, пчелари држе десетине и стотине кошница на једном месту, што појачава конкуренцију и умањује приносе нектара и полена (8). Услед тога, места која су одговарајућа за мањи број пчелињих заједница постају места где пчеле гладују. Таква пренасељеност доприноси још и лакшем ширењу пчелињих болести и паразита. Због тога, пчеле услед слабије и једноличне исхране постају мање отпорне на болести и пестициде (9).

У овом истраживању су тражена решења која ће нас приближити производњи релативно јефтине и квалитетне замене за протеине и липиде из полена. Због тога је по први пут у свету направљена замена на бази јестивих инсеката. Такође, истраживано је да ли је за замену угљених хидрата из нектара бољи сахарозни или инвертни сируп, као и да ли у ове замене треба додавати и неке минерале.

У овој докторској тези истраживано је и како се у лабораторији може скратити пут за проналажење најбоље замене за природну исхрану пчела.

2. Општи део

Медоносна пчела (*Apis mellifera* L.) је само једна од преко 20.000 врста пчела. Првобитно је била распрострањена у Африци, Азији и Европи, али је човек раширио по целом свету (10). Као и остале пчеле она је сродна осама. Ове две групе инсеката (пчеле и осе) користе нектар као извор угљених хидрата. Међутим, данашње пчеле су током еволуције са карниворног начина исхране, карактеристичног за претке пчела и осе, прешле на исхрану поленом, који им је, осим за угљене хидрате, главни извор свих осталих нутријената неопходних за раст и развој. Тако су у својој животној историји пчеле постале специјализоване за исхрану поленом и нектаром, док су се биљке прилагодиле опрашивању од стране пчела (11).

Таксономска класификација медоносне пчеле:

Домен	Domain	Eukaryota
Царство	Regnum	Animalia
Тип	Phylum	Arthropoda
Класа	Classis	Insecta
Ред	Ordo	Hymenoptera
Надфамилија	Superfamilia	Apoidea
Клада	Clade	Anhophila
Фамилија	Familia	Apidae
Подфамилија	Subfamilia	Apinae
Трибус	Tribus	Apini
Род	Genus	<i>Apis</i>
Врста	Species	<i>Apis mellifera</i>

У овом истраживању је коришћена подврста (subspecies) *Apis mellifera carnica* Pollman. Медоносна пчела је предмет истраживања још од античког доба (12). Мед и восак су људи користили још од праисторије. Сада користе и друге пчелиње производе, пре свега полен, матични млеч, прополис и пчелињи отров. Медоносна пчела се од већине других пчела разликује по томе што живи у великим заједницама. Остале врсте пчела воде углавном усамљенички начин живота, изузев још неколико социјалних група врста, као што су бумбари (*Bombus* spp.) и безжаочне пчеле (*Meliponidae*). У односу на друге социјалне пчеле и друге врсте из рода *Apis*, она је најпогоднија за гајење.

При прегледу добро развијене пчелиње заједнице могу се пронаћи три групе јединки (13):

1. Обично једна матица, која је једина репродуктивно способна женска јединка у пчелињој заједници.
2. Неколико стотина мужјака, тзв. трутова.
3. Преко 20 хиљада пчела радилица, које су неплодне женке и које обављају све послове унутар пчелиње заједнице.

Поред ових одраслих (адултних) јединки у пчелињој заједници је присутно и легло које је сачињено од јаја, ларви и лутака. Анатомија и физиологија ларви, лутака и адулата се значајно разликује (13).

Радилице су морфолошки и физиолошки специјализоване за различите задатке, а њихова прилагођеност тим задацима је последица сложених међусобних интеракција и односа са околином. Међу њима постоји привремена подела рада, заснована на различитим физиолошким и молекуларним путевима (14, 15). Током активне сезоне, у

било ком тренутку различите групе радилица одгајају легло, изграђују саће, бране кошницу, одржавају потребну температуру, сакупљају и прерађују нектар и полен (16).

2.1 Исхрана медоносних пчела

Исхрана пчела је много проучавана, али је при формулацији замена и допуна у пчелињој исхрани то често рађено у поређењу са потребама других гајених животиња или човека, што је доводило до тога да прихрана не задовољава ни очекивања пчелара, а ни потребе пчела. Нпр. пчелари још увек често додају витамин Ц у пчелињу храну, иако је полен добар извор витамина Ц, а пчеле за разлику од људи имају способност да га производе, па га није потребно додавати (17).

Други погрешан принцип је тај што су допуне биране на основу тога колико их радо пчеле узимају, али не мора да значи да је она храна коју пчеле радо узимају добра за њих. Пчеле показују различит степен привлачности или одбојности према сирупу у коме се налазе ксенобиотици (нпр. различити пестициди, па чак и инсектициди), без обзира на то да ли су они природни или синтетички, и њихов одговор је различит за различите концентрације (18).

Из овога се види да се при проучавању пчелиње исхране не може ослонити само на поређење са другим животињама и на понашање пчела него да је потребно детаљније испитати како појединачни састојци хране утичу на биохемију и физиологију појединачних пчела и пчелиње заједнице.

2.1.1 Промене унутар пчелиње заједнице услед различите исхране

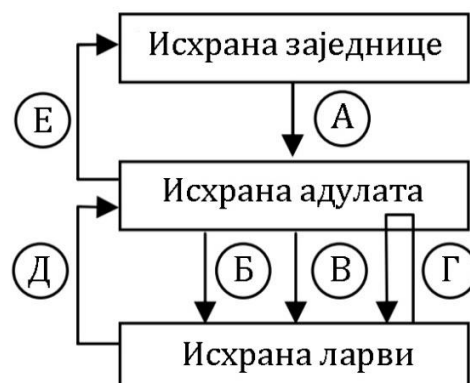
Слаба исхрана је водећи узрок угинућа пчелињих заједница (4), а квалитетна и обилна исхрана је неопходна за развој појединачних пчела и комплетних пчелињих заједница (19). Пчеле, као и већина других организама, за нормалан раст и развој захтевају протеине, угљене хидрате, масти, воду, витамине и минерале (20). Да би задовољиле те потребе медоносне пчеле у природи сакупљају нектар, полен и воду. Њих сакупљају пчеле излетнице у количини која зависи од потреба колоније, расположивости у околини и временских услова, а што је под утицајем све интензивније пољопривреде и различитих промена у животној средини (21). Недостатак било које од ових супстанци потенцијално води ка смањењу бројности пчела у пчелињој заједници, скраћивању живота пчела радилица и смањеној отпорности на болести (22).

Слабо исхрањене пчелиње заједнице додатно слабе због болести и присуства пестицида, па тако слабе нису способне да довољно искористе пчелињу пашу када је доступна (9). Добро храњене пчеле боље подносе болести и пестициде, а када је доступна пчелиња паша боље је користе. Из овога се види значај замена за полен и нектар, тако да је прихрањивање пчела једини начин да комерцијално гајене пчелиње заједнице остану здраве и бројне, а често и да уопште преживе. Због тога добра исхрана може бити главно средство у борби против пчелињих болести (23). Иако је познато да су слаба исхрана и нарушено здравље пчелињих заједница повезани, до сада није успостављена директна веза између састава хране и пчелињих болести.

Ограничена доступност есенцијалних нутријената води престанку одгајања легла, а затим и угинућу пчелиње заједнице уколико се они претходно не обезбеде тој заједници (24). Исхрана легла је посебно погођена у заједницама којима недостаје полен, а то води одгајивању радилица које краће живе и имају мању масу (25), што на крају води слабљењу заједнице што може бити још израженије уколико је присутан још неки негативан чинилац, а њих је стално све више. Нпр. занимљиво је да је повећање концентрације атмосферског CO₂, услед климатских промена, довело до значајног смањења концентрације протеина у полену (26).

Само довољна количина добро ухрањених радилица је способна да успешно одгаји нове генерације, као и да се одупире негативним чиниоцима као што су паразити, инфекције, пестициди и периоди оскудице хране (24).

Слика 1. Шематски приказ три нивоа пчелиње исхране, њихова међузависност и могуће последице недостатка полена. А: зависност адулата од резерви хране унутар пчелиње заједнице; Б: улагање у квалитет ларви; В: одређивање бројности ларви; Г: канибализам легла; Д: утицај исхране ларви на следећу генерацију адулата; Е: Утицај адулата на исхрану пчелиње заједнице. Преузето, па прилагођено од Brodschneider & Crailsheim, 2010, (24).



Нектар који пчеле сакупљају из цветова (и евентуално медљика пореклом од биљних ваши) задовољава њихове потребе за угљеним хидратима као и део потребне воде. Из полена добијају протеине, масти, витамине и минерале (20). Пчеле неговатељице (енг. „nurses“) од полена и нектара производе матичну млеч, која аналогно млеку код сисара, снабдева ларве нутријентима потребним за раст и развој (5).

Пчеле могу да одгајају легло и када се хране искључиво угљеним хидратима (нпр. сахарозом), али само релативно кратко време (једну до две недеље). Тада оне за производњу хране за ларве користе резерве нутријената из свог организма и то највише из абдомена, што зависи од количине резерви нутријената у њиховом телу (27). Исхрана ларви, радилица, матице, трутова и целе пчелиње заједнице су међусобно условљени и повезани (Слика 1), па се недостаци у исхрани било ког члана одражавају на све остале. Развој ларве у радилицу или матицу је последица квалитативне промене у саставу протеина, који се налазе у млечу, којима се хране ларве (28). Састав хране којом се пчеле хране епигенетски утиче на то да ли ће се ларва развити у матицу или радилицу (29).

Маса тела радилица и количина азота у њему, а и засебних делова тела, се мења у току живота, као што се мењају и задаци које оне обављају. Нпр. глава је најтежа када је најактивнија подждрелна (хипофарингеална, енгл. „hypopharyngeal gland“) жлезда, а радилице обављају дужност неговатељица и хране легло, док грудни део има највећу масу када пчеле обављају излетничке послове, па им је потребна јака мускулатура за летење (30).

Утврђено је да су аминокиселине које су есенцијалне за раст и развој младих пчела: аргинин, хистидин, лизин, фенилаланин, триптофан, леуцин, изолеуцин, треонин и валин. Неесенцијалне аминокиселине су глицин, аланин, серин, цистеин, тирозин, хидроксипролин, глутаминска и аспарагинска киселина. Поред тога изгледа да је метионин есенцијалан, а пролин није (31).

У хипофарингеалној жлезди (ХФЖ) пчела излетница, за разлику од ХФЖ неговатељица, се експримирају бар три гена за метаболизам угљених хидрата и то за α-глукозидазу, амилазу и глукоза-оксидазу (32).

2.1.2 Летње и зимске пчеле

Поред физиолошких разлика које зависе од старости пчела и потреба заједнице, постоји и разлика која зависи од годишњег доба. Зимом, у пролеће и лето се одгајају „летње“ краткоживеће пчеле. „Зимске пчеле“ се одгајају у касно лето и рану јесен,

периоду када у природи има мање доступног полена, али су присутне велике залихе перге (ферментисани полен; пчелињи хлеб; енг. „*bee bread*“). „Зимске пчеле“ настају од ларви које су боље храњене и због тога што се у то време одгаја много мањи број ларви у поређењу на период мај-јули (33). Што се већи број пчела брине о мањој количини легла, то је маса одгојених пчела већа, а животни век тих пчела дужи (34). Код „летњих“ пчела величина ХФЖ и количина инвертазе у њој се рапидно мењају како пчела стари, док код „зимских“ пчела ХФЖ остаје велика и богата α -глукозидазом (35).

Код пчеле која се тек извела, исхрана поленом доводи до развоја ХФЖ и масних тела као и до повећања очекиване дужине живота. Исхрана поленом који је пореклом од разних врста биљака даје различите ефекте на развој пчела. У принципу физиолошко стање „летње“ и „зимске“ пчеле не зависи од годишњег доба, него од реакције пчелиње заједнице на услове који на њу делују. Дужина пчелињег живота је у великој мери одређена количином поједеног полена и начином одгајања легла, а не као што се раније сматрало прекомерним радом пчела излетница (36).

2.1.3 Трофилакса

Ради разумевања исхране пчела потребно је навести још једну особеност дигестивног система пчела - трофилаксу, која је присутна и код других социјалних инсеката. Трофилакса је размена хране међу одраслим пчелама путем усног апарата. За најмлађе и најстарије радилице, трутове и матицу трофилакса је једини начин да дођу до протеина. То је због тога што ове јединке имају ограничену способност варења полена (имају много мање протеаза), па га једу само у малим количинама или га уопште не једу. Систем трофилактичког кружења хране и специјализована група пчела неговатељица, које једу много полена од кога производе лако сварљиву млеч, омогућавају пчелињој заједници да има велики број чланова са смањеном способношћу варења протеина. Поред тога она и обавештава чланове пчелиње заједнице о квалитету и количини хране присутне у кошници (37). Пчеле користе трофилаксу и при преради и складиштењу хране (16).

Из претходно наведеног проистиче и то да грађа и функција дигестивног система није иста код свих пчела радилица чак и када би оне биле генетски идентичне и исте старости. Она се мења у времену како код појединачних пчела тако и код целе пчелиње заједнице. Из овога се види да би било веома корисно да се развију нови поступци који би омогућили да се пчелиња исхрана брже и боље истражи у лабораторијским условима, где сви ови променљиви чиниоци не би отежавали тумачење добијених резултата.

Сви претходно наведени чиниоци узрокују и различите промене у дигестивном систему пчела, као што су промене у испољавању дигестивних ензима које су настале као последица различите исхране пчела. Нпр. претходно је показано да се повећава активност β -галактозидазе у средњем цреву када се пчеле прихрањују лактозом. Међутим изгледа да такво храњење смањује лучење других дигестивних ензима (38). Да би што више смањили утицај свих горе наведених варијабли, испитивање утицаја хране на дигестивне ензиме би требало да се одвија у кавезним експериментима користећи пчеле исте или приближно исте старости (0-24h).

2.1.4 Нектар и мед

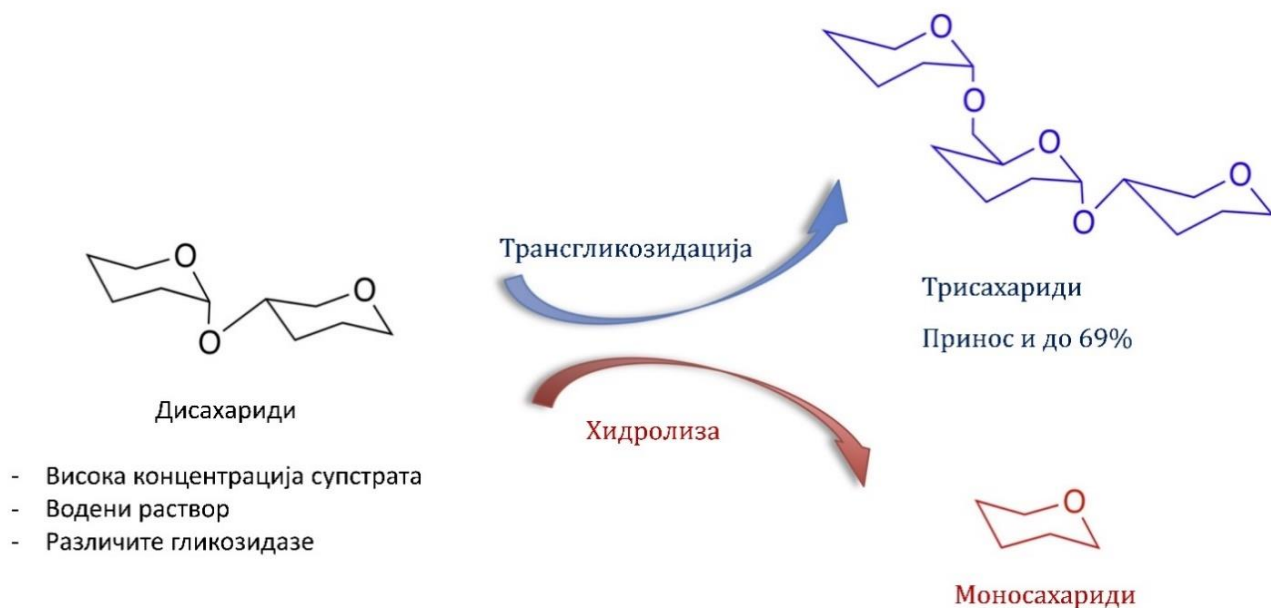
Нектар је слатка течност коју производе цветови биљака како би привукли опрашиваче. Састоји се од воде у којој се налази променљива концентрација глукозе, фруктозе и сахарозе у различитим односима и мале количине полена (39), па његова нутритивна вредност потиче од ова три шећера (40). Остали шећери се налазе у нектару у веома малим количинама у односу на ова три доминантна шећера (40). То могу бити

моносахариди (маноза, арабиноза, ксилоза), дисахариди (малтоза, мелибиоза) или још ређе олигосахариди (рафиноза, мелезитоза, стахиоза). Сви они воде порекло од сахарозе допремљене кроз флоем или су од ње произведени у нектаријама (41). Коначни састав нектара је одређен дејством биљне инвертазе која у нектаријама хидролизује сахарозу до глукозе и фруктозе (42), па концентрација и однос ових шећера варира међу различитим биљним врстама (43).

Пчелама као извор угљених хидрата служи и медна роса у којој се налазе и шећери попут мелезитозе и малтозе. Медна роса је слатка течност коју лучше биљне ваши приликом исхране. Састав медне росе зависи од биљака којима се биљне ваши хране (39).

Медоносне пчеле прерађују нектар у мед активним испаравањем воде на језику, пасивним испаравањем, што укључује проветравање кошнице и лепезање крилима као и деловањем ензима (44). Излетнице, док сакупљају нектар и при повратку у кошницу, уклањају део сувишне воде, па тако олакшавају процес прераде нектара у мед (45). Елиминација вишка воде из нектара је енергетски веома захтевна (44). Главни шећери у меду су фруктоза (32–44%) и глукоза (23–38%) (46).

Ензим α -глукозидаза хидролизује сахарозу из нектара на фруктозу и глукозу, али има и трансглукозидазну активност, па су главни дисахариди у меду α -глукозил деривати ових моносахарида (малтулоза, нигероза, тураноза, малтоза, којибиоза, трехалулоза и изомалтоза). Сходно томе, трисахариди у меду су вероватно α -глукозил деривати главних дисахарида, при чему су деривати сахарозе главна компонента (47). Окарактерисано је укупно 25 трисахарида, а њихово порекло је у највећој мери приписано трансглукозидазној активности ензима у меду (47).



Слика 2. Висока концентрација супстрата фаворизује настанак трисахарида у првој фази хидролизе дисахарида. Преузето па прерађено од Mangas-Sánchez & Adlercreutz., 2015 (48).

У првој фази хидролизе дисахарида висока концентрација супстрата фаворизује настанак трисахарида, а касније долази до секундарне хидролизе при чему се трисахариди разграђују на дисахариде и моносахариде, а наравно све време се дисахариди разлажу на моносахариде (Слика 2) (48).

Неензимска трансглюкозидациона реакција такође доприноси настанку и разноврсности олигосахарида у меду (малтоза, изомалтоза, инулобиоза, софороза, гентиобиоза, 1-кестоза и паноза), Слика 2 (49).

2.1.5 Полен и перга

Полен (цветни прах) се састоји од мушких репродуктивних ћелија заштићених зидом од целулозе и спорополенина. Пчеле при сакупљању мешају полен са нектаром или медом, а затим га доносе у кошницу и складиште у ћелије саћа, то се назива пчелињи полен. Када пчеле пакују полен у ћелије оне га обогаћују медом и секретом пљувачних жлезда који садржи ензиме и органске киселине. Затим преко чврсто спакованог полена додају слој меда, а ћелије поклапају воштаним поклопчићима, што је приказано на Слици 3. У тако насталим анаеробним условима долази до ферментације коју узрокују углавном бактерије из рода *Lactobacillus* и тако настаје перга (50)

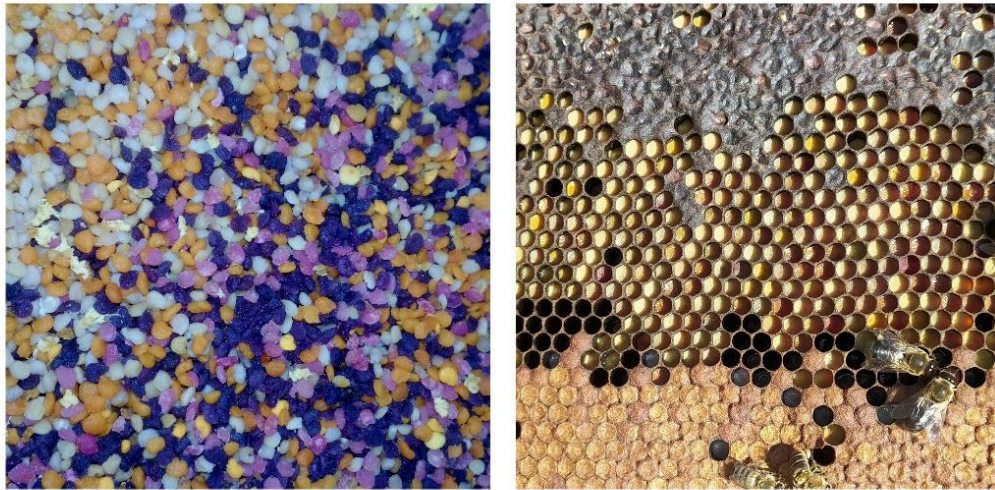
Хемијски састав полена варира у зависности од ботаничког и географског порекла, климатских услова, годишњих доба, начина сакупљања и складиштења. У њему је пронађено преко 250 супстанци са високом биолошком активношћу. Највише има угљених хидрата (24-60%), протеина (7-40%) и липида (1-18%). Садржај целулозе (3,7%), нуклеинских киселина (0,6-4,8%), млечне киселине (0,56%), флавоноида (0,2-2,5%) и витамина (0,02-0,7%) је такође променљив. Просечна количина пепела је између 1,5-3,2%. У свежем полену садржај воде је од 21-30%. Због дејства ензима у перги има више пептида и слободних аминокиселина, а мање протеина и скроба. Услед ферментације у перги се повећава концентрација млечне киселине до шест пута у односу на полен и спречава њено кварење (50).

Перга се сматра главном резервом протеина и липида у кошници, међутим веома значајна резерва свих неопходних супстанци изузев угљених хидрата налази се и у масним телима пчела које хране ларве (15).

У истраживањима Херберта и Шиманукија, 1978 није примећена никаква разлика у броју успешно одгајених ларви до поклапања легла, када су пчеле храњене поленом или пергом. Поред тога, количина влаге, протеина и липида у полену и перги са веома мало разликовала. Примећено је да је скроб присутан само у свежем полену, док га у перги нема, али се зато у перги налази више редукујућих шећера (51).

У ранијим радовима, нпр. код Лопера и Бердела (52) је изнета претпоставка да због дејства микроорганизама перга има већу нутритивну вредност од полена, па да је пчеле због тога радије конзумирају. Изгледа да су то биле погрешне претпоставке, јер је касније утврђено да пчеле радије конзумирају свеж полен, а да пергу производе само да би полен конзервирале за периоде када га нема у природи (53, 54) и да складиштење полена пчелама не олакшава његово варење (55).

У случају несташице полена количина легла нагло опада, па поново расте када пчеле унесу нове количине полена (56). Показано је да већа количина поједеног полена не значи да тај полен нутритивно више одговара пчелама, већ да га пчеле вероватно више конзумирају због веће количине фагостимуланаса (супстанци које подстичу храњење) или других нутритивних компоненти. Нпр. пчеле су конзумирале мање полена са бадема него полена са тополе, али су при томе успешно одгајиле више легла (52). Храна коју пчеле једу мање него неку другу може да има бољи утицај на здравље пчела, што показује да та храна има већу хранљиву вредност (57). У сваком случају, доступност полена високе нутритивне вредности и разноврсног порекла је веома важна за здравље и развој пчела (58).



Слика 3. Полен – цветни прах (лево), ћелије саћа са ускладиштеним поленом који пчеле прекривају слојем меда и поклапају воштаним поклопчићима, при чему услед дејства микроорганизама и пчелињих ензима настаје перга (десно).

Најбољи начин да полен очува своју хранљиву вредност је да се осуши и замрзне, или само замрзне. Полен који се не чува у замрзивачу брзо губи хранљиву вредност за пчеле, без обзира на то што се претходно осуши (59).

2.2 Повезаност здравља пчела и пчелиње хране

Најважнији полинатори, медоносне пчеле, су угрожене због мање доступности и разноврсности полена и нектара услед промена узрокованих пренаменом земљишта. Неухрањеност може директно допринети обољевању пчела, или индиректно утицати на њихову имунокомпетентност (9, 60, 61). Медоносне пчеле конзумирају макро- и микронутријенте из нектара, полена и воде како би на одговарајући начин задовољиле своје потребе у исхрани (24), а исхрана разноликим (полифлоралним) поленом може бити кључни чинилац за здравље пчела (21, 58, 62, 63). Међутим, утицај микронутријената на здравље пчела још увек није у потпуности истражен (64).

Минерали и друге хранљиве супстанце су од виталног значаја за репродукцију и развој одраслих пчела и ларви. Познато је да су неки елементи неопходни за пчеле (Na, K, Ca, Mg, P), док други могу бити токсични (Al, Pb, Cd, Ba) (65, 66). За алуминијум који може да замени друге метале, посебно магнезијум, у протеинима и изазове конформациона оштећења, није доказана хранљивост. Олово може утицати на активност ензима и антиоксиданаса, изазива оксидативни стрес и највише утиче на нервни систем пчела (67). Кадмијум може имати каталитичку улогу у производњи насцентног кисеоника, па тако и повећању оксидативног стреса. Може ометати механизме поправке DNA, што завршава смрћу ћелије (68). Баријум има негативан утицај на акумулацију K^+ јона унутар ћелија, што изазива деполаризацију мембрана (67).

Пчелиње заједнице се могу прихранити додатним есенцијалним минералима. Међутим, потребе пчелиње заједнице су још увек углавном неистражене (24, 69). Ларве медоносне пчеле су у одређеној мери заштићене од промена у снабдевању храном пчелиње заједнице (70), а утицај исхране ларви на подложност пчела болестима није проучаван (71).

2.2.1 Болест кречног легла

Кречно легло је болест пчелињег легла коју изазива гљива *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive et Spiltoir (Ascomycota: Eurotiomycetes: Onygenales). Болест је распрострањена широм света и постоје докази да се инциденција болести повећава (72–75). У почетку развоја болести мртве ларве прекрива бела пахуљаста буђ, а ларве набрекну до хексагоналног облика ћелије. Касније се скупљају у мумије и могу постати сиве или црне уколико се образују споре (76).

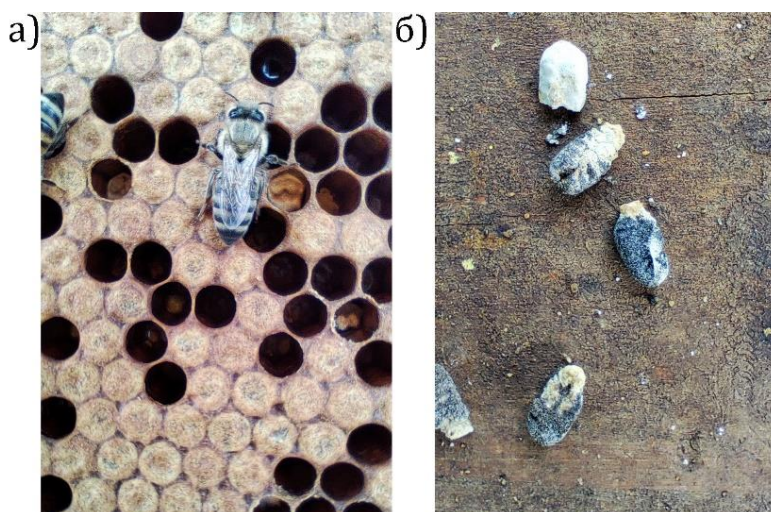
Типични симптоми кречног легла (Слика 4) су неправилно поклапање легла и измешане празне ћелије са ћелијама поклопљеног легла - „шарено легло“. Поклопљене ћелије могу имати мале рупе на поклопцима или изгледати благо спљоштено. Мумије се често могу видети у саћу, на улазу у кошницу или на подњачи (77). Могу се лако препознати у ћелијама које радилица не поклапају.

У свету се произведе око 5-37% мање меда, због смањене продуктивности у оболелим пчелињим друштвима (78). Иако обично није смртоносна за заједницу, може ометати њен развој смањењем популације радилица (79). Иако адулти не оболевају од овог патогена, они могу пренети болест унутар и између кошница (75).

Наследне генетске особине, као што је хигијенско понашање, могу спречавати појаву болести кречног легла (80). Температура и влажност у кошници су такође чиниоци који доприносе настанку ове болести (81, 82). Прехлађивање ларви (на 22 ± 2 °C) у току 24 сата пре или након поклапања легла је важан чинилац за појаву кречног легла (83).

Ascosphaera apis је опортунистички патоген који се лако шири и веома је распрострањен. Њено присуство у ларвама не мора нужно узроковати појаву болести, један или више предуслова се мора испунити истовремено да би се болест развила, нпр. прехлађивање легла, наследне особине пчела, неодговарајућа исхрана и присуство других пчелињих болести (76).

Слика 4. Легло из пчелињег друштва са клиничким симптомима кречног легла а) и мумије на подњачи б). Из многих ћелија су мумије кречног легла делимично уклоњене од стране пчела радилица.



Одговарајућа исхрана омогућава развој здравих пчелињих заједница (24), али до сада није успостављена директна веза између сиромашне исхране ларви и болести кречног легла. Недавна истраживања наговештавају да негативне последице заразних вирусних и гљивичних болести могу постати израженије услед слабе исхране пчела (23). Истовремено, на физиологију исхране медоносних пчела могу негативно утицати уобичајени пчелињи патогени и паразити (84, 85). Ово може довести до позитивне повратне спреге између лоше исхране и заразних болести, што може нагло нарушити здравље пчелиње заједнице (23).

Поређење елементарног састава ларви из здравих заједница и ларви и мумија из заједница које су показивале симптоме кречног легла би могло да укаже на евентуалну везу између присуства/одсуства одређених елемената и развоја болести .

2.2.2 Вароза

Поред слабе исхране, још једна велика претња глобалној популацији медоносних пчела је паразитска гриња вароа (*Varroa destructor* Anderson & Trueman), за коју многи научници сматрају да је главни узрок губитака пчелињих заједница. Више од 50 година обимних истраживања биологије, патологије и сузбијања је значајно повећало наше знање о варои (86–88). Међутим, безбедне, поуздане и једноставне методе сузбијања са коначним циљем потпуног истребљења ове штеточине из пчелињих заједница још увек нису постигнуте. Уобичајено коришћени синтетички акарициди, као што су флувалинат, амитраз и кумофос су често неделотворни због тога што вароа брзо развија отпорност на њих (89–92).

Поред директне штете коју вароа проузрокује храњењем на медоносним пчелама, колоније често почињу да се урушавају због способности гриње да преноси вирусе који постају још смртоноснији, којима вароа служи као вектор (93, 94). Ово, заједно са акумулацијом различитих пестицида који се користе за борбу против варое у производима из кошница, ствара синергистички ефекат, што доводи до тога да многи пестициди постају још токсичнији за медоносне пчеле (95).



Слика 5. Трутовско легло из кога је извучена трутовска ларва. Стрелицама су означене јединке варое. Трутовско легло привлачи вароу 5-12 пута више него радиличко легло, па се уклањањем поклопљеног трутовског легла уклања непропорционално велики број јединки варое (96).

Алтернативни приступ борби против варое је интегрисано управљање штеточинама (енг. „*integrated pest management*“) које користи неколико нехемијских алата који су показали ефикасност у контроли бројности варое (86). Главна предност коришћења интегрисаног управљања штеточинама је директно смањење употребе пестицида, који су главни узрок контаминације производа из кошница као што су мед, полен и восак.

Једна од техника које се користе у интегрисаном управљању штеточинама је уклањање затвореног трутовског легла, што се показало делотворно (97–99), Слика 5. Током репродуктивне фазе, женке варое радије бирају ларве трутова (трутовско легло) у односу на ларве радилица (радиличко легло) (96).

Међутим, значајан недостатак овог поступка је то што он доводи до губитка велике количине хранљивих супстанци. Ипак, пчелари уклањају велике количине трутовског легла сваке године (100). Иако лутке на којима паразитира вароа имају мању масу, може се рећи да је утицај варое на хранљиву вредност пчелињих лутки незнатан (101).

2.3 Особености биологије медоносне пчеле

Пчеле су социјални инсекти са комплексном биологијом која је прилагођена њиховој улози у екосистему и специфичном начину живота унутар пчелиње заједнице. Њихова физиологија је тесно повезана са задацима које појединачне радилице обављају током живота, попут сакупљања нектара, производње меда или бриге о леглу. Током различитих животних фаза, пчеле се физиолошки мењају што им омогућава да прелазе са једних послова на друге, било да су то младе радилице које брину о леглу или старије радилице које сакупљају храну.

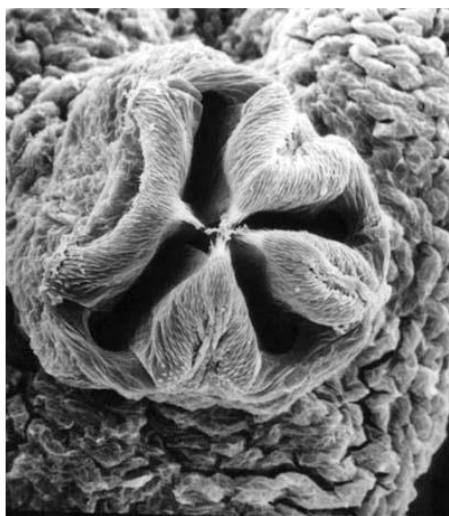
Важан део биологије пчела је њихов дигестивни систем, који је прилагођен за ефикасно варење нектара и полена, као и за прераду сакупљене хране у производе попут меда, перге и матичног млеча. Овај систем омогућава не само исхрану појединачних припадника пчелиње заједнице, већ и складиштење хране за целу заједницу. Разумевање дигестивног система и дигестивних ензима је кључно за проучавање пчелиње исхране и њене повезаности са пчелињим здрављем.

2.3.1 Дигестивни систем и дигестивни ензими

Дигестија је процес при коме се молекули из хране разлажу на мање молекуле који се апсорбују путем ћелија у цреву (102). Овај процес је омогућен дејством дигестивних ензима и условљен је местом на коме се налазе у цреву (103). Квалитет хране утиче на количину хране коју је неопходно унети ради добијања довољне количине хранљивих супстанци за раст и репродукцију, а и за прибављање енергије и нутријената неопходних за детоксикацију и дигестију (104). Пчеле не могу да искористе све протеине, масти и угљене хидрате који се налазе у њиховој храни (105), па део честица остаје несварен и акумулира се у задњем цреву из кога се избацује, када то временски услови дозвољавају, када пчеле излећу на прочисни лет.

2.3.1.1 Морфологија дигестивног система медоносне пчеле

Као и код већине инсеката и црево медоносне пчеле је подељено на предње, средње и задње црево. Алиментарни канал почиње усним отвором, иза кога се налази ждрело (енг. „*pharynx*“) од кога почиње једњак (енг. „*oesophagus*“) који се пружа целом дужином грудног дела (енг. „*thorax*“), а завршава се у желуцу (енг. „*crop*“).



Слика 6. Провентрикулус пчеле радилице.
Поглед од медне вољке према средњем
цреву. Преузето од Nation, 2008 (106).

Код пчела је ова структура позната као медни желудац (медна вољка, енг. „*honey stomach*“), која служи за транспорт и складиштење меда и нектара, а завршава се провентрикулуsom (енг. „*honey-stopper*“). Изглед дигестивног система пчела је приказан на Сликама 7 и 8.

Провентрикулуs (предњи део средњег црева) зауставља неконтролисан пролазак меда и нектара у средње црево (Слика 6). Служи и као филтер који удаљава полен из нектара. Нектар се враћа назад у медни желудац, а касније пакује у ћелије саћа. На четири прста се налазе преклапајуће бодље које служе за филтрирање нектара. Током филтрације полен се пребацује у средње црево, а процеђени нектар се враћа у медну вољку. Нектар потом може бити ускладиштен у ћелије саћа.

Затим следи средње црево (енг. „*ventriculus*“), које је место секреције ензима, варења и апсорпције нутријената. Задње црево почиње кратким малим цревом (енг. „*small intestine*“) у које се уливају Малпигијеви судови. Оно се наставља у велико црево (енг. „*rectum*“), које када нема услова за прочисни лет има изражену способност проширивања, и завршава се аналним отвором (107).

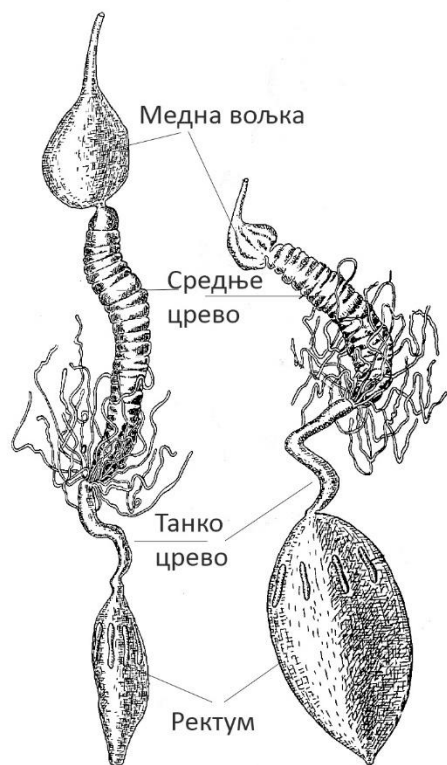
Код пет дана старих пчела највећи део апсорпције се обавља у средњем делу средњег црева, док се секреција ензима обавља у задњем делу средњег црева. Код тридесет дана старих пчела смањена конзумација полена је праћена смањеном активношћу ћелија у задњем делу средњег црева. Изгледа да се пчеле, као и други инсекти, ослањају на супротан ток течности (енг. „*countercurrent flow*“) у ектоперитрофном простору од оног у ендоперитрофном простору (108). На тај начин се ефикасније користе ензими и нутријенти у средњем цреву (109).



Слика 7. Абдомен пчеле радилице. Илустрован је супротан смер кретања (енг. „*countercurrent flow*“) течности у ендоперитрофном и ектоперитрофном простору. Преузето па прилагођено од Jimenez & Gilliam, 1989 (108).

Примарна улога перитрофне мембране вероватно није да заштити црево при исхрани чврстом храном, него да омогући ефикасно кружење ензима и хранљивих супстанци унутар средњег црева (109). Новоизведене ларве немају перитрофни матрикс и стичу га тек неколико дана након излегања из јајета, а несварени остаци хране се пребацују у задње црево из кога се празне пре улуткавања (106). Код адултих јединки рН у цревима је 5,6-7,0 и мења се дуж црева, а код ларви је 6,8 (110).

Поленова зрна која унесу адулти медоносне пчеле не бивају здробљена или пробијена дејством усног или цревног система. Нутријенти унутар поленовог зрна се растварају, варе и цуре из поленовог зрна кроз отворе за клијање. Скоро празна поленова зрна се пребацују у задње црево из којих се избацују углавном само у току лета (106), али за такав лет морају да постоје одговарајући временски услови.



Слика 8. Цревни систем код пчеле радилице. Лево – лети када пчеле сакупљају нектар и слободно излазе на прочисни лет. Десно – зими када пчеле мирују и не могу да излећу на прочисни лет услед чега им се у задњем цреву нагомилавају несварени остаци хране и производи метаболизма. Преузето, па прилагођено од Pavlovsky & Zarin, 1922 (112).

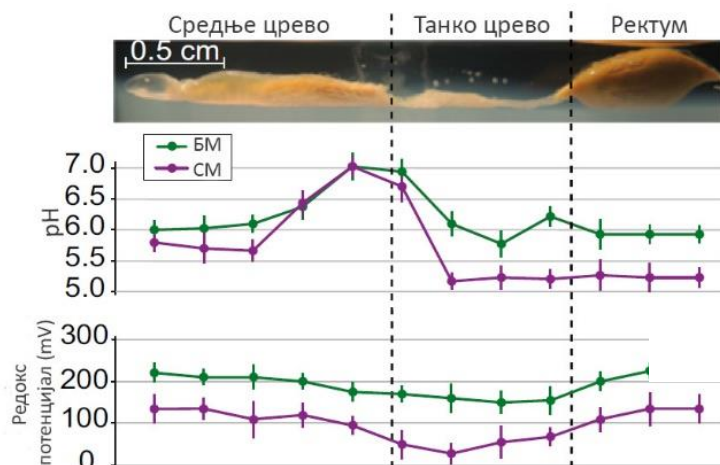
2.3.1.2 Микробиота у цреву медоносне пчеле

Микроорганизми су веома важни за дигестију хранљивих супстанци код пчела, па их не можемо занемарити, поготову због тога што различити микроорганизми могу да утичу на резултате овог истраживања. У цревима инсеката има много нутријената, нема опасности од исушивања и ултраљубичастог зрачења, а то све одговара микроорганизмима. Међутим ту се микроорганизми сусрећу са различитим неповољним чиниоцима као што су различите концентрације кисеоника, различит рН и редокс потенцијал, Слика 9. У лумен црева се луче дигестивни ензими и једињења повезана се имунским одговором, а при пресвлачењу и метаморфози микроорганизми губе станиште (113).

Микроорганизми у цревима учествују у различитим процесима који су веома значајни за домаћина, као што је разградња тешко сварљивих угљених хидрата (пектина, лигнина и других сложених молекула) или имуномодулација. Поред тога продукују и пчелама корисне молекуле, нпр. масне киселине (114, 115).

Главни микроорганизми у цреву медоносне пчеле се преносе контактом и трофилаксом између чланова заједнице. Цревни микроорганизми су веома отпорни, без

обзира на различита станишта која пчеле насељавају, па је специфична група организама стално присутна, а то указује на веома специјализоване међусобне односе између пчела и њиховог микробиома. Утврђено је да 8-9 врста бактерија сачињава 95-99% свих микроорганизама медоносне пчеле, без обзира на срединске, географске и генетске разлике између домаћина. Осим бактерија ту су и гљиве, од којих су неке познати патогени као што је *Nosema sp.* Могу бити присутне и различите патогене бактерије (116, 117).



Слика 9. pH и редокс потенцијал дуж црева пчела без микроорганизама (БМ) и са уобичајеном микробном заједницом (СМ). Преузето па прилагођено од Zheng et al., 2017 (110).

Иако је присуство главних врста релативно константно, значајне варијације постоје између различитих делова црева, касти, заједница, ларви и радилица. Највећи број бактерија живи у задњем цреву, а ларве и тек изведене пчеле једва да имају развијен микробиом. Разумевање интеракција између микробиота ће помоћи да се предвиди како ће заједница реаговати на промену и како ће то утицати на домаћина. Утврђено је да је микробиом пчела тесно повезан са имунским системом, метаболизмом и отпорношћу на патогене, а то је нађено и код бумбара (116, 117). Конзумирање аутоклавираног полена води ка микробиому који је сличнији пчелама које се нису храниле поленом. То је вероватно узроковано тиме што пчеле приликом сакупљања полена додају пљувачку у њега. Пљувачка им служи да лакше причврсте полен за корпице на ногама и у лету га донесу у пчелињу заједницу, а у пљувачки се налази типични пчелињи микробиом. Међутим, ово може бити и због тога што пчеле радије једу полен који није аутоклавиран (118).

2.3.2 Дигестивни ензими

Дигестивни ензими медоносних пчела су добро истражени (24) и могу бити пореклом из хране, било да су биљни или из микроорганизама са цветова, из микроорганизама који насељавају дигестивни тракт пчеле, а наравно могу бити и пчелињи.

У полену различитих врста детектована је различита трипсину-, химотрипсину-, карбоксипептидази А- и Б- слична ензимска активност, али је знатно мања од оне у средњем цреву пчела (119).

Пчеле из једне пчелиње заједнице су у стању да сакупљају храну са површине од најмање 100 km² при чему уколико имају избора одабирају оне изворе хране који им највише одговарају. Поред тога пчеле када имају природан извор хране слабо или уопште не једу замене и допуне које им пчелар даје (120).

Због свега тога је тешко контролисати састав хране код пчелиње заједнице где пчеле слободно излећу у околину (84, 85). Услед тога је погодно коришћење кавеза, из

којих пчеле не могу да излеђу, у експериментима који би послужили за испитивање дигестивних ензима. На тај начин би се постигао контролисан састав хране, а последично и различито испољавање различитих дигестивних ензима. Оваква поставка експеримента омогућава да се утврди да ли постоји веза између врсте хране и ензима који се у зависности од врсте хране луче.

2.3.2.1 Варење протеина

Главни извор протеина за пчеле је полен, а пептидазе су највише проучавани ензими у цревима инсеката (121). Протеолитичка активност варира са старошћу, годишњим добом, али највише зависи од функције и физиолошког стања радилица (122). Пчеле неговатељице имају већу протеолитичку активност у својим цревима него пчеле излетнице и првенствено се хране поленом богатим протеинима како би произвеле матични млеч за храњење ларви и матице (108, 122).

Пчеле излетнице које се хране нектаром и медом богатим угљеним хидратима (24), имају смањену способност варења протеина и нижу активност цревних протеолитичких ензима него неговатељице (123). Трипсинска и химотрипсинска активност је већа код пчела које хране ларве, него код излетница (124).

Већа активност протеаза у средњем цреву откривена је код пчела старих 7 дана које су добијале храну која садржи 30% и 35% сирових протеина у поређењу са онима које су храњене другим заменама за полен са 15%, 20% и 25% протеина (125). Ово показује да ове групе пчела не само да су уносиле више протеина, већ су и вариле и апсорбовале више протеина од других (125), а ниво протеолитичке активности је директно повезан са количином унетих протеина.

Радилице неговатељице које негују и хране легло су најважније не само за дигестију, него и за расподелу протеина унутар заједнице. Оне су добро припремљене за дигестију протеина, има их много и од полена праве млеч коју затим деле осталим члановима пчелиње заједнице (33).

2.3.2.1.1 Пептидазе

Ензими који хидролизују пептидну везу су пептидазе а деле се на егзопептидазе и ендопептидазе (121, 126). У средњем цреву радилица детектоване су четири пептидазе са различитим хидролитичким својствима. Од тога је једна слична говеђем трипсину, а једна химотрипсину (127). Даљим пречишћавањем пронађене су три ендопептидазе, од тога две сличне химотрипсину, а једна трипсину (128). Оптимална рН вредност за активност трипсину-сличном ензиму је 8,5, химотрипсину-сличном ензиму између 7,5 и 9, а укупна казеинолитичка активност је максимална на рН вредности између 8 и 10. Њихова активност не зависи од јона Ca^{2+} (122).

Карбоксипептидазе инсеката су подељене на карбоксипептидазе А и карбоксипептидазе Б (121). Из хомогената три дана старих ларви изоловане су две протеазе и то карбоксипептидази А-сличан ензим (38 kDa) и химотрипсину-сличан ензим (28 kDa), а поред ње пронађена је још једна серин протеаза. Оне хидролизују протеине матичног млеча у базној средини (129). Детектован је и карбоксипептидази Б-сличан ензим од 40 kDa (130). Химотрипсину-сличан ензим је детектован у ларви матице, па експримиран у *Escherichia coli* и инсекатским ћелијама. Оба експримирана протеина имају масу 26 kDa, што сугерише да нема постранслационих промена (130, 131). Код инсеката највећи број ензима сличних химотрипсину има масу 20-30 kDa и рН оптимум у распону 8-9, независно од рН вредности у средњем цреву (121).

Адулти пчела синтетишу и луче трипсину сличне ендопептидазе у лумен црева. Младе радилице продукују много више трипсина него старе, мада се значајна активност овог ензима детектује 12 дана после максималне исхране поленом (108). Присуство овог ензима код пет дана старих пчела храњених само шећерним сирупом и водом показује да до неког лучења ензима долази без икакве стимулације храном, а та активност, само смањена, постоји и код 21 дан старих пчела (108).

2.3.2.2 Варeње угљених хидрата

Главни резервни полисахариди у полену су скроб и пектин (132), а сахароза је доминантан шећер у нектару многих биљних врста (40). Због тога не чуди да су амилаза и α -глюкозидаза најбоље истражени пчелињи ензими. Пектиназе, иако значајне, су много мање истраживане.

2.3.2.2.1 Дигестија скроба (амилаза)

Скроб је један од најзаступљенијих полимера. Складишти се у већини зелених биљака у облику гранула. Грануле се обично формирају унутар безбојних пластида (амилопласта) и карактеристичног су облика и величине за различите биљне врсте. Скроб је састављен од амилозе, линеарног полимера састављеног од многих α -(1,4)-D-глюкопиранозних јединица, и од амилопектина (разгранатих молекула), код ког су гране α -1,4 повезаног ланца повезане преко α -1,6 веза (133).

α -Амилаза (Е.С. 3.2.1.1) је главни ензим за хидролизу скроба, али потпуна хидролиза до глюкозе се постиже синергистичким деловањем са егзо-ензимима као што су α -гликозидазе или глюкоамилазе, чије је присуство потврђено код пчела (134–137). α -Амилаза катализује ендохидролизу дугачких α -1,4-глюканских ланаца скроба и гликогена (103). Она хидролизује унутрашње везе полисахарида до малих олигосахарида и дисахарида. Амилаза претвара скроб из полена у мање молекуле што доводи до тога да перга садржи више редукујућих шећера и мање скроба него полен (50). Услед тога је скроб детектован у различитим узорцима полена, а није могао да се детектује у перги (51), мада су скроб могли да хидролизују и бактеријски ензими.

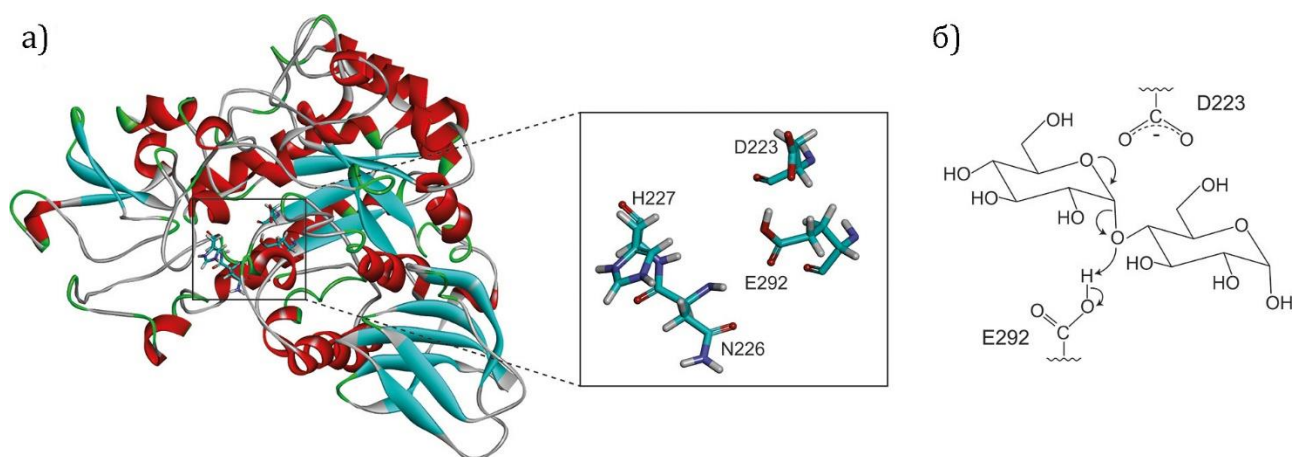
Пчеле излетнице не само да сакупљају храну коју у кошници предају млађим пчелама, него и делимично варе скроб у лету, па им исхрана скробом омогућава дужи лет, што код трутова није забележено (138).

Активност и стабилност инсекатских амилаза је зависна од јона калцијума, а хлоридни јони их активирају. Молекулске масе инсекатских амилаза се крећу у опсегу између 48 и 68 kDa, а рН оптимум веома варира између 4,8 и 9,8 у зависности од таксона (139). β -Амилаза (Е.С. 3.2.1.2) уклања малтозу са краја ланца, а глюкоамилаза (Е.С. 3.2.1.3) уклања глюкозу са нередукујућег краја ланца (121).

Амилаза сачињава приближно 2-3% укупних протеина у ХФЖ код пчела излетница (32). Амилаза из ХФЖ и из меда је веома слична, активирају је хлоридни јони, а инхибира је N-ацетилимидазол (140). Молекулска маса амилазе из меда је 57 kDa (141).

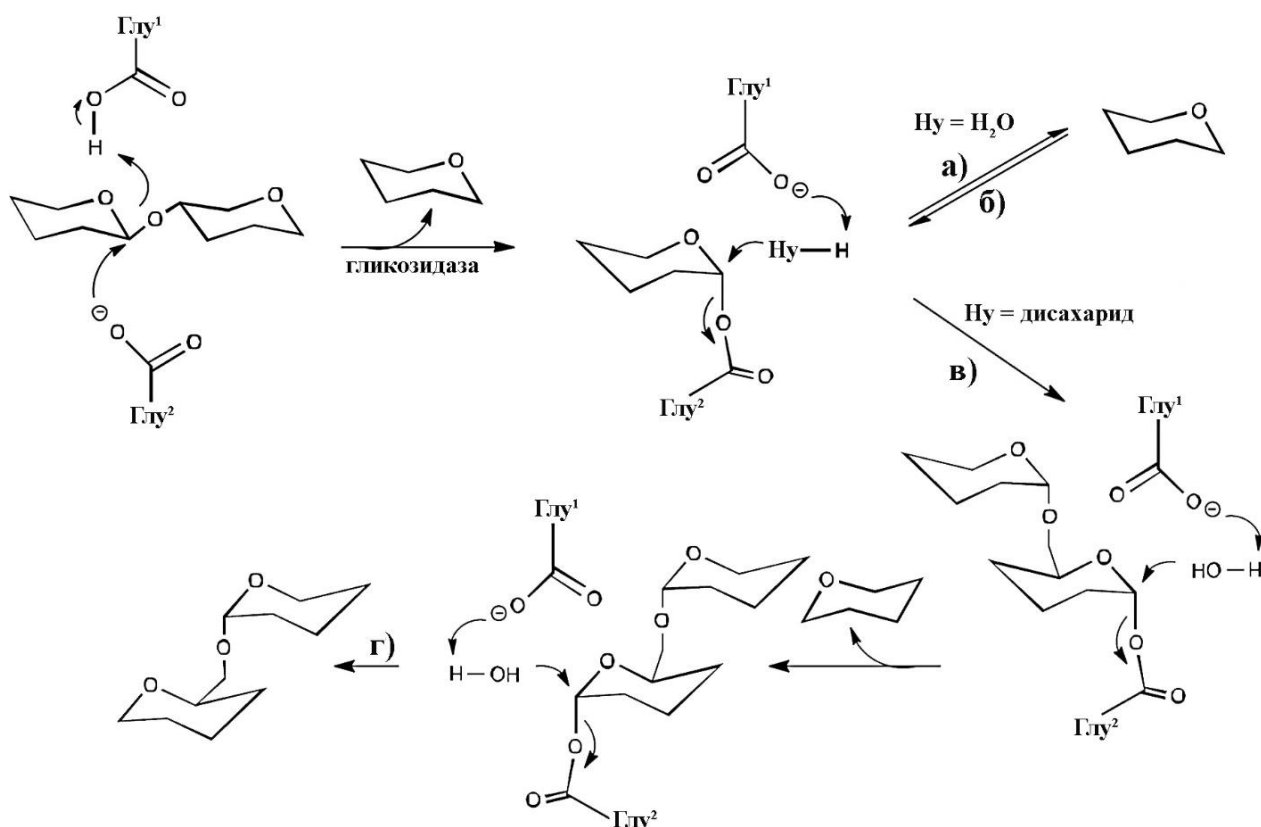
2.3.2.2.2 Дигестија сахарозе (α -глюкозидаза)

Медоносне пчеле имају неколико α -глюкозидаза које хидролизују сахарозу (135), обично главни угљени хидрат у нектару (Слика 10). Добијену глюкозу и фруктозу користе као извор енергије или од њих производе мед (106). Ензим α -глюкозидаза (Е.С. 3.2.1.20) је најзаступљенији протеин, око 50% укупних протеина, у ХФЖ пчела излетница, масе 70 kDa (142), а рН оптимум јој је 5,0 (143).



Слика 10. Модел пчелиње α -глюкозидазе II, са означеним најважнијим аминокиселинама у активном месту а), први корак у хидролизи α -гликозидне везе посредством карбоксилатног јона б). Преузето, па прилагођено, од Punnnatin et al., 2020 (144).

α -Глюкозидаза¹ је егзо-карбохидролаза која хидролизује нередукујуће крајње α -гликозидне везе и ослобађа α -D-глюкозу. Није β -D-фруктафуранозид фруктохидролаза (ЕС 3.2.1.26) јер не хидролизује рафинозу (145). Код високе концентрације супстрата овај ензим такође има трансферазну активност (трансглюкозидациону) помоћу које формира различита α -глюкозилована једињења – олигосахариде (145–148).



Слика 11. Механизми деловања гликозидаза: а) хидролиза, б) реверзна хидролиза, в) трансгликозидација и г) секундарна хидролиза. Ну – нуклеофил. Преузето па прерађено од Mangas-Sánchez & Adlercreutz., 2015 (48).

¹ α -Глюкозидаза се, у старијој литератури, назива инвертаза или сукраза.

α -Глукозидаза I је изолована и окарактерисана из *Apis cerana* Fabricius. Молекулска маса је 82 kDa, а рН оптимум 5,0. Стабилна је до 40 °C (148). Главна α -глукозидаза, која чини 60% укупне α -глукозидазе, се таложи 50-70% амонијум сулфатом. Веома растворна α -глукозидаза чини остатак и таложи се амонијум сулфатом (>80%). У меду се 98% α -глукозидазне активности таложи 50-70% амонијум сулфатом (145).

Имунским техникама је потврђено да је α -глукозидаза I присутна у средњем цреву, α -глукозидаза II, у средњем цреву и хемолимфи и α -глукозидаза III у ХФЖ, из које се ензим излучује у нектар који сакупљају пчеле, па је то α -глукозидаза која се налази у меду. Такође је присутна у средњем цреву у току зиме (149).

ХФЖ су највеће код пчела које улазе у ћелије са леглом и хране га, али изгледа да је излучена маса у тим жлездама храна за ларве. Секреција инвертазе, насупрот томе, није повезана ни са каквом видљивом променом. α -Глукозидаза може бити једнако добро заступљена у великим жлездама, а и у оним које су наизглед атрофирале (35).

Егзогликозидазе (α -глукозидаза) секу крајње шећере у ланцу, док ендогликозидазе могу да секу полисахаридни ланац у средини (48). Гликозидазе могу да катализују било реверзну хидролизу (Слика 11б) што је под термодинамичком контролом, било трансгликозидацију (Слика 11в) што је под кинетичком контролом. Када је дисахарид супстрат (нпр. сахароза), производи трансгликозидације се образују путем аутокондензације. Да би се ово догодило овај процес мора бити бржи од хидролизе гликозида (нпр. сахарозе) (150). Пчелињи ензим α -глукозидаза хидролизује сахарозу до фруктозе и глукозе, али има и трансглукозидазну активност (146, 147).

2.4 Замене и допуне у пчелињој исхрани

Сиромашна исхрана је све већа опасност за медоносне пчеле, због чега оне постају подложније пестицидима и болестима (9) али ово може бити ублажено вештачким заменама (151).

Пчеле прихрањиване комерцијалном заменом за полен, која је садржала 56% шећера, су након тога произвеле 38% више меда по пчелињој заједници и 23% више меда по пчели, иако нису одгајиле више легла. Претпоставља се да, због недостатка фагостимуланаса, ту замену нису конзумирале пчеле које негују легло, него пчеле које је требало да постану излетнице, које су због исхране комерцијалном заменом за полен постале излетнице са већом количином протеина у телу (152).

Природну исхрану пчела сачињавају полен, нектар (медљика или мед) и вода. У рано пролеће, када су полен и нектар још увек недоступни, или у другим периодима у току године када ове супстанце нису доступне пчелама или присутне у околини, пчелиње заједнице се прихрањују. Тако им се може помоћи да преживе неповољан период или да повећају своју бројност, па да касније донесу више меда и успешније опраше усева (153). Пчеле се могу прихрањивати протеинима што је замена за полен, или угљеним хидратима што је замена за нектар. Све ове супстанце морају бити квантитативно и квалитативно прилагођене пчелињим потребама и дигестивном систему (153).

2.4.1. Замене за полен

Прихрана протеинима се обично дели на прихрану допунама или заменама. Замена је било која храна која, на кратко, задовољава потребе пчелиње заједнице за протеинима. Када се у ту замену дода полен (обично 5 – 25%), који служи као фагостимуланс и да би се повећала хранљива вредност онда се она декларише као

допуна (20). Прихраном поленом се могу пренети заразне болести у пчелињу заједницу (154). Полен је на тржишту скуп и очекује се да ће се све више користити у људској исхрани (50).

Иако је у прошлости било доста покушаја да се направи добра замена за полен и нектар, савршена замена и даље не постоји (5), тј. ни једна замена није показала ни приближно добре резултате као природна пчелиња исхрана, иако су различите комбинације исхране развијене и описане (24, 155).

Шећерни сируп је прилично добра замена за нектар (153), међутим одговарајућа замена, пре свега за протеине и липиде из полена не постоји (5). Највећи проблем је пронаћи одговарајућу замену која је јефтина и привлачна пчелама, а истовремено садржи довољну количину одговарајућих протеина и липида.

Иницијално се чинило да је сојино брашно добра замена за полен. Међутим, иако су пчеле храњене сојиним брашном успешно гајиле легло, њега је било много мање него у нормално храњеним друштвима. Показало се да се добијају много бољи резултати када се у њега дода обрано млеко у праху и пекарски квасац, и да у сојином брашну има премало ниацина и рибофлавина (156).

При прихрани пчела никако не треба заборавити липиде. Када је у замену (сурутка и квасац) додавано 2-4% метанолног екстракта липида из полена пчеле су одгајивале исту количину легла као и оне које су храњене поленом (157).

2.4.1.1 Ентомофагија (исхрана инсектима)

Постоји широк спектар могућности за исхрану инсектима. Јестиви инсекти и производи од инсеката су у ЕУ законодавству дефинисани као нова храна и могу се продавати на тржишту целе ЕУ (158). Они се углавном гаје ради исхране људи и стоке, а остатак биомасе и измет гајених инсеката се користи као ђубриво. Инсекти се могу гајити на различитим супстратима од органског отпада, преко морске траве до комерцијално произведене хране. Индустрија јестивих инсеката се брзо развија, а при њеној промоцији се често обећава да она може да се суочи са глобалним изазовима, као што је рационална употреба ресурса, рециклирању биомасе и смањењу емисије гасова стаклене баште (159).

Они су пре свега алтернативни извор протеина у људској и животињској исхрани у односу на традиционалне изворе протеина као што су месо, риба, соја и млеко. Привлачни су због ниске емисије гасова стаклене баште, високог степена конверзије, мале употребе земљишта и њихове способности да претворе органски отпад мале вредности у протеинске производе високе вредности. Користе се за исхрану рибе, живине, кућних љубимаца (160, 161) али до сада нису коришћени за исхрану пчела.

2.4.1.2 Канибализам у пчелињој заједници

Пчелиње легло је богато протеинима, мастима, угљеним хидратима, витаминима и минералима (162). У експерименталним условима када престане доток полена у кошницу, пчеле већ после пет дана почињу да се хране ларвама млађим од три дана и да раније поклапају легло (163). На тај начин пчеле покушавају да што боље искористе расположиве хранљиве супстанце у пчелињој заједници. Ово није једини пример канибализма код медоносне пчеле. Када се матица спари у блиском сродству смањује се преживљавање легла, јер се уместо радилица из јаја развијају ларве диплоидних трутова, али само у експерименталним условима. У природи све овакве ларве убрзо по излегању нестају из легла тако што бивају поједене (164). Једина корист од њих је та што би могле да послуже као извор хране (165).

Потврђено је да се C¹⁴- фенилаланин, из помоћу њега обележених па поједених ларви, веома конзервативно уграђује у матични млеч (166). Када матица (или лажне матице) положи више јаја у једну ћелију, пчеле полако једу вишак јаја, а исто тако и ларве које се из њих изведу. Више ларви од једне, у једној ћелији, не остају дуже од четири дана после излегања из јајета (167). Јаја положена на периферији легла, где нису добро покривена радилицама бивају често поједена (168). Када је поклопљено легло механички отворено, пчеле су неке лутке поново поклопиле, а неке уклониле. При томе би меке делове искористиле, а хитин избациле из кошнице. Удео поједених лутака се смањивао са њиховом старошћу, а растао са степеном недостатка полена у кошници (169).

2.4.2 Замена за нектар

За време периода када нема пчелиње паше или после врцања меда, пчелари често замењују природан извор угљених хидрата (нектар) који пчеле сакупљају различитим угљеним хидратима као што су сахароза, инвертни сируп или високофруктозни кукурузни сируп (170, 171).

Међутим утврђено је да пчеле усвајају хранљиве компоненте из меда које нису присутне у заменама које се обично користе у апикултури (171). Исхрана пчела медом, сахарозом или високофруктозним кукурузним сирупом активира различите гене у масном ткиву (171). Исхрана сахарозом мења састав бактерија у дигестивном тракту пчела (170).

Сируп од сахарозе из шећерне репе и шећерне трске се традиционално користи за прихрану пчелињих заједница, а тиме се постижу добри резултати (172), што потврђује да су то добре замене нектара у исхрани медоносних пчела (153).

Нектар може бити замењен шећерним сирупом, сувим шећером у кристалу или шећерним погачама (153). Пчелама које се хране чврстим шећером се четири пута брже троше длачице на језику него онима које конзумирају шећерни сируп, а процењује се да нето унос енергије оваквом прихраном опада за 50% (173). Сахарозни сируп је, као извор енергије, бољи од других замена као што су кукурузни и пшенични сируп, а у експериментима у кавезима пчеле су најдуже преживљавале на сахарозном сирупу (174).

Еквимоларна смеша глукозе и фруктозе, позната као инвертни сируп, се много користи у прехранбеној индустрији, а такође и за производњу вештачког меда (175). Густ инвертни сируп се боље одупире кристализацији него сахарозни сируп, што је за комерцијалне пчеларе пожељна особина. У последње време се инвертни сируп сматра за замену која има потенцијал да још више унапреди стање пчелиње заједнице јер пчеле нису принуђене да производе ензиме за разградњу сахарозе као када се хране сахарозним сирупом (172). У беспашним периодима, када су пчеле могле слободно да излећу из кошнице, прихрана инвертним сирупом се показала као подједнако ефикасна као и прихрана сахарозним сирупом (176), али никакви ни корисни ни штетни ефекти нису утврђени у поређењу са сахарозом (172).

Пекарски квасац (*Saccharomyces cerevisiae*) је најзначајнији извор ензима инвертазе (177), најзаступљенијег ензима за производњу инвертног сирупа који се користи за исхрану пчела. Инвертаза из квасца је β -фруктофуранозидаза (ЕС 3.2.1.26), катализује хидролизу сахарозе у глукозу и фруктозу (178). Она поред тога има и фруктотрансферазну активност (179), па може да производи фрукто-олигосахариде попут кестозе, нистозе и фруктофуранозид-нистозе (180).

2.5 Испитивање својстава хране у лабораторијским условима

Теренска испитивања хране за пчеле су компликована јер у природи постоји много променљивих чинилаца, јачину пчелињих заједница је тешко уједначити, ту су и разни проблеми повезани са оријентацијом пчела на различите изворе хране, пестициди, болести и сл. Због тога је корисно када се неки закључци о квалитету хране донесу у лабораторијским условима. Постоји дугогодишња пракса да се замене за полен бирају на основу присутне количине протеина и евентуално липида (20, 22), међутим то се показало као недовољно. Праћењем промене масе и преживљавања пчелињих јединки у контролисаним условима у зависности од хране коју конзумирају добија се одговор на питање која храна је погоднија. Увођењем експеримената заснованих на детекцији дигестивних ензима код пчела гајених у контролисаним кавезним експериментима, које се хране различитим заменским хранама, добија се шира слика и прецизније одређује погодност хране.

2.5.1 Поређење ензимских профила код различито храњених пчела

Растворљиви протеини код инсеката ефикасно стимулишу производњу и ослобађање ензима који варе протеине, вероватно кроз механизме повезане са уносом хране (181), а то је забележено и код медоносних пчела (125). Ово је примећено и код многих других врста инсеката.

Тестирање профила дигестивних ензима у лабораторији може бити ефикасан начин да се скрате теренска испитивања замена за исхрану медоносних пчела, где се свака замена која изазива производњу веома различитих дигестивних ензима у поређењу са контролном храном са поленом може одбацити пре теренских испитивања. За ове лабораторијске експерименте је потребно много мање пчела, хране и времена него када се испитивање хране обавља на терену где постоји много променљивих чинилаца, а утврђује се и које се изоформе производе, што није могуће у теренским истраживањима.

2.5.2 Поређење концентрације минерала

При сачињавању замена за полен највише се води рачуна о концентрацији протеина, а у задње време и липида, вероватно због тога што су они највише истраживани. Међутим концентрације и врсте присутних минерала су углавном занемарене, вероватно због тога што њихова улога није разјашњена.

Минерали су веома важни за развој ларви и адулата пчела. Елементи који су есенцијални за пчеле укључују Na, K, Ca, Mg и P, док су други као што су Al, Pb, Cd и Ba токсични (65, 66).

Анализа концентрације елемената у ларвама великог брашнара је урађена за неке главне елементе: Na, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cu, Sr (182–184) или за тешке метале, Cd, As, Hg, Pb (185, 186). Сличне анализе су спроведене на трутовском леглу за Na, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Mn, Zn, Cr, Cu, Sr, As и токсичне метале Al, Cd, Pb (187–189). Међутим, недостаје свеобухватнија елементарна анализа. Штавише, свеобухватно поређење између ове две врсте инсекатског брашна и утицај присутних микронутријената на здравље пчела није у потпуности описано (190).

Резултати експерименталног одређивања елементарног састава ларви би могли да допринесу одређивању тачних концентрација микроелемената који су неопходни пчелама, што би могло да се искористи за дозирање у заменама за природну пчелињу храну.

3. Наши радови

Познато је и општеприхваћено да је исхрана веома важна за добро здравље, успешан раст и развој сваког живог бића, па тако и пчела. Међутим везе између ових чинилаца нису увек праволинијске и често их је тешко пронаћи, пре свега због великог броја променљивих који одређују и утичу на живот сваког организма.

У пчелињој заједници је то нарочито изражено због многобројних и сложених међусобних односа који у њој постоје. Ипак због значаја медоносних пчела у савременој пољопривреди и многобројних опасности са којим се пчеле и пчелари сусрећу, сиромашна исхрана је једна од највећих тешкоћа, потребно је веће познавање утицаја различите исхране на пчелиње заједнице.

Због тога су у овом раду постављени следећи циљеви:

- успостављање везе између различите хране (чврсте и течне) и присуства дигестивних ензима у средњем цреву, глави и меду које пчеле производе од сакупљене хране,
- испитивање да ли је исхрана пчела инвертним сирупом има биохемијску оправданост,
- тестирање и поређење нових извора хране (замена за полен), прерађених ларви великог брашнара и прерађеног трутовског легла, ради унапређења исхране и здравља пчелињих заједница,
- успостављање везе између састава хране, здравља, дужине живота и масе радилица,
- успостављање везе између исхране пчела и пчелињих болести (кречно легло),
- биохемијска карактеризација пчелињих ензима (α -глукозидазе као једног од најзначајнијих),
- поређење састава и својстава (склоност ка кристализацији, густина) меда које су пчеле направиле конзумирајући различите сирупе,
- проналажење нових начина за поређење хране за пчеле у лабораторијским условима, ради избора бољих замена за полен. Поређење ензимских профила који настају када се пчеле хране различитом храном са оним који настају када се пчеле хране својом природном храном која показује најбоље резултате; поређење елементарног састава различитих храна.

3.1 Нове замене за полен

Упркос многобројним истраживањима до сада није сачињена ниједна замена која може у потпуности да обезбеди исхрану коју пружа полен (57), па је потребан разумнији приступ који је више утемељен на екологији и физиологији медоносних пчела (5).

3.1.1 Нова замена за полен – брашно од ларви великог брашнара

Већина замена за полен је базирана на соји, млеку, ланеном уљу и квасцу (24) и има висок угљенични отисак (191). Нова одрживија замена за полен, која је по први пут у свету предложена у овој дисертацији, је веома богата липидима сличног састава пчелињим липидима. То су ларве јестивих инсеката, тј. прецизније ларве великог брашнара (*Tenebrio molitor* L.).

Ларве великог брашнара садрже 64,1% влаге, 13,8% липида, 17,6% протеина, 1,5% пепела и 3,1% угљених хидрата (192). Пчелиње легло садржи 76,8% влаге, 4,7% липида, 9,4% протеина, 0,8% пепела и 8,0% угљених хидрата (162). Сув полен садржи 10–40% протеина и 1–13% липида (193). Сушене ларве великог брашнара садрже око 33% масти и 51% протеина (194).

Ово показује да је концентрација протеина и масти у сувим ларвама великог брашнара (које су овде коришћене) много већа него у полену и да може лако бити смањена на жељени ниво мешањем са шећерном погачом.

Ларве великог брашнара су гајене током 90 дана, просејаване, изгладњиване 24 h, опране, а затим бланширане и сушене до 40% почетне масе. После тога су стерилисане а затим је од њих млевењем прављено брашно.

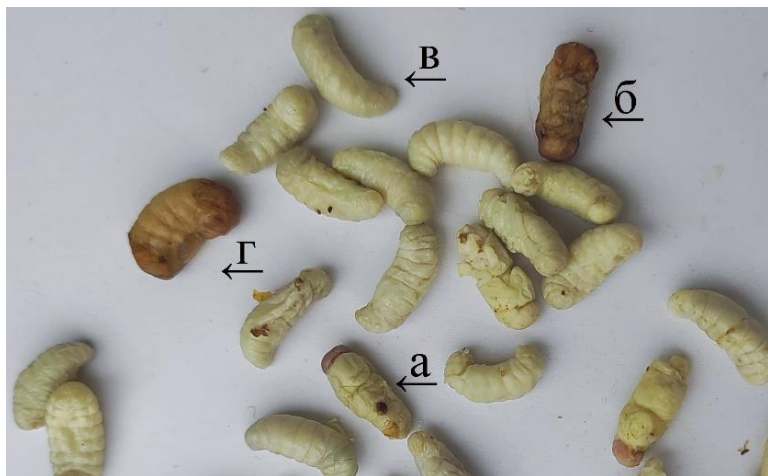
3.1.2 Нова замена за полен - брашно од трутовског легла

Поред ларви комерцијално гајених јестивих инсеката, као замена за полен је разматрано и прерађено трутовско легло (трутовске ларве и лутке које су одвојене од воска), које се често уклања ради борбе против главног пчелињег паразита варое (100), али се на тај начин често баца велика количина хранљивих супстанци које су пчеле сакупиле.

Ларве великог брашнара (192) и ларве и лутке у пчелињем леглу (162) су богате протеинима и липидима. Када се ларве ове две врсте осуше приликом припреме инсекатског брашна, удео протеина и липида постаје још већи, чинећи их погодним састојцима за замену за полен јер се лако доводе на жељени удео (194) мешањем са шећерном погачом.

3.1.2.1 Узгајање трутовског легла и припрема трутовског брашна

У пет пчелињих заједница смештених у Вршцу, Србија (45°06'35.3"N 21°18'27.0"E) је постављен по један дрвени оквир без сатне основе, непосредно поред оквира са радиличким леглом. Након 25 дана, сакупљено је затворено трутовско легло из пет заједница. Да бисмо уклонили восак, прокували смо трутовско легло у води. Чим је вода почела да кључа, процедили смо мешавину воде, воска и трутовских ларви и лутака. Затим смо поновили исти поступак још једном. Као резултат добили смо куване ларве и лутке, које смо осушили и самлели, као и пчелињи восак. Ларве и лутке су провераване на присуство варое. Изглед трутовских ларви и лутки је приказан на Слици 12.



Слика 12. Трутовско легло након кувања и цеђења: а) Трутовска лутка са присутном вароом након уклањања кокона, б) Трутовска лутка обмотана коконом, в) Трутовска ларва након уклањања кокона, г) Трутовска ларва обмотана коконом.

Након одвајања трутовских ларви и лутки од воска, може се приметити да су оне обавијене коконом, Слика 12. Са укупно 100 ларви и лутки је уклоњен кокон како би се утврдило да ли су оне заражене вароом и на њима су пронађене укупно 4 јединке варое.

Од 1500 g трутовског легла је добијено 1130 g куваних ларви и лутки, а када се оне осуше добија се 300 g сувих ларви и лутки, и 130 g воска. Из наших података се може проценити да се од стартне масе трутовског легла добија око 20% масе трутовског брашна. Веома је важно рећи да је опрема за припрему трутовског брашна присутна у готово сваком домаћинству, па пчелари могу једноставно да припреме ову замену за полен.

3.2 Гајење пчела, узимање и припрема узорака

Адулти медоносне пчеле (*Apis mellifera carnica* L.) су пореклом са пчелињака у близини Београда. Пчеле су биле старе 0-24 сата, пореклом од исте матице и из исте кошнице како би се минимизирале генетске и нутритивне разлике (195). Скупљене су са рамова након извођења у инкубатору, измерене су им масе, па смештане у дрвене кавезе.

Око 100 пчела (10 g) је држано у кавезима као што је описано (196). Гајене су 28 дана у инкубатору, на 34 °C и релативној влажности од 80%. Вода је била мењана два пута недељно, а потрошња воде је бележена. После 7, 14, 21 и 28 дана је из сваког кавеза узиман узорак од по петнаест пчела. Приказ кавеза и поступци гајења су приказани на Слици 13.

Приликом паковања пчела у инкубатор узето је 28 пчела и оне су измерене. Укупна маса је износила 2,70 g, што значи да једна тек изведена пчела има у просеку масу од 0,0964 g. На основу дељења масе додатих пчела у кавезе са масом једне пчеле израчунат је приближан број пчела који је стављен у сваки кавез, што је приближно 103-104 пчеле, Слика 13а.

3.2.1 Гајење пчела ради поређења замена за полен

Комерцијална шећерна погача (ШП) је мешана са квасцем, поленом или брашном од великог брашнара како би се направиле погаче са квасцем (КП), погаче са поленом (ПП) и погаче са брашном од великог брашнара (ТП), као што је приказано у Табели 1.

Табела 1. Састав погача којим су храњене пчеле.

Назив погаче и ознака	Врста додатка погачи	Маса додатка погачи (g)	Маса комерцијалне погаче (g)
шећерна погача (ШП)	-	0	200
шећерна погача са додатим поленом (ПП)	Сушени замрзнути полен	25	175
шећерна погача са додатим квасцем (КП)	Суви инактивисани пивски квасац	25	175
шећерна погача са додатим брашном од великог брашнара (ТП)	Брашно од сушених млевених ларви <i>Tenebrio molitor</i>	25	175

Квасац, полен и брашно од великог брашнара су аутоклавирани пре мешања са шећерном погачом да би се уклонила ензимска активност и присутни микроорганизми. Свака од четири тестиране групе (ШП, КП, ПП и ТП) се састојала од пет кавеза у које је

стављено по 40 g испитиване погаче делимично обавијене приањајућом фолијом како би се спречило исушивање, Слика 13в.

Кавезни експерименти који укључују младе, тек изведене, пчеле захтевају опрез јер њихов микробиом није у потпуности развијен, зато што нису биле у контакту са пчелама неговатељицама (197). Показано је да се колонизација одређеним филотиповима може обавити контактом са саћем или приликом изласка младих пчела из ћелија поклопљеног легла, као и контактом и трофилаксом са старијим пчелама (198). Пчеле у овом истраживању су се извеле у инкубатору из оквира који вероватно садрже микробиом црева пчела. Тек изведене, младе пчеле, су имале релативно мало времена (0–24 сата) да стекну типичне филотипове.

Аутоклавирањем свих додатака комерцијалној шећерној погачи, осигурали смо да се не уносе различити микроби са различитим састојцима хране, што би могло довести до разлике у пчелињем микробиому, па тако и присуства различитих дигестивних ензима и различитог варења. Такође су због тога дигестивни ензими присутни у састојцима додатака изгубили своју активност, нпр. амилазе имају високу активност у брашну од великог брашна па их је потребно денатулисати да не би ометале детекцију пчелињих дигестивних ензима.

Један од разлога због чега су коришћене тек изведене пчеле старости 0-24h је и то што тек изведене пчеле, као што је претходно наведено, имају слабо развијен микробиом.

3.2.2 Гајење пчела ради поређења замена за нектар

а)



б)



в)



Слика 13. Гајење пчела: а) По 10 g пчела што је приближно 103-104 пчеле. б) Кавез са пчелама, изграђеним саћем и вајлама са сирупом и водом. в) Чврста храна је давана у облику погача делимично обмотаних фолијом.

У сврху поређења хране која је замена за нектар пчелама је у вајле на врху кавеза сипано по 50 mL сахарозног (65%) или инвертног сирупа (65%), Слика 136. Инвертни сируп је добијен ензимском хидролизом сахарозног сирупа помоћу ензима инвертазе (β -D-фруктофуранозид фруктохидролаза, ЕС 3.2.1.26) пореклом из пекарског квасца *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen.

Потрошња сирупа је читавана једном недељно. После 28 дана сируп који су пчеле ускладиштиле у саћу је прикупљен. Маса и запремина прикупљеног сирупа је измерена да би се одредила густина сирупа.

3.2.3 Узимање узорака ларви и мумија кречног легла

Ларве медоносне пчеле и мумије кречног легла су сакупљене са два пчелињака у Вршцу у Србији. Један је позициониран у урбаном окружењу (45°06'35.3"N 21°18'27.0"E), а други у руралном подручју (45°08'14.9"N 21°20'04.2"E) на међусобној удаљености од око 3,7 km. Градски пчелињак је мањи са до 15 кошница, док на сеоском има више од 60 кошница са још најмање 100 кошница у непосредној близини. Градски пчелињак се сматра слободним од болести, јер болест кречног легла на њему није била уочена никада у последњих десет година, док се на сеоском пчелињаку повремено примећује ова болест. На урбаном пчелињаку узорковано је по 25 ларви из сваке од три кошнице. Са сеоског пчелињака узорковано је по 25 мумија и ларви из сваке од три кошнице које су имале умерене симптоме кречног легла и по 25 ларви из сваке од три кошнице које нису показивале никакве симптоме болести.

Мумије је било лако уочити на оквирима, али само неколико њих је било могуће уочити на подњачи или полетаљци. Узорковање је обављано у беспашном периоду, а заражене кошнице су имале знатно мање резерве меда и полена за разлику од здравих кошница. Све узорковане ларве биле су старе приближно 5 дана након излегања и изгледале су здраво. Сакупљене су из ћелија саћа које су биле најближе поклопљеном леглу, а први знаци поклапања су се могли приметити на тим ћелијама, по томе што су пчеле почеле да додају восак на ивице ћелија. Мумије су сакупљане само из оквира (не са подњаче) и само из оних ћелија које су пчеле делимично отвориле, без обзира на њихову боју.

Сакупљени узорци су обједињени, а сваки од њих је био сачињен од 75 ларви или мумија, дајући тако један збирни узорак од: (1) ларви са градског пчелињака без болести, (2) ларви из сеоских кошница без симптома болести, (3) ларви из оболелих сеоских заједница и (4) мумија из оболелих сеоских заједница.

3.2.4 Узимање и припрема узорака за карактеризацију α -глюкозидазе

У месецу фебруару (зимске пчеле), из пет различитих пчелињих заједница је са лета узето по 100 пчела излетница, одвојена су средња црева на стакленој плочи (Слика 14) и главе, па направљени збирни узорци. Узет је и узорак природног полифлоралног меда изврганог из кошница на градском пчелињаку у Вршцу, Србија, у чијој околини се налази различите врсте цветница.

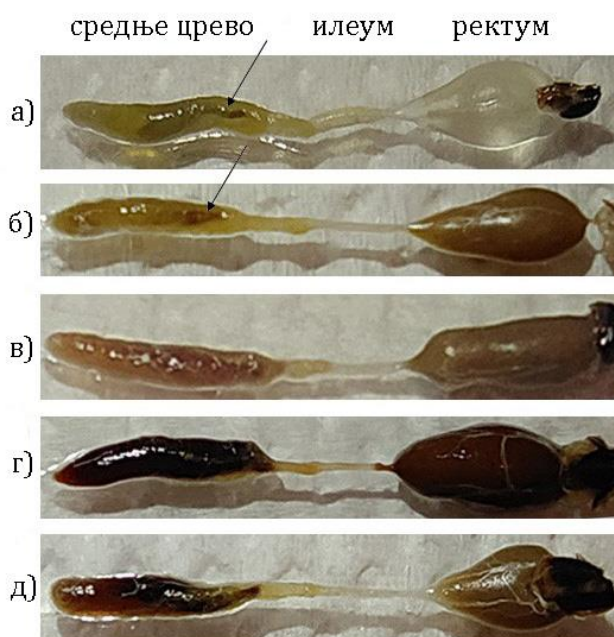
За карактеризацију α -глюкозидазе су дисековане пчеле на леду у групама од 50 пчела, претходно су пчеле имобилизоване у фрижидеру на 4 °C. После хомогенизације и екстракције из свих узорака су уклоњени молекули мањи од 10 kDa повременом заменом пуфера чиме су пречишћени, а затим и сконцентровани ултрафилтрацијом, помоћу центрикона (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, 10kDa, Merck Millipore, САД).



Слика 14. Средња и задња црева медоносних пчела. Након имобилизације пчела у фрижидеру црева су вађена заједно са жаоком (127), а затим је одвајано средње црево од ректума на средини илеума (123).

3.2.5 Припрема сировог екстракта средњег црева и глава пчела радилица

У кавезним експериментима је након 7, 14, 21 и 28 дана гајења узимано по 15 пчела из сваког кавеза, а у експериментима где су сакупљани узорци за карактеризацију α -глюкозидазе су пчеле жртвоване непосредно после сакупљања на улазу у кошницу. Пчеле су имобилизоване, па дисековане. Средња црева и главе су хомогенизоване, па екстраховане.



Слика 15. Средње и задње црево (а) 0-24h старих пчела; (б-д) 7 дана старих пчела хранених погачом (б) само са сахарозом - ШП (в) сахарозом и квасцем - КП, (г) сахарозом и поленом - ПП и (д) сахарозом и брашном од ларви великог брашнара - ТП. На слици се види (а) перитрофна мембрана и прозиран ректум и (б) перитрофна мембрана; Перитрофна мембрана је означена стрелицама;

Први видљив ефекат различитих дијета коришћених у овом истраживању се види приликом дисекције система за варење пчела, Слика 15. Боја средњег и задњег црева се мења када се користе различите хране. Код тек изведене медоносне пчеле, ректум је прозиран јер измет још није стигао до њега, Слика 15а. Перитрофна мембрана се може видети, означена стрелицама, у средини средњег црева, Слика 15а-б. Перитрофна мембрана је слабо видљива код КП, Слика 15в, а невидљива је код ПП и ТП, Слика 15г-д. Она постаје невидљива са старењем пчела у свим групама после 14 дана, резултати нису приказани.

Перитрофна мембрана преграђује лумен средњег црева (122). Прилив течности у задњем делу црева, балансиран одливом у предњем делу црева, узрокује да садржај

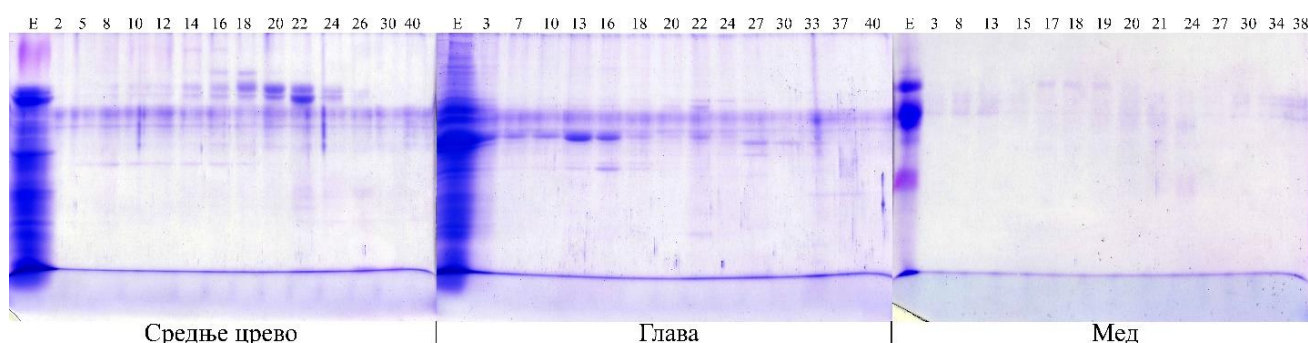
ектоперитрофног простора тече од задњег ка предњем делу, па тако супротно садржају ендoperитрофног простора. Због овога настаје супротан ток садржаја у екто- и ендoperитрофном простору услед чега се ефикасно распоређују дигестивни ензими и хранљиве супстанце унутар средњег црева (108).

Ова дефиниција је у складу са запажањем приказаним на Слици 15а-б, где се види да се честицама хране прво испуњава ендoperитрофни простор, а да затим различите честице пореклом из хране прелазе у ектоперитрофни простор.

3.2.6 Гел хроматографија

Ради раздвајања и пречишћавања пчелињих дигестивних ензима је урађена гел хроматографија. Коришћене су пчеле излетнице, којих обично има највише на улазу у кошницу, јер имају много више α -глукозидазе него младе пчеле (142) које су коришћене у кавезним експериментима. Екстракти средњег црева, главе и меда су засебно раздвајани јер се у њима налазе различити дигестивни ензими.

На колону (Sephacryl S300 HR) су наношени ултрафилтровани екстракти средњег црева, главе и меда. Укупни протеини у фракцијама након гел хроматографије су анализирани електрофоретски SDS полиакриламидном гел електрофорезом, а резултати приказани на Слици 16.



Слика 16. SDS полиакриламидна гел електрофореза сирових екстраката (Е) и одабраних фракција (означених бројевима) после гел хроматографије ултрафилтрацијом пречишћених и сконцентрованих узорка средњег црева, главе и меда.

На Слици 16 се види да највише протеина има у средњем цреву где је и највећа активност свих дигестивних ензима, док у меду има најмање протеина и најмања је ензимска активност. Највећа активност α -глукозидаза у средњем цреву и глави је у фракцијама 19-21, а у меду у фракцији 19. Овим је потврђено да се α -глукозидаза лучи у глави, а затим прелази у средње црево или је пчеле додају у мед (149).

3.3 Утицај одабраних замена на морталитет, потрошњу хране и масу радилица

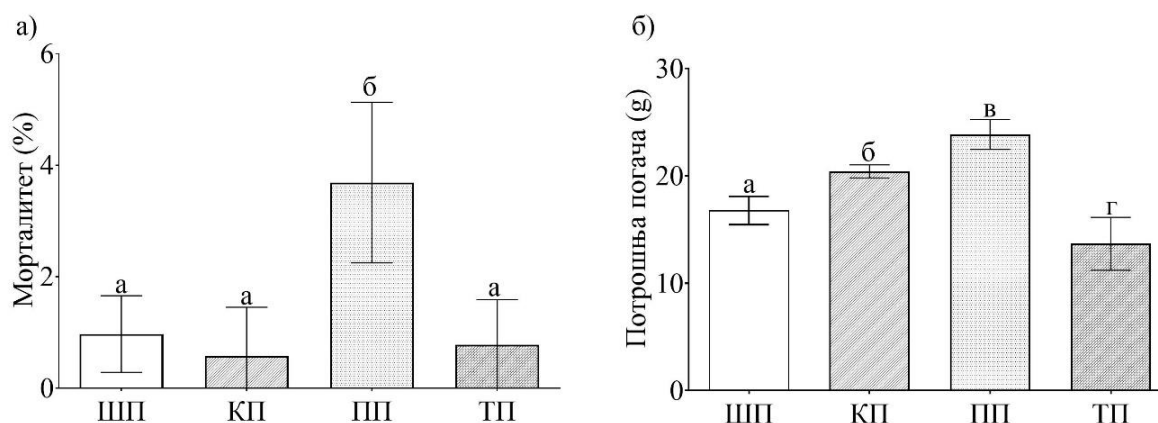
Потрошња хране и маса радилица су тесно повезане са здрављем и дужином живота појединачних пчела и пчелиње заједнице, а потрошња хране је условљена њеним квалитетом (199).

3.3.1 Утицај замена за полен на морталитет и потрошњу хране

Смртност је мерена два пута недељно, тако што су бројане мртве пчеле у кавезу, у току 4 недеље колико је трајао експеримент. Све мртве пчеле су приликом бројања уклањане из кавеза.

У сваки кавез је на почетку експеримента стављено по 40 g погаче умотане у приањајућу фолију са отвором кроз који су је пчеле узимале. Погаче су измерене поново после 28 дана када је завршен експеримент, а добијена разлика представља потрошњу хране. Резултати су анализирани (двосмерна АНОВА са Бонферијеvim post-hoc тестом) и приказани на Слици 17.

Смртност, током експеримента који је трајао 28 дана, је била ниска у свим испитиваним групама пчела. У ПП групи је смртност била већа него у другим групама, како показује Слика 17а. У кавезу III из ПП групе све пчеле, укупно 54, су угинуле неколико дана пре завршетка експеримента (овај узорак није укључен у укупне резултате и статистичке тестове, Слика 17а), што је у корелацији са опажањем да су пчеле у овом кавезу конзумирале највећу количину хране, Слика 17б. Разлике у смртности између ШП, КП и ТП нису биле статистички значајне што је потврђено двосмерном анализом варијансе АНОВА, ($p=0,0016$, $F(3,12)=9,688$) као и накнадним поређењем помоћу Бонферијевог теста ($\alpha=0,05$), док је смртност у ПП групи била статистички значајно већа у поређењу са свим осталима, Слика 17а. Ниска смртност, Слика 17а, је запажена у ТП групи, као и у групама пчела које су храњене другим заменама (ШП и КП).



Слика 17. Морталитет и потрошња погача код пчела гајених на различитим погачама током 28 дана. Свака група се састојала од пет кавеза са 103–104 пчеле. Резултати представљају збир укупне смртности (%) мерене 8 пута (двапут недељно). (а) Смртност, (б) Потрошња хране. ШП – група која се храни комерцијалном погачом од шећера; КП – група која се храни комерцијалном погачом са квасцем; ПП – група која се храни комерцијалном погачом са поленом; ТП – група која се храни комерцијалном погачом са брашном од ларви великог брашнара. Сваки стубић је средња вредност $\pm$ СД (стандардна девијација) за пчеле из пет кавеза које су се храниле истим погачама. Средње вредности обележене истим словом изнад стубића нису значајно различите према двосмерној АНОВИ са Бонферијеvim post-hoc тестом ($p < 0,05$).

Релативно слична смртности у ТП, КП и ШП групи подржава претпоставку да брашно од ларви великог брашнара може служити као замена за полен и омогућава да се упореди утицај исхране брашном од ларви великог брашнара на развој младих адултих пчела. Забележена ниска смртност у ТП групи је први показатељ да је ово добра храна за пчеле и да не садржи компоненте које могу узроковати угинуће пчела. Истовремено, ниска смртност указује на то да ова храна садржи компоненте које испуњавају нутритивне потребе пчела. Дужина живота пчела из ПП групе је највероватније скраћена услед заточеништва (немогућности излетања на прочисни лет), високе влажности и велике количине поједене хране која је у себи садржала много несварљивих честица (нпр. опне поленових зрна).

Пчеле из групе која је храњена са КП (широко коришћена замена за полен) су почеле да дефецирају 14. дана експеримента, када је збирна маса средњег и задњег црева

(МЦ) достигла 45,67% укупне масе пчеле (МП), Слика 19 а-б. Ово је у сагласности с тврдњом да општа дефекација не почиње док нагомилавање измета у цревима не достигне око 45% укупне масе пчеле (200).

С друге стране, пчеле храњене ПП нису почеле с дефекацијом унутар кавеза, чак и када је МЦ достигла 47,25% од МП, али је смртност била значајно већа у поређењу са другим групама, а све пчеле (преко 50 пчела) у кавезу у коме су пчеле потрошиле 26,0 g хране, више него пчеле у било ком другом кавезу, угинуле су неколико дана пре краја експеримента.

Медоносне пчеле из свих пет кавеза које су се храниле ПП су храњене истоветним погачама, али овако висока смртност је била забележена само у једном кавезу. Њихов састав био је исти (Табела 1). Ово указује на то да хемијски састав погача није био узрок високе смртности.

Конзумација аутоклавираног полена довела је слабијег узимања хране и различите микробиоте у цревима у поређењу са поленом ускладиштену у саћу, али то није изазвало повишену смртност медоносних пчела (118). Овај експеримент не може сам објаснити високу смртност у овом кавезу из ПП групе, али то и није у средишту пажње овог истраживања. Ипак из других истраживања можемо претпоставити који су могући узроци овако велике смртности. Нагомилавање измета је један од узрока смрти пчела изложених високим вредностима релативне влажности, пре свега због њихове неспособности да се хране (201). Пчеле у кавезу живе дуже на сахарози него на полену, а повишена смртност услед конзумације аминокиселина или протеина је добро позната (195, 202). С друге стране, медоносне пчеле су живе дуже на полену него на сахарози када су могле да излећу из кавеза у којим су гајене у простор предвиђен за прочисни лет (59). Релативно ниска смртност у ТП групи, иако је брашно од великог брашна богато протеинима, показује да је за повишену смртност пчела када нема могућности за прочисни лет важан не само састав хране него и количина унете хране, јер су пчеле из ТП групе унеле знатно мање хране од пчела из ПП групе.

Смртност у ПП групи би вероватно била много нижа када би пчелама било омогућено да излећу на прочисни лет. Међутим, када је пчелама омогућено да слободно лете, немогуће је контролисати састав њихове исхране.

Разлика између масе погача на почетку и крају експеримента израчуната је и представљена као просечна количина конзумиране хране по кавезу, Слика 17b. Потрошња воде је такође бележена, али није било значајних разлика између група, па резултати нису приказани. Пчеле нису дефецирале унутар кавеза, осим оних из КП групе. Оне су почеле дефецирати приликом узимања узорака четрнаестог дана, а ускоро након тога и унутар кавеза, иако су унеле значајно мање хране у поређењу са ПП групом, Слика 17b.

Током периода од 28 дана, пчеле из ТП групе су конзумирале најмање хране (13,7 g/кавез), ШП (16,8 g /кавез), КП (20,4 g/кавез), а ПП највише (23,9 g/кавез). Пчеле из КП и ПП групе су конзумирале више хране у поређењу са пчелама из ШП групе. Двосмерна АНОВА потврдила је да постоје значајне разлике у потрошњи хране између различито храњених група медоносних пчела ($p < 0,0001$, $F(3, 12) = 41.26$), Слика 17b.

Ово је делом вероватно због тога што се у различитим погачама налазе различити нутријенти, али истовремено може значити да пчеле не могу искористити неке супстанце из хране. Пчеле из ШП групе имају најмању масу тела и делова тела у односу на остале групе. То је било очекивано, јер ове пчеле нису имале неопходне протеине и липиде у храни. Пчеле из ПП групе су искористиле највише хране што је било очекивано због фагостимуланаса природно присутних у полену (203).

Могуће је и да пчеле из ТП групе уносе мању количину хране због тога што су ларве великог брашна веома богате хранљивим супстанцијама (204), па пчеле могу да сваре и апсорбују довољно храњивих супстанци из мање количине хране. Забележено је

да пчеле једу већу количину мање хранљивог полена од кукуруза, него полифлоралног полена веће хранљиве вредности (199), а да при томе одгајају мању количину легла, него оне које се хране полифлорним поленом. Замена за полен базиране на соји, пивском квасцу и протеинима из млека садрже есенцијалне аминокиселине. Међутим овакве замене нису увек привлачне пчелама, па фагостимуланси морају бити додати (154). Разлике у хранљивој вредности хране, а могуће и у сварљивости и усвојивости хранљивих супстанци утиче на количину легла које пчеле могу да одгаје, чак и када је количина поједене хране слична (205).

Чињеница да пчеле из ТП групе једу мање хране неко оне из КП и ПП група, при чему одржавају сличну масу показује да је брашно од великог брашнара веома хранљиво, али је потребно да се његова привлачност пчелама тестира на терену. Иако су добијени резултати обећавајући, они треба да буду подржани истраживањима у условима када нема доступног полена у домаћају пчелињих заједница. На тај начин би се утврдило да ли је оваква храна привлачна пчелама и да ли може да обезбеди пчелама све што је неопходно за одгајивање легла.

3.3.2 Утицај замена за полен на промену масе пчела

Да би пратили промену масе пчела мерили смо посебно масу пчела без црева, главени део (*caput*), грудни део, торакс (*thorax*), трбушни део (*abdomen*) и масу црева. Резултати су приказани на Слици 18. Маса средњег и задњег црева се разликовала у зависности од погаче којом су пчеле храњене што је приказано на Слици 19.

Радилице из ШП су имале значајно мању масу тела и масу сегмената тела у поређењу са другим групама, уз стално смањење масе (Слика 18). Пчеле из свих осталих група такође су губиле масу током времена, али не тако брзо и конзистентно. Разлике у маси пчела без црева између различито храњених група пчела исте старости су статистички значајне према двосмерној АНОВИ са Бонферонијевим post-hoc тестом ($P < 0,0001$, $F(3, 16) = 82, 15$).

Целе пчеле и абдомен су мерени без црева, јер се у њима несварена храна акумулира у различитим количинама, у зависности од различите исхране (118). Маса главе је била највеће у КП групи, док су масе главе у ПП и ТП групама биле сличне сваког дана испитивања, што је статистички потврђено (двосмерна АНОВА уз накнадно поређење са Бонферонијевим post-hoc тестом). Статистички значајне разлике у маси главе су примећене између различито храњених група према двосмерној АНОВИ са Бонферонијевим post-hoc тестом ($P < 0,0001$, $F(3, 16) = 80, 04$), Слика 18b.

Статистички значајне разлике примећене су у масама торакса између различито одгајаних медоносних пчела према двосмерној АНОВИ са Бонферонијевим post-hoc тестом ($P < 0,0001$, $F(3, 16) = 30,23$). Маса торакса код пчела из ТП групе су биле сличне оним у групама ПП и ШП, Слика 18ц. Промене у маси торакса током времена забележене су код КП где је маса била већа него у другим групама до дана 14 (када достиже максимум), да би затим значајно опала. После 28 дана је била значајно нижа него код ПП и ТП. Смањење масе торакса је у корелацији са почетком дефекације у КП групи.

Смањење масе абдомена од дана 7 до дана 28 је било најизраженије у поређењу са главом и тораксом (Слика 18д). Двосмерна АНОВА са Бонферонијевим post-hoc тестом ($p < 0,0001$, $F(3, 16) = 39,98$) је потврдила разлике између група медоносних пчела. После 7 и 14 дана није било статистичких разлика између група (двосмерна АНОВА уз накнадно поређење са Бонферонијевим post-hoc тестом). Маса абдомена пчела из ТП групе је била статистички значајно већа после 21 и 28 дана у поређењу са другим групама, Слика 18д.

Повећања масе главе пчела је у корелацији са развојем главених жлезда, што претходи развоју легла у пчелињој заједници (202). Повећање масе торакса је у корелацији са порастом масе летне мускулатуре, што је значајно јер омогућава заједници

да успешније сакупља храну (202). Забележено повећање масе торакса код КП корелира са највећом масом црева забележеној у овој групи, а маса црева и торакса опадају са почетком дефекације.

Ово може указивати да су значајно веће масе торакса и главе делом узроковане високим садржајем воде, који се смањује када пчеле почну да дефецирају унутар кавеза чиме уклањају вишак воде (и несварених честица) из тела.

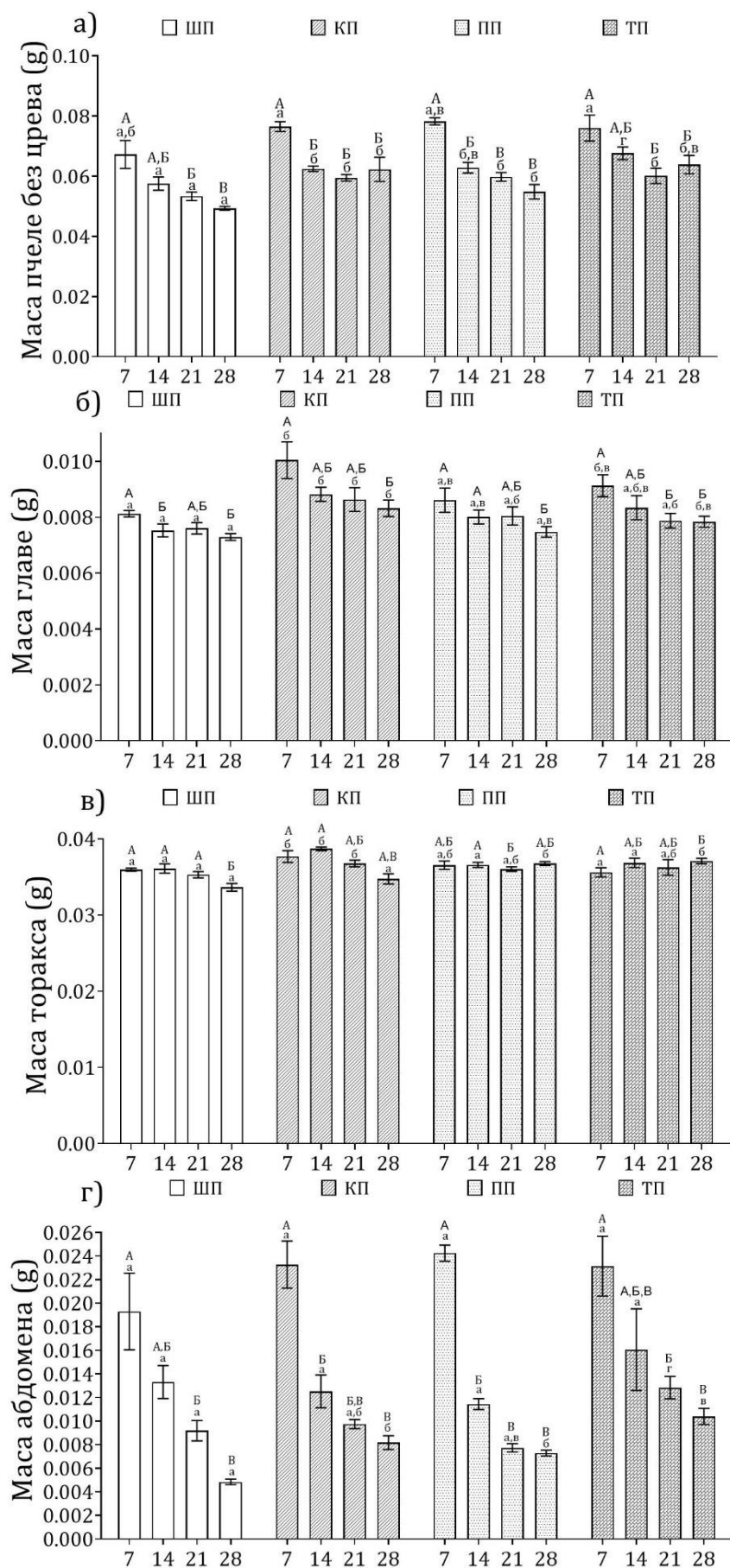
Варијација у маси летне мускулатуре не мора бити једини разлог за варијацију у маси торакса. Претерано нагомилавање воде у ректуму услед осмозе вероватно увећава целокупну масу тела, јер квасац има много несварљивих молекула. Истовремено, влажност ваздуха од 80% чини испаравање воде из трахеалног система неефикасним, што би могло повећати масу пчеле (206).

Пчеле из ТП групе су имале масу главе сличну као и пчеле из ПП групе. Када се пчеле хране поленом то доводи до развоја хипофарингеалних жлезда и масног ткива, као и до веће очекиване дужине живота. Дужина живота пчела је у највећој мери одређена количином поједеног полена и одгајеног легла (36). Свежа маса главе је у корелацији са величином ХФЖ (207), док свежа и сува маса торакса показују колико су развијени мишићи за летење (208). Из овога се може закључити да исхрана пчела овом новом врстом хране (базираној на ларвама инсеката) задовољава неопходне услове за развој хипофарингеалних жлезда и масног ткива.

Маса радилица временом опада, када пчеле прелазе са кућних на излетничке послове (209) што је показано и у овом експерименту, где су пчеле имале највећу масу у 7. дану, после чега је она почела да опада. Пчеле из ТП групе су искористиле мање хране, чак и у поређењу са ШП групом.

Упркос томе радилице из ТП групе су имале масу која је слична са ПП и КП групом, а маса њиховог абдомена је била чак и већа у односу на остале групе, Слика 18г. Није било значајне разлике у маси главе и торакса између ПП и ТП група, док је та разлика била значајна у поређењу са КП и ШП групама у највећем броју случајева.

Ово указује на то да пчеле могу успешно да користе брашно направљено од ларви великог брашнара и да је оно за њих богат извор есенцијалних хранљивих супстанци.



Слика 18. Маса пчела одгајених на различитим погачама. Маса тела без црева (а), маса главе (б), маса торакса (в) и маса абдомена (г) прерачуната по пчели. ШП - група која се храни комерцијалном погачом од шећера; КП - група која се храни погачом са квасцем; ПП - група која се храни погачом са поленом; ТП - група која се храни погачом са брашном од великог брашнара. Сваки стубић представља средњу вредност пет независних мерења $\pm$ СД. Средње вредности означене истим великим словом нису статистички значајно различите када се поређење обавља унутар исто храњене групе на различите дане. Средње вредности означене истим малим словом нису статистички значајно различите између различито храњених група на исти дан. За оба поређења је коришћена је двосмерна АНОВА уз накнадно поређење Бонферијевијем тестом ($\alpha=0,05$).

3.3.3 Утицај замена за полен на промену масе црева

Маса средњег и задњег црева медоносних пчела које су гајене на четири различите погаче током 28 дана, узорковане и дисековане једном недељно, је прерачуната по пчели и приказана на Слици 19.

Није било статистички значајне разлике у маси средњег црева унутар група пчела храњених ШП, КП и ТП у различитим данима, према тесту двосмерна АНОВА и накнадном Бонферонијевом тесту ($\alpha = 0,05$), што указује да су се пчеле у овим групама равномерно храниле уносећи приближно једнаку количину хране у јединици времена, Слика 19а. Код пчела храњених погачом са поленом (ПП) маса средњег црева је значајно опала између 7. и 21. дана, а била је најнижа и слична у данима 21 и 28, означено великим словима на Слици 19а, што указује на то да су пчеле постепено смањивале унос хране током трајања експеримента.

Статистичка анализа показује значајне разлике између маса средњег црева различито храњених пчела према тесту двосмерна АНОВА уз накнадно поређење са Бонферонијевим post-hoc тестом ($F(3, 16) = 89,73$, $P < 0,0001$). У свим данима, осим у 28. дану, је маса средњег црева у ТП групи била значајно већа од оне у ШП групи пчела. Значајна разлика је примећена у односу на КП групу у данима 7, 14 и 21, а у поређењу са ПП групом у дану 21 када су пчеле из ПП групе вероватно значајно смањиле унос хране, означено малим словима изнад стубића, Слика 19а.

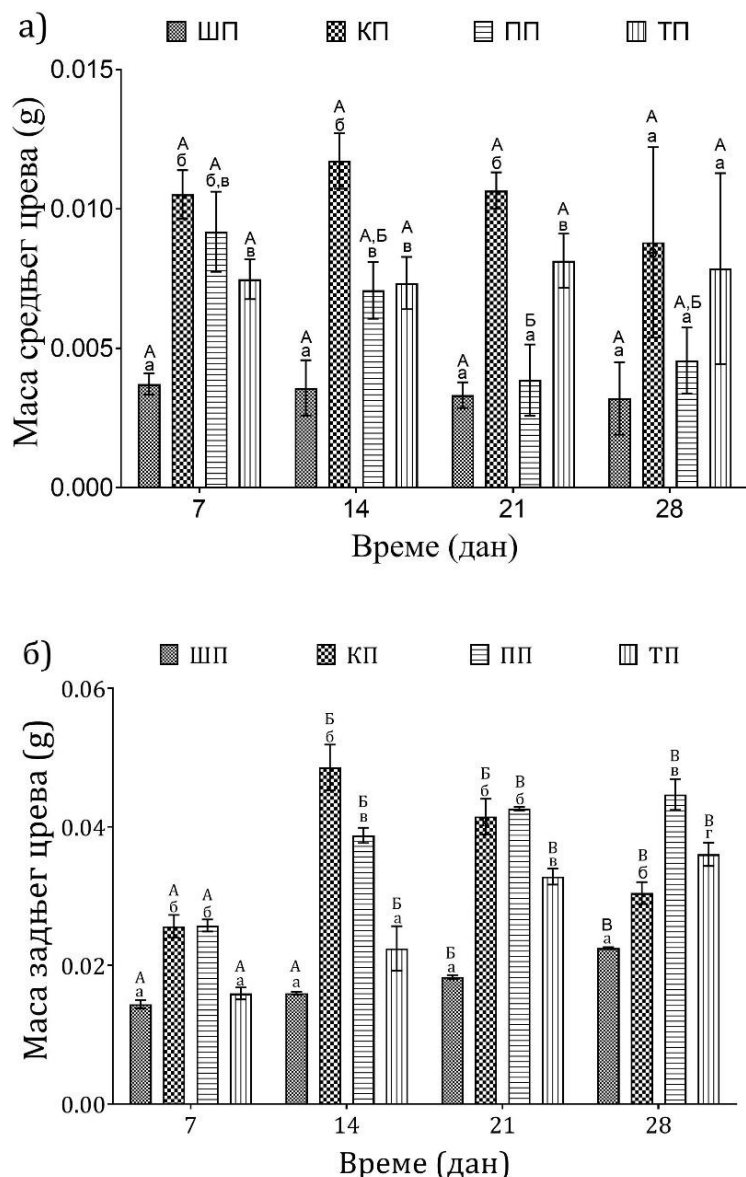
Масе задњег црева пчела су расле у свим групама, осим у групи храњеној са КП где су пчеле почеле да дефецирају унутар кавеза након 14 дана, што је водило смањењу масе задњег црева, а није било статистички значајне разлике између 14. и 21. дана. Маса задњег црева је била статистички значајно различита унутар истих група у различитим данима према тесту двосмерна АНОВА и накнадном Бонферонијевом тесту ($\alpha = 0,05$). Повећање масе задњег црева није статистички значајно за ШП пчеле између дана 7 и 14, као ни за ПП и ТП пчеле између 21. и 28 дана, означено великим словима на Слици 19б.

Разлике у маси задњег црева код пчела храњених различитим погачама на исти дан гајења су биле статистички значајне према тесту двосмерна АНОВА уз накнадно поређење са Бонферонијевим post-hoc тестом ($F(3, 16) = 608,5$, $P < 0,0001$), што је означено малим словима на Слици 19б. На дан 7 и 14 није било статистички значајних разлика између ШП и ТП група у маси задњег црева, као ни између ПП и КП група на дан 7 и 21, Слика 19б.

Тек изведене пчеле захтевају протеине како би потпуно развиле своје телесне структуре, па почињу да једу полен убрзо након извођења, што резултује нагомилавањем поленових зрна у средњем цреву и ректуму (123). Први оријентациони или дефекациони летови медоносних пчела су забележени у узрасту од 6 дана (208).

Када нема прорачисних летова, маса задњег црева се повећава током времена, Слика 19б, зато што пчеле не могу успешно да искористите све протеине, масти и угљене хидрате који се налазе у храни (105). Несварени делови хране нагомилавају се у ректуму, што може да изазове дијареју (210). Садржај задњег црева/ректума се углавном састоји од измета који повећава целокупну масу тела радилица (53). Ово се види на примеру КП групе, где маса целог тела, а не само црева, почиње да се смањује после дефекације пчела унутар кавеза након 14 дана.

Пчеле из ТП групе су МЦ (укупна маса средњег и задњег црева) од 40,83% од МП (укупна маса пчеле) достигле после 28 дана, при чему нису дефецирале унутар кавеза, а то је пратила ниска смртност. Пчеле из ШП групе су достигле МЦ од само 33,90% од МП после 28 дана, што је било очекивано јер се сахароза готово потпуно претвара у енергију, CO_2 и воду, па тако и не доводи до оваквих проблема (211).



Слика 19. Утицај састава погаче на масу средњег (а) и задњег (б) црева медоносне пчеле током 28 дана. Измерена маса црева (mg) је прерачуната по пчели. ШП - група која је храњена комерцијалном шећерном погачом; КП - група која је храњена погачом са квасцем; ПП - група која је храњена погачом са поленом; ТП - група која је храњена погачом са брашном од великог брашнара (*T. molitor*). Сваки стубић представља средњу вредност пет независних мерења, на пчелама из 5 различитих кавеза, $\pm$ СД. Средње вредности означене истим великим словом нису статистички значајно различите када се поређење обавља унутар исто храњене групе на различите дане. Средње вредности означене истим малим словом нису статистички значајно различите између различито храњених група на исти дан. За оба поређења је коришћена двосмерна АНОВА уз накнадно поређење са Бонферонијевим post-hoc тестом ($\alpha = 0,05$).

Када су поредили пергу, аутоклавирани полен и само сахарозни сируп без полена, просечна маса црева је била најнижа у групи која није храњена поленом или пергом (118), што је у складу са приказаним резултатима у овом истраживању.

Вентрикулус (средње црево) и ректум пчела у кавезима, када не постоји могућност прочисног лета, су густо испуњени несвареним остацима полена, водом и фецесом (212), а њихова маса се мења током времена у овом експерименту. Измерени опсези масе црева су у складу са раније описаним подацима (213).

Маса задњег црева константно расте у свим испитиваним групама, осим у КП групи где почиње да опада после 14. дана, у време када је примећено да пчеле почињу да дефецирају унутар кавеза.

С друге стране, маса средњег црева је била прилично уједначена, без значајних разлика, у свим групама пчела током гајења, осим у ПП где је примећен пад од 7. до 21. дана, вероватно у корелацији са квалитетом и потрошњом хране. Маса средњег црева у ШП групи је била најнижа до 21. дана када је била слична ПП групи у којој су пчеле смањиле унос хране, вероватно због тога што су шећерне погаче састављена од брзо

апсорбујуће сахарозе, фруктозе, глукозе и воде које не могу да повећају запремину средњег црева као друге тестиране погаче. У 28. дану није било статистички значајне разлике у маси средњег црева између различитих група, вероватно због тога јер су тада биле највеће разлике у маси средњег црева унутар истих група, тј. највеће СД у групама КП и ПП, Слика 19а.

Неке погаче (КП, ПП и ТП) садрже велике молекуле којима је потребно више времена за варење (пектин, скроб) или су неварљиви (спорополенин, хитин). Сахароза се разлаже помоћу α -глукозидазе на фруктозу и глукозу, које се брзо апсорбују у предњем делу средњег црева (211). Пчеле смањују унос хране као одговор на одсуство услова за прочисни лет, што може довести до смрти (201). Ово је подржано претходним запажањем да су пчеле у кавезу које су конзумирале више хране од осталих пчела (ПП), угинуле неколико дана пре краја експеримента.

Гајене медоносне пчеле се суочавају са озбиљном претњом од неухрањености која се погоршава интензивирањем пољопривреде и климатским променама. Употреба вештачких дијета од стране пчелара је у порасту, тако да постоји све већа потреба за ефикасном и одрживом храном која може подржати исхрану пчела у различитим сезонама (151). Ово је посебно изазовно када пчелари треба да повећају величину заједнице у лошим временским условима, када нема могућности за прочисни лет, пре ране пролећне паше или услуга опрашивања (нпр. опрашивање бадема). У таквим условима, пчеле морају бити храњене протеинима и липидима, али несварене честице се брзо акумулирају у задњем цреву. Опадање масе средњег црева у ПП групи пчела указује на то да пчеле које не могу да изађу на прочисни лет у неком тренутку смањују унос хране или престају са храњењем, јер маса задњег црева константно расте, а то зависи од квалитета хране и дужине периода у коме пчеле не могу да излећу из кошнице.

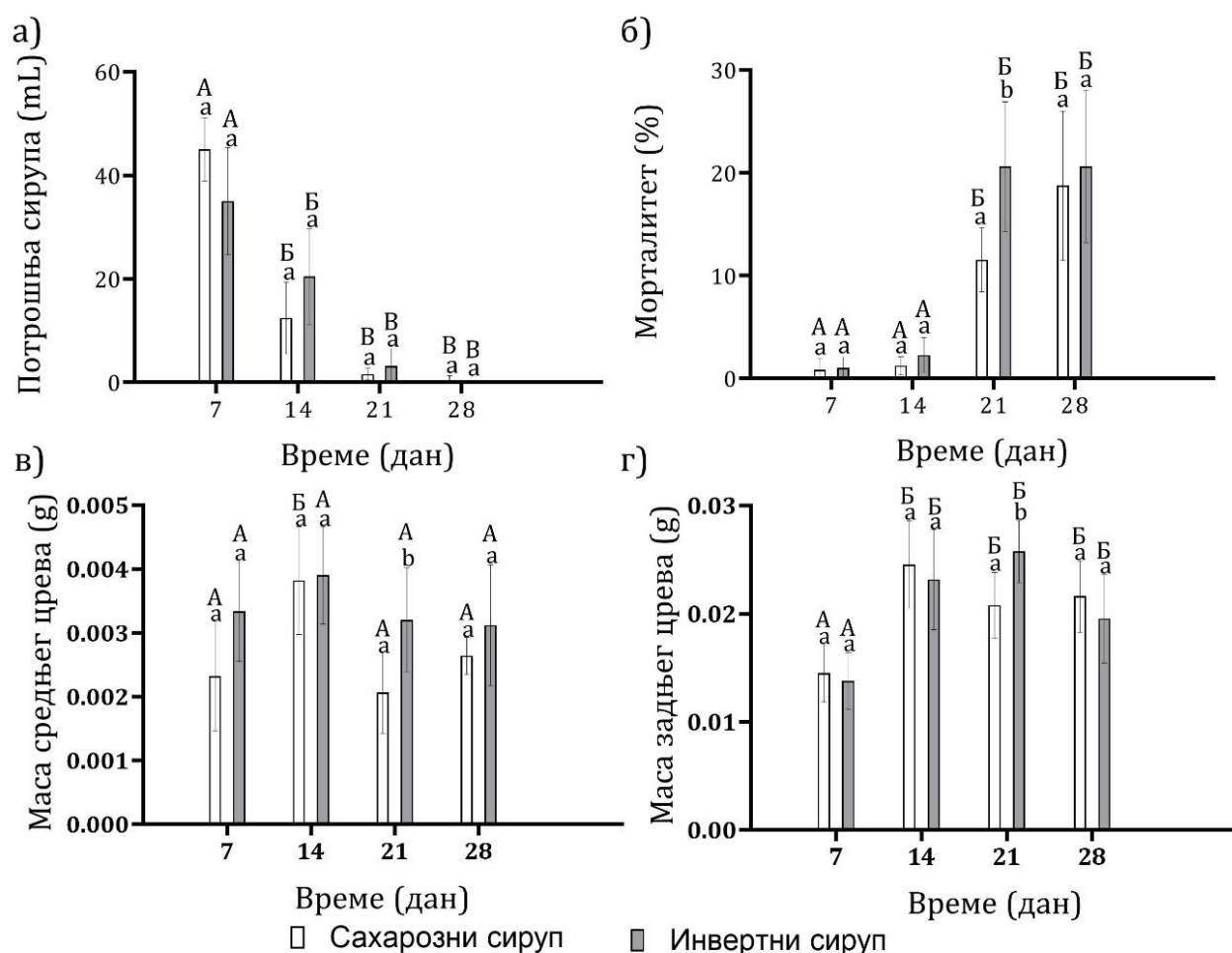
Праћење масе средњег и задњег црева различито храњених пчела указује на то да квалитет хране може бити од виталног значаја за успешно презимљавање. Пчелари хране своје пчелиње заједнице заменама за полен како би ублажили недостатак природних извора полена у окружењу (57). Током зиме или када нема могућности за прочисни лет, маса задњег црева се повећава у зависности од потрошње и састава хране.

Истовремено, маса средњег црева може расти услед уноса хране или опадати услед варења и апсорпције хранљивих супстанци. Пчеле које су конзумирале погаче са брашном од великог брашнара задржавају већу масу абдомена, где се налази највећа количина резервног масног ткива (87), од пчела које једу погаче са поленом или квасцем, а истовремено не смањују унос хране као када се пчеле хране поленом, нити дефецирају унутар кавеза као пчеле које се хране квасцем.

3.3.4 Утицај замена за нектар на потрошњу сирупа, морталитет и масу пчела

Приликом испитивања замена за нектар у исхрани пчела, није било статистички значајне разлике у потрошњи сирупа између две различито храњене групе пчела (Слика 20а), али се потрошња сирупа у обе групе брзо смањује.

Оштар пораст смртности у ИС (пчеле храњене инвертним сирупом) и СС (пчеле храњене сахарозним сирупом) групама забележен је у трећој недељи од почетка експеримента (означено великим словима изнад стубића). У дану 21 морталитет (Слика 20б) је био значајно већи у ИС него у СС групи (означено малим словима изнад стубића) и у корелацији је са већим масама средњих (Слика 20в) и задњих (Слика 20г) црева у ИС групи у односу на СС групу у дану 21.



Слика 20. Потрошња сирупа (а) и морталитет (б) су приказани по кавезу; маса средњег црева (в) и маса задњег црева (г) су прерачунати по пчели, после гајења 7, 14, 21 и 28 дана. Сваки стубић приказује средњу вредност 5 независних мерења $\pm$ СД. Средње вредности означене истим малим словом нису статистички значајне према тесту АНОВА и Бонферијевом тесту вишеструког поређења ($p < 0,05$) између група храњених различитим сирупом на исти дан. Статистички значајне разлике, према истом тесту, унутар исте групе када се пореде различити дани су означене великим словима.

Већа маса средњег и задњег црева у ИС групи у поређењу на СС групом (Слика 20 в,г) у 21. дану, која је у корелацији са већим морталитетом у ИС групи у поређењу на СС групом (Слика 20 б) указује на то да је морталитет повезан са повећаном масом црева. Пчеле теже уклањају вишак воде из ИС него из СС исте густине (Табела 2), јер је густина прерађеног СС 1,35 g/mL, а густина прерађеног ИС 1,27 g/mL. Висок морталитет пчела се у обе групе појављује у трећој недељи, али је већи у ИС групи, а тада се истовремено смањује потрошња сирупа у обе групе, што је још један показатељ да је смртност повезана са потрошњом хране и нагомилавањем воде, несварених честица и производа метаболизма у пчелињим цревима.

Ово је у складу са резултатима експеримента где смо хранили пчеле заменама за полен и где смо показали да је највећа смртност пчела у ПП групи (поглавље 3.3.1). Ова група пчела је у тренутку када је у њој нагло почела да се повећава смртност имала највећу масу црева у односу на остале групе, услед немогућности пчела да излећу на прочисни лет.

Тврдња да релативна влажност од 80% доводи до неефикасног испаравања воде из трахеалног система, што доводи до пораста масе пчеле (206) је у складу са овде приказаним резултатима. Акумулација фецеса у цревима је узрок смрти пчела које су

изложене високој влажности, а то је углавном последица немогућности пчела да даље узимају храну (201).

Није било статистички значајне разлике у маси пчела, пчела без црева, торакса и глава између две различито храњене групе (ИС и СС) на исти дан; резултати нису приказани.

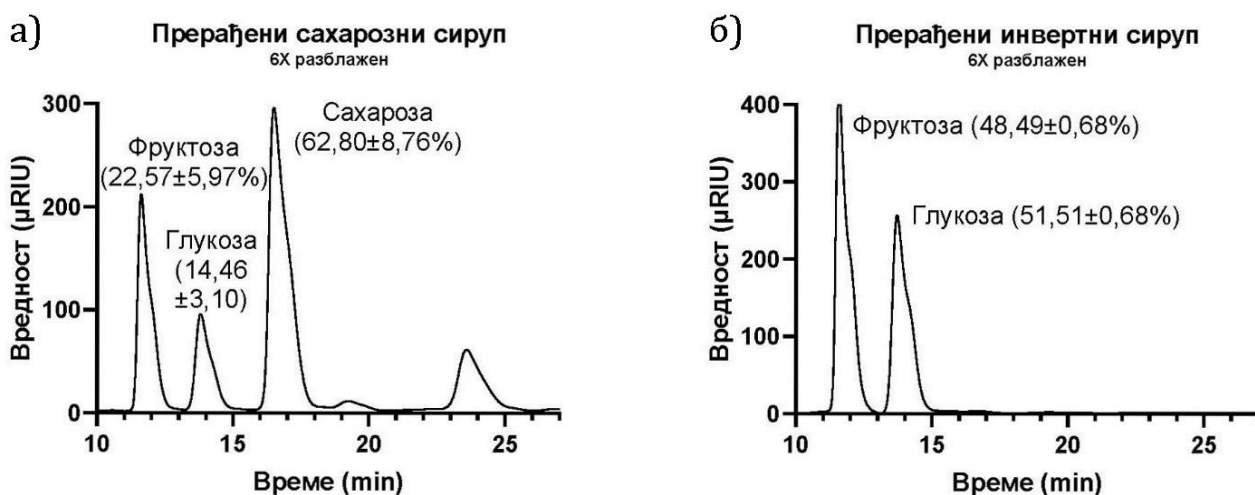
3.4. Утицај састава шећерног сирупа на његову прераду

Састав шећерног сирупа може да игра значајну улогу у његовој преради од стране пчела. Различите концентрације шећера у сирупу, као што су сахароза, глукоза и фруктоза, могу утицати на начин на који га пчеле узимају и прерађују. Резултати указују на то да су осмотски притисак и склоност ка кристализацији кључни фактори који утичу на прераду сирупа од стране пчела.

3.4.1 Утицај врсте шећера у замени за нектар на прераду сирупа

Састав шећерног сирупа, сахарозног (СС) и инвертног (ИС), је анализиран HPLC хроматографијом пре него што су га пчеле прерадиле и након што су га пчеле прерадиле у сахарозни (СМ) и инвертни мед (ИМ), који је прикупљен из саћа у кавезима. Једини шећер присутан у СС којим су храњене пчеле је сахароза (100%), док је у ИС којим су храњене пчеле било присутно 51,43% глукозе и 48,57% фруктозе. HPLC хроматограм, након што су пчеле прерадиле сируп, показује да је сахароза делимично хидролизована до глукозе и фруктозе у групи храњеној СС (Слика 21а). У групи храњеној ИС састав шећера је остао исти пре и после прераде од стране пчела (Слика 21б).

Резултати HPLC анализе показују да сахарозни мед (СМ), сакупљен из саћа у кавезима где су пчеле храњене сахарозним сирупом (СС), садржи променљиву количину сахарозе у опсегу од 52,27% до 72,72%. Однос глукозе и фруктозе, када се занемари променљива количина сахарозе, је $39,16 \pm 2,99$ % према $60,84 \pm 2,99$ % (средња вредност $\pm$ СД) (Слика 21а).



Слика 21. HPLC хроматограм који приказује састав: а) сахарозног меда (СМ) који су пчеле направиле тако што су прерадиле сахарозни сируп и г) инвертног меда (ИМ) који су пчеле направиле тако што су прерадиле инвертни сируп. СМ и ИМ су сакупљени из саћа након 28 дана; Проценат (%) сахарозе, фруктозе и глукозе $\pm$ СД је приказан у заградама, за прикупљене узорке СМ и ИМ из 5 различитих кавеза.

Инвертни сируп (ИС) који је направљен помоћу инвертазе из квасца је садржао глукозу и фруктозу у односу 51.43% према 48.57%, а када су га пчеле прерадиле просечан

однос глюкозе и фруктозе је остао готово непромењен ($51,51 \pm 0,68\%$: $48,49 \pm 0,68\%$) (Слика 216). Ово је у складу са резултатима које су добили Хангерфорд и сар., 2021, који тврде да храњење аустралијских безжаочних пчела (*Tetragonula carbonaria* Smith) раствором глюкозе и фруктозе у односу 1:1 није резултирало производњом трехалулозе и ерлозе, као када су ове пчеле хранили раствором сахарозе (214).

Када пчеле прерађују нектар или сахарозу оне користе своју инвертазу (α -глюкозидазу) која због трансглюкозидације производи више фруктозе него глюкозе. У првој фази хидролизе сахарозе α -глюкозидаза производи глюкозу и фруктозу у односу 2:3 и велику количину неког трисахарида. Може се претпоставити да производња трисахарида у првој фази смањује осмотски притисак у нектару, што омогућава пчелама да лакше уклоне вишак воде из нектара. У другој фази, када је вишак воде углавном уклоњен долази до разлагања трисахарида секундарном хидролизом и хидролизом, Слика 11 (48). На овај начин се повећава осмотски притисак, па се тако поспешују и антибактеријска својства меда.

За разлику од пчела које су храњене инвертним сирупом (ИС), код пчела које су храњене сахарозним сирупом (СС) су примећени кристали шећера у саћу. Ово је било очекивано јер смо ми користили младе пчеле, а познато је да старије радилице производе много више α -глюкозидазе у поређењу са младим пчелама (142). Тако да ове младе пчеле нису успеле да излуче довољно α -глюкозидазе да би хидролизовале сву сахарозу из сирупа који су ускладиштили у ћелије саћа. Осим тога ове младе пчеле су биле ограничене на исхрану која су сачињавали само угљени хидрати, па су оне биле принуђене да производе ензиме из својих телесних резерви.

Мед богат глюкозом, који има високу вредност глюкозе у односу на фруктозу ће брже кристалисати, нпр. мед од репице или сунцокрета. Мед који има низак однос глюкозе/фруктозе (садржи мање од 30% глюкозе) кристалише веома споро и може остати течан неколико година без икаквог посебног третмана, нпр. багремов мед (215). Висок ниво глюкозе је узроковао кристализацију сирупа због чега су пчеле угинуле од глади (216). У зависности од односа фруктозе/глюкозе варира брзина кристализације, узорци код којих је однос фруктозе/глюкозе 1,58 нису склони кристализацији, док они код којих је овај однос мањи од 1,11 кристалишу брзо (217).

Присуство нових шећера у сахарозном меду, у групи храњеној сирупом од сахарозе (Слика 21а), може бити последица трансглюкозидазне активности α -глюкозидазе из ХФЖ у пчелињој глави. Трансглюкозидационо дејство пчелиње α -глюкозидазе на сахарозу је испитивано при чему је установљено да је главни производ шећер ерлоза (218).

3.4.2 Утицај замена за нектар на уклањање воде из сирупа

Испитивано је да ли састав сирупа којим се пчеле хране утиче на способност пчела да уклоне вишак воде из њега. Густина сахарозног (65%) и инвертног (65%) сирупа којим су храњене пчеле су биле сличне, 1,23 g/mL и 1,24 g/mL респективно. Након 28 дана, прерађени сируп који је извађен из саћа је имао већу густину у обе групе, али је у просеку она била много већа у групи која се хранила сахарозним сирупом (1,35 g/mL) у поређењу са групом која се хранила инвертним сирупом (1,28 g/mL) (Табела 2).

За уклањање вишка воде из нектара је потребна велика количина енергије (44). То је значајан део посла који обављају пчеле унутар кошнице, чак и у најповољнијим условима (219). Наши резултати показују да је густина сахарозног меда (СМ) који су пчеле направиле тако што су прерадиле сахарозни сируп много већа од густине инвертног меда (ИМ) који су пчеле направиле тако што су прерадиле инвертни сируп (Табела 2). Ово показује да је медоносним пчелама у овом експерименту било много

захтевније да уклоне воду из ИС него из СС исте концентрације. Вода је неопходна да би се хидролизовала сахароза, што значи да је потребно да испари мање воде када се пчеле хране СС, јер се при хидролизи сваког мола сахарозе троши један мол воде. Насупрот томе при исхрани пчела ИС сав вишак воде је потребно уклонити. Ово вероватно доприноси већој густини СМ у односу на ИМ.

Инвертни шећерни сируп, који се састоји од еквимоларне мешавине глукозе и фруктозе, има већи осмотски притисак у поређењу са сахарозним сирупом исте концентрације. Хидролизом се сахароза преводи у два мања молекула, чиме се повећава укупан број честица растворених у раствору, што повећава осмотски притисак, што значи и да је инвертни сируп хигроскопнији у односу на сахарозни. Због овога ИС лакше апсорбује воду из ваздуха него СС, што пчелама додатно отежава прераду сирупа.

Табела 2. Маса (g), запремина (mL) и густина сирупа (g/mL) ускладиштеног у саћу који су пчеле произвеле прерадом сахарозног (65%, 1,23 g/mL) или инвертног (65%, 1,24 g/mL) сирупа.

	Кавез	Маса сирупа (g)	Запремина сирупа (mL)	Густина сирупа (g/mL)
Сахарозни сируп	1	12.26	9.00	1.36
	2	20.81	15.50	1.34
	3	17.25	12.50	1.38
	4	17.32	13.00	1.33
	5	18.21	13.50	1.35
Средња вредност $\pm$ СД				1.35 $\pm$ 0.019
Инвертни сируп	6	13.35	10.50	1.27
	7	13.37	10.50	1.27
	8	19.04	15.00	1.27
	9	16.03	12.50	1.28
	10	21.19	16.50	1.28
Средња вредност $\pm$ СД				1.27 $\pm$ 0.005

Ово разматрање се односи на ситуацију када се пореде сирупи исте концентрације. Међутим ИС може бити направљен тако концентрован да пчеле уопште не треба да уклањају воду, за разлику од СС. Веома густ ИС не кристалише као СС, због чега је погоднији, јер је у пчеларству кристализација сирупа нежељена и може да доведе до тога да пчеле угину од глади (216). Ово је вероватно највећа предност коришћења ИС, може да садржи много мање воде (мало као мед), за разлику од СС. Храњење пчела са густим ИС, исте густине као мед, може да сачува пчеле од тешког рада на уклањању воде из сирупа и захтева мање енергије у поређењу са храњењем пчела разблаженијим сирупом, било да је то сахарозни или инвертни сируп. Поред тога важно је нагласити да инвертни сируп не може да кристалише у саћу, па се изграђени оквири могу директно пунити густим инвертним сирупом, а затим додавати пчелињим заједницама које немају довољне резерве хране.

3.5 Утицај одабраних замена за полен и нектар на профил дигестивних ензима

Замене за полен и нектар, које се често користе у пчеларству, могу значајно утицати на профил дигестивних ензима пчела. Истраживање утицаја различитих замена за полен и нектар на активности дигестивних ензима, омогућава нам да боље разумемо како ове замене утичу на варење и здравље пчелињих заједница.

У овом раду је изнета претпоставка да храна која индукује сличне ензимске профиле амилаза и протеаза у средњем цреву, као код пчела које се хране полифлоралним поленом, препознатим као најбоља храна за медоносне пчеле, има бољу нутритивну вредност од хране која индукује потпуно различите ензимске профиле.

3.5.1 Утицај замена за полен на профил дигестивних ензима

Полен игра кључну улогу у исхрани пчела, обезбеђујући им неопходне протеине и масти. Иако су бројне замене за полен истражене и коришћене у пчеларству, до сада не постоји одговарајућа замена која може у потпуности задовољити потребе пчела. Због тога је овде предложена нова замена за полен – брашно од великог брашнара, са циљем да се испита његов утицај на профил пчелињих амилаза и протеаза.

Разноврсност у исхрани међу пчелињим заједницама може бити препрека при постављању експеримената и тумачењу резултата везаних за активност дигестивних ензима. Разлика међу пчелињим заједницама, у количинама сакупљеног меда и полена, често је висока (220, 221), што утиче на исхрану ларви и има далекосежне последице на физиологију и понашање различито одгајаних радилица (25).

У овом експерименту, то је избегнуто коришћењем радилица из једне заједнице са слободно спареном матицом у подручју са веома великом густином кошница. На овај начин је очувана генетичка разноврсност, као важан предуслов за биолошку репликацију студије. Због спаривања матица са великим бројем трутова, насумични парови радилица унутар исте пчелиње заједнице деле између 25% и 75% свог генома (222). Матике се обично паре са приближно 12–20 трутова (223) у такозваним подручјима окупљања трутова (енг. „*drone congregation area*“), где трутови могу да потичу из 240 различитих заједница (224).

Много чинилаца утиче на активност ензима у теренским студијама. Због немогућности контролисања исхране пчела које слободно комуницирају са околином, овде су приказани резултати експеримената у кавезима у инкубатору где смо држали пчеле исте старости (0-24 сата старе на почетку експеримента), које потичу од исте слободно спарене матице, на контролисаној исхрани. Ови експерименти су открили да различите дијете доводе до присуства различитих изоформи дигестивних ензима, у различитим концентрацијама, у средњем цреву медоносних пчела.

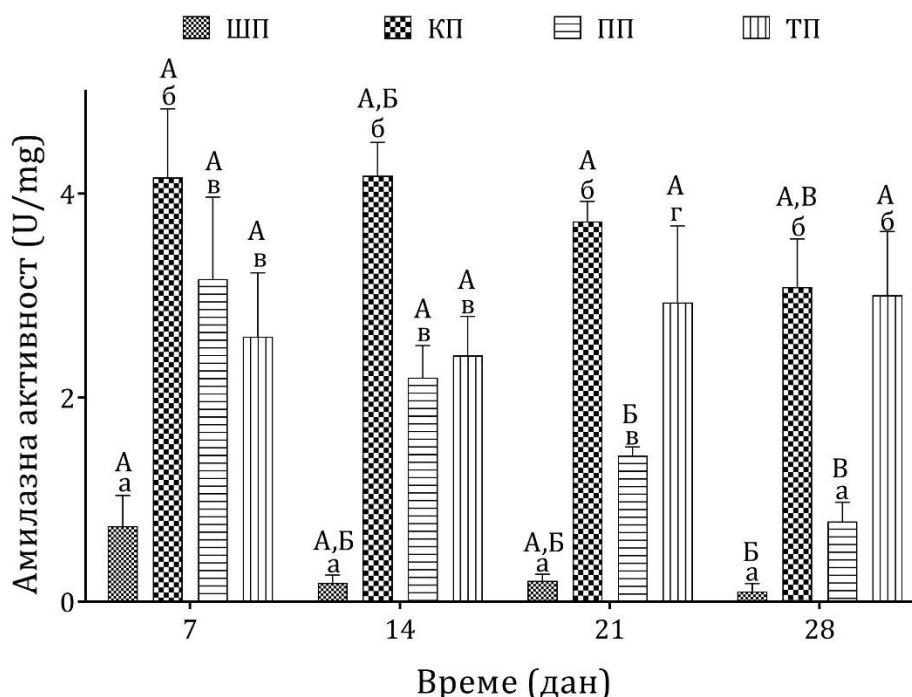
3.5.1.1 Упоредна анализа амилаза пчела храњених различитим погачама

Амилазна активност је одређивана употребом динитросалицилног реагенса (ДНС) према (225). Супстрат је растворни скроб (1%). Једна јединица α -амилазне активности је количина ензима која продукује 1 μ mol малтозе у минути на 35 °C. У екстрактима су одређене и концентрације протеина према Бредфорду (226). На основу добијених података је израчуната специфична α -амилазна активност, Слика 22.

Смањење активности амилазе у ПП групи је било статистички значајно од 7. до 21. дана и од 21. до 28. дана. Средње вредности означене различитим великим словом унутар исте групе су статистички значајне, Слика 22. Значајно смањење активности амилазе у средњем цреву пчела из КП групе је уочено између 14. и 28. дана. Пчеле из ШП групе су показале благи пад активности амилазе током узгоја који је био статистички значајан између 7. и 28. дана. У групи пчела храњеној погачама са брашном од великог брашнара (ТП) није било статистички значајне разлике унутар групе у току 28 дана.

Међутим, ниво амилазе у ТП групи је био виши од оног који је пронађен у средњем цреву ШП групе пчела у свим данима. У данима 7, 14 и 21 најнижа активност амилазе је детектована у средњим цревима ШП групе пчела, а пчеле из КП групе су у тим данима

имале највишу амилазну активност. Пчеле из ТП групе су имале већу амилазну активност него пчеле из ПП групе после 21. и 28. дана, а сличну оној код пчела из КП групе на крају експеримента, после 28. дана. Постојале су статистички значајне разлике у амилазној активности између пчела из различитих група после 7. дана, али су разлике међу групама постале веће након 7. дана, означено малим словима изнад средњих вредности (Слика 22).



Слика 22. Специфична амилазна активност (U/mg) у средњем цреву адулата медоносне пчела након одгајања током 7, 14, 21 и 28 дана. Сваки стубић представља средњу вредност пет независних мерења, на пчелама из 5 различитих кавеза, $\pm$ СД. Средње вредности означене истим великим словом нису статистички значајно различите када се поређење обавља унутар исто хранене групе на различите дане.

Средње вредности означене истим малим словом нису статистички значајно различите између различито хранених група на исти дан. За оба поређења је коришћена двосмерна АНОВА са Бонферијевијевим тестом, ($\alpha = 0,05$). ШП – група која је хранена комерцијалном шећерном погачом; КП – група која је хранена погачом са квасцем; ПП – група која је хранена погачом са поленом; ТП – група која је хранена погачом са брашном од великог брашнара (*T. molitor*).

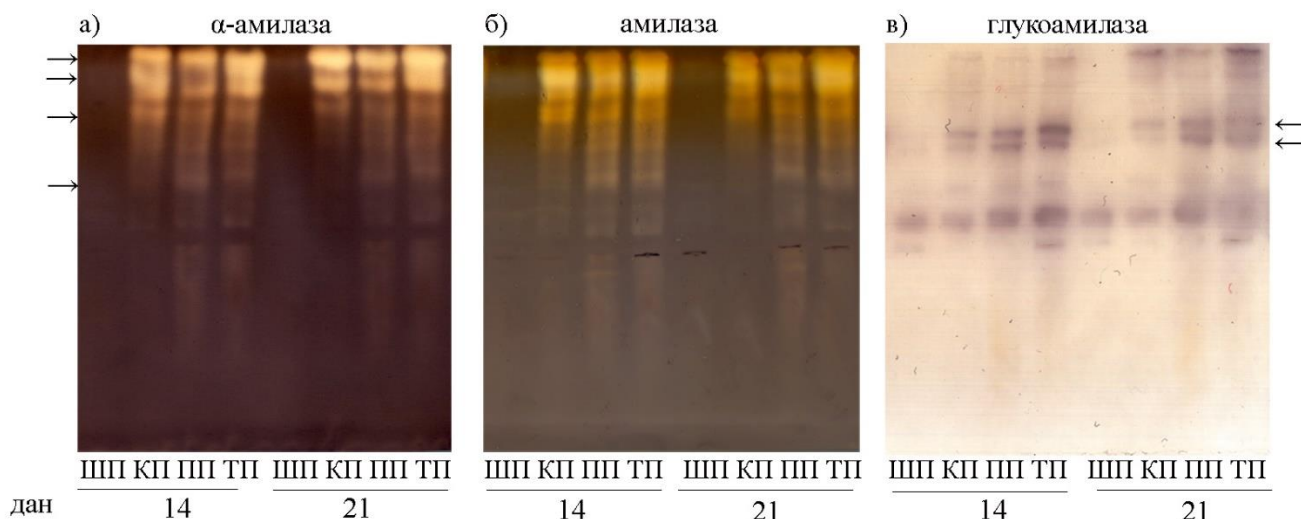
У ШП, КП и ПП групи се амилазна активност постепено смањивала, што је у складу са претходном студијом (227). Када су пчеле узгајане на погачама само са шећером, као и оним са поленом и квасцем специфична амилазна активност се значајно смањивала током времена. Међутим, није забележена статистички значајна промена у нивоу произведене амилазе код ТП групе.

3.5.1.1.1 Зимограмска детекција амилазне активности

Амилазе су анализиране зимограмским техникама након електрофоретског раздвајања екстракта средњих црева адулата медоносне пчеле. Екстракти су раздвајани нативном полиакриламидном гел електрофорезом према Дејвису (228) и изоелектричним фокусирањем (ИЕФ). У гелу после ИЕФ-а су симултано детектоване α -амилазе и егзо-амилазе зимограмском детекцијом према Дојнов и Вујчић, 2012 (229).

Симултана зимограмска детекција α -амилазе и егзо-амилазе омогућава да се уочи разлика између амилаза које се испољавају када се пчеле хране различитим погачама

(Слика 23). Четрнаести и двадесет први дан су изабрани да буду приказани на основу анализе укупне амилазне активности у средњем цреву. У ШП групи амилазна активност потиче од егзо-амилаза. Код осталих група у средњем цреву су присутне обе испитиване групе амилаза, α -амилазе и егзо-амилазе. У ТП групи се у двадесет првом дану гајења примећује највећа количина егзо-амилаза. Главне изоформе амилаза имају различиту покретљивост у полиакриламидном гелу током електрофорезе, а њихове позиције су означене стрелицама (Слика 23).



Слика 23. Симултана зимограмска детекција α -амилазе и егзо-амилазе у средњем цреву медоносне пчеле после 14 и 21 дана. а) Зимограм за детекцију α -амилазе у полиакриламидном гелу са кополимеризованим β -граничним декстринима, б) Зимограм за детекцију амилаза где је скроб супстрат, в) Зимограм за детекцију егзо-амилаза на нитроцелулозној мембрани базиран на куплованој реакцији глюкоза-оксидазе и пероксидазе из рена, користећи 4-Cl- α -нафтол као супстрат за детекцију глюкозе (крајњи производ хидролизе). Стрелице показују положај главних изоформи.

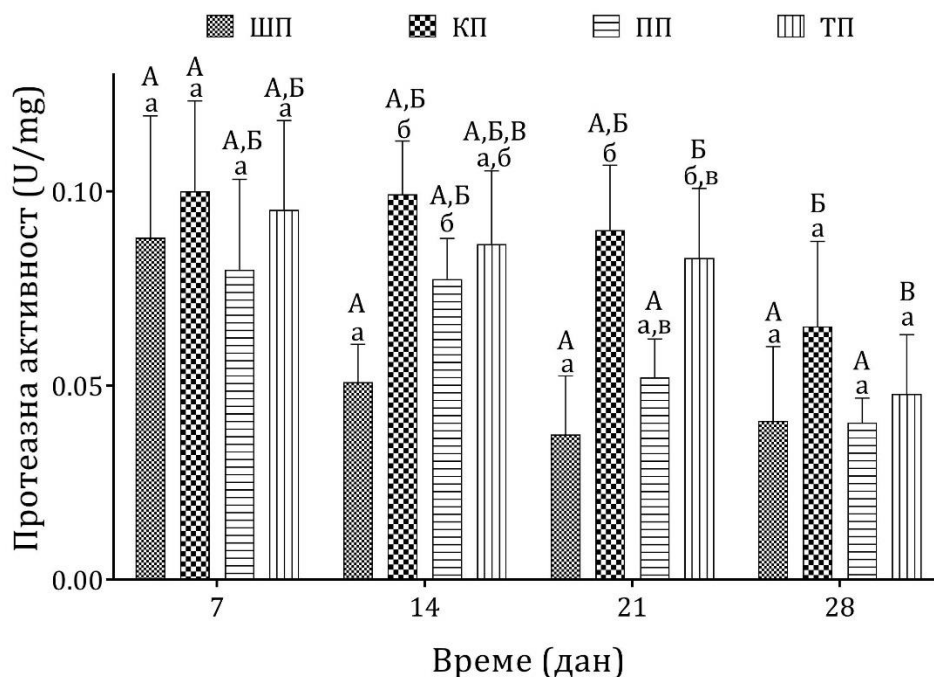
Резултати ове студије јасно показују да пчеле производе не само α -амилазу, већ и егзо-амилазу у средњем цреву (Слика 23в). Пчеле из КП, ПП и ТП групе у овом експерименту лучше егзо-амилазу у средњем цреву и њен ниво се повећава током времена много више него код пчела из ШП групе. α -Амилаза хидролизује скроб до олигосахарида који су супстрат за егзо-амилазу.

3.5.1.2 Упоредна анализа протеаза пчела храњених различитим погачама

Укупна протеолитичка активност одређивана је ТНБС (тринитро бензен сулфонска киселина) поступком. Висока протеолитичка активности је била присутна у свим анализираним средњим цревима. Највише активности су биле на почетку одгајања и затим су постепено опадале. Протеолитичка активности у ШП групи, која се хранила само шећером, је опала у другој недељи, али разлике нису статистички значајне, означено великим словима изнад средњих вредности (Слика 24). Значајно смањење протеазне активности у ТП групи је уочено између 7. и 28. дана и 21. и 28. дана. У групи КП се протеолитичка активност значајно смањила између 7. и 28. дана, а у ПП групи се протеолитичка активност се смањивала између 14. и 28. дана.

Разлика међу групама, после 7 и 28 дана, није била статистички значајна, означено малим словима (Слика 24). Статистичка анализа двосмерне АНОВЕ са Бонферијеvim тестом потврдила је разлике у протеолитичкој активности између различитих група пчела, ($F(3, 16) = 6,943, P = 0,0033$) после 14. и 21. дана. Постоји јасна разлика у присуству протеаза у средњем цреву између пчела храњених поленом (ПП) и заменама за полен (КП)

и ТП) у поређењу са оним које су храњене само шећером (ШП). Ово показује да протеини у храни индукују производњу протеаза.



Слика 24. Специфична протеазна активност (U/mg) у средњем цреву адулата медоносне пчела након одгајања током 7, 14, 21 и 28 дана. Сваки стубић представља средњу вредност пет независних мерења, на пчелама из 5 различитих кавеза, $\pm$ СД. Средње вредности означене истим великим словом нису статистички значајно различите када се поређење обавља унутар исто храњене групе на различите дане. Средње вредности означене истим малим словом нису статистички значајно различите између различито храњених група на исти дан. За оба поређења је коришћен двосмерна АНОВА са Бонферијевијем тестом ($\alpha = 0,05$). ШП – група која је храњена комерцијалном шећерном погачом; КП – група која је храњена погачом са квасцем; ПП – група која је храњена погачом са поленом; ТП – група која је храњена погачом са брашном од великог брашнара (*T. molitor*).

Релативно висока протеолитичка и амилолитичка активност у средњем цреву пчела из ШП групе након 7 дана, упркос одсуству супстрата, може бити последица улоге перитрофне мембране у штедњи ензима.

3.5.1.2.1 Зимограмска детекција протеазне активности

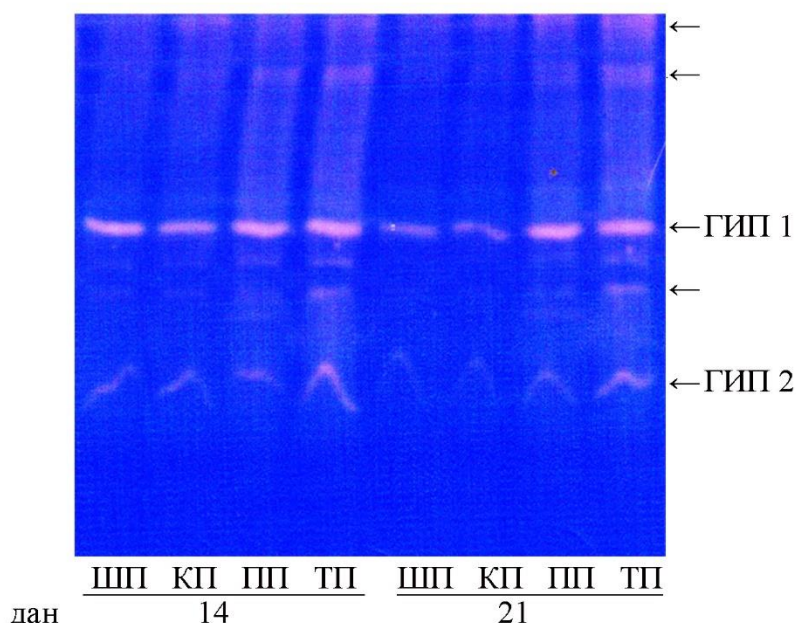
Зимограмска детекција је обављена после ИЕФ-а, а протеазе су детектоване у гелу са 0,1% желатином као супстратом (230).

Зимограмска детекција је показала две главне протеазне изоформе у свим испитиваним узорцима. Јачина изоформи била је у складу са нивоима специфичних активности ензима. Пчеле одгајане само на шећеру (ШП) имале су само две изоформе протеаза, док су пчеле храњене комплекснијим погачама испојиле више изоформи. Највећи број изоформи протеаза је детектован у средњем цреву пчела храњених погачама са брашном од великог брашнара (Слика 25).

Старије пчеле имају нижу протеазну активност у средњем цреву него млађе пчеле (124), што је такође овде показано у КП и ТП групама посматрањем статистички значајног смањења када се упореди протеазна активност на дан 7 и 28 (Слика 24).

Протеазе су одговорне за стално снабдевање аминокиселинама из хране за све потребе пчелиње заједнице. Показано је да је протеолитичка активност зависна од узраста и сезоне, како код ларви, тако и код одраслих пчела (124, 128). Нижа активност

протеаза јавља се код пчела ограничених само на угљене хидрате, а синтеза трипсина опада са старењем пчела (108), што је у складу са нашим резултатима код пчела из ШП групе, где је протеолитичка активност у 14. дану нижа од оне у КП и ПП групама, а у 21. дану нижа од оне у КП и ТП групама. Може се претпоставити да је висока протеолитичка активност у средњем цреву добар показатељ физиолошког стања радилица.



Слика 25. Протеазна активност у средњем цреву медоносне пчеле после 14 и 21 дана. ШП - група храњена комерцијалном погачама од шећера; КП - група храњена погачама са квасцем; ПП - група храњена погачама са поленом; ТП - група храњена погачама са брашном од великог брашнара (*T. molitor*). Стрелице показују положај главних изоформи протеаза (ГИП).

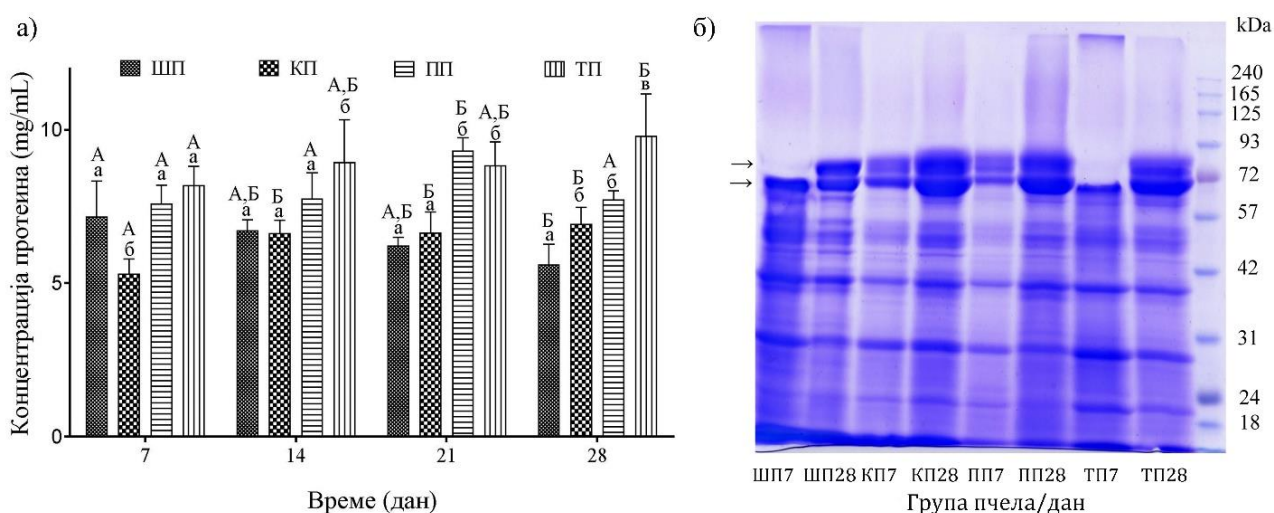
Резултати показују да пчеле из ШП имају много нижу амилолитичку и протеолитичку активност, на дан 14 и 21, у поређењу са пчелама узгајаним на сложенијим супстратима (са квасцем, поленом и брашном од великог брашнара), иако постоји релативно висока активност протеаза у средњим цревима ШП групе на дан 7, Слика 24 и 25. Овај резултат је у складу са Крајлшхајмом и Столбергом, 1989 (231), који тврде да пчеле које су храњене раствором сахарозе показују значајно повећање протеолитичке активности у средњем цреву у првим данима живота, која потом опада. Слично овде показаним резултатима, они показују да је протеолитичка активност већа код пчела које имају протеине у исхрани. Прекомерна продукција постојећих дигестивних протеаза је позната стратегија инсеката - биљоједа када треба да надокнаде недостатак хранљивих супстанци (232). Могуће је да пчеле покушавају да превазиђу нутритивни стрес повећавањем производње протеаза.

3.5.1.3 Анализа укупних протеина средњег црева пчела храњених заменама за полен

Концентрација протеина у екстрактима средњег црева медоносних пчела, које су одгајане на 4 различите погаче, је одређена према Бредфордовом методу.

Као што је приказано на Слици 26а, статистички значајне разлике у концентрацији протеина у средњем цреву пчела из различитих група су утврђене тестом АНОВА ($F(3, 64) = 56,14$, $P < 0,0001$). Највеће разлике у концентрацији протеина између пчела из различитих група су забележене последњег дана одгајања, означено малим

словима на Слици 26а. Занимљиво је да је концентрација протеина у КП групи након 7 дана гајења, била најнижа у поређењу са свим осталим мерењима. У свим групама, концентрација протеина је благо порасла током одгајања, осим код пчела у ШП групи, где постоји значајан пад између дана 7 и 28, означено великим словима на Слици 26а. Значајан раст је забележен у КП групи на почетку одгајања од 7. дана до 14. дана, означено великим словима на Слици 26а. У ТП групи, значајна разлика у концентрацији протеина је уочена само при поређењу почетка и краја одгајања, а остатак времена се постепено повећавала (Слика 26а), док је у ПП групи је била највећа у 21. дану.



Слика 26. Утицај састава погача на концентрацију протеина у средњем цреву медоносне пчеле током 28 дана гајења. а) Концентрација протеина (mg/mL), одређена према Бредфорду. Сваки стубић приказује средњу вредност 5 независних мерења, на пчелама из 5 различитих кавеза, $\pm$ СД. Средње вредности означене истим великим словом нису статистички значајно различите када се поређење обавља унутар исто хранене групе на различите дане. Средње вредности означене истим малим словом нису статистички значајно различите између различито хранених група на исти дан. За оба поређења је коришћена АНОВА и Бонферонијев тест, ($p < 0,05$). б) SDS полиакриламидна гел електрофореза екстраката средњег црева адулата медоносне пчеле после 7 и 28 дана. Означене су молекуларне масе стандарда (kDa). ШП - група која је хранена комерцијалном шећерном погачом; КП - група која је хранена погачом са квасцем; ПП - група која је хранена погачом са поленом; ТП - група која је хранена погачом са брашном од великог брашнара (*T. molitor*).

Поред тога, протеини екстраховани из узорка средњег црева су анализирани помоћу SDS полиакриламидне гел електрофорезе у 7. и 28. дану користећи Лемлијеву методу (233), а затим помоћу програма ImageJ2 (Слика 26б). Ова анализа је укључивала утврђивање молекулских маса и интензитета протеинских трака. Упркос варијацијама у концентрацијама протеина, протеински профили су остали слични унутар истих група (ШП, КП, ПП и ТП), као и између различитих група пчела. Најзначајнија разлика која је уочена је присуство протеинских трака са молекулским масама од 70,79 kDa и 83,00 kDa, утврђених коришћењем стандарде праве log MM у односу на Rf индекс, а то је мерено помоћу ImageJ2 програма, па означено стрелицама на Слици 26б.

Додатно, програм ImageJ2 је коришћен за квантификацију протеинских трака у односу на све протеине присутне у узорку, што је постигнуто рачунањем интегралне густине инвертованих слика. Протеинска трака од 70,79 kDa је константно била присутна у свим узорцима, али се њен интензитет мењао током времена. Насупрот томе, протеинска трака од 83,00 kDa није била присутна у ШП и ТП узорцима на почетку одгајања (7. дан), али се појавила касније (28. дан). Ова трака је била присутна у КП и ПП узорцима на почетку одгајања (7. дан), али нижег интензитета у односу на све протеине

присутне у узорку (КП 6,36%, ПП 5,78%) у поређењу са даном 28, где је била израженија (КП 8,49%, ПП 5,85%).

Укратко, резултати приказани на Слици 266 наговештавају да, иако су постојале сличности у протеинским профилима између различитих група и унутар исте групе током времена, знатне разлике су уочене у присуству и пропорцијама одређених протеинских трака код узорака у различитим временским тачкама у процесу одгајања. Са обзиром на то да се концентрација протеина у ТП групи временом повећава, а што се види и по протеинским профилима, може се сматрати да су погаче са брашном од великог брашна одговарајућа замена за полен.

Ово јасно показује на нивоу дигестивних ензима да храњење пчела само угљеним хидратима (шећерним сирупом) током беспашних периода није довољно. У тим периодима пчелиње заједнице морају бити храњене заменама за полен да би се ублажио недостатак полена у околини као што је раније наведено (57).

Када се погледају амилазни и протеазни зимограми, може се видети да су присутне изоформе у ПП и ТП групама најсличније, док КП група показује мање ензимских изоформи. Може се сматрати да је брашно од великог брашна одговарајућа храна за пчеле јер индукује производњу сличних изопептидазних и изоамилазних профила, као када се пчеле хране полифлорним поленом који се сматра најбољим извором хранљивих супстанци у пчелињој исхрани (58). Штавише, може се сматрати бољом алтернативом од пивског квасца који је данас чест, јефтин и доступан извор протеина у заменама за полен (57), пошто храњење квасцем (КП) доводи до мањег броја изоформи у средњем цреву у поређењу са исхраном поленом (ПП). Као што је овде показано, промене у ензимским профилима у средњем цреву су више у корелацији са функционалним и физиолошким статусом радилица него са њиховом старашћу, што је у складу са претходним истраживањима (122).

Резултати овог и претходних истраживања подржавају претпоставку да инсекти имају читав скуп дигестивних ензима, у зависности од врсте хране. Нова врста хране за пчеле – погаче са брашном од великог брашна, може бити добар извор нутријената ако се узме у обзир ниво активности протеаза и амилаза.

Активност протеаза у средњем цреву пчела храњених брашном од ларви великог брашна била је слична или чак нешто виша у поређењу са активностима пчела храњених поленом и квасцем. Пластичност инсеката већ је показана у производњи различитих ензимских изоформи у зависности од различите исхране (234). Овде се такође види ова особина инсеката, нарочито ако упоредимо изоформе пептидаза, где је уочено да су ензимски профили пчела храњених брашном од великог брашна (ТП) слични профилима пчела храњених поленом (ПП), док се разликују од профила пчела храњених квасцем и шећером (КП, ШП).

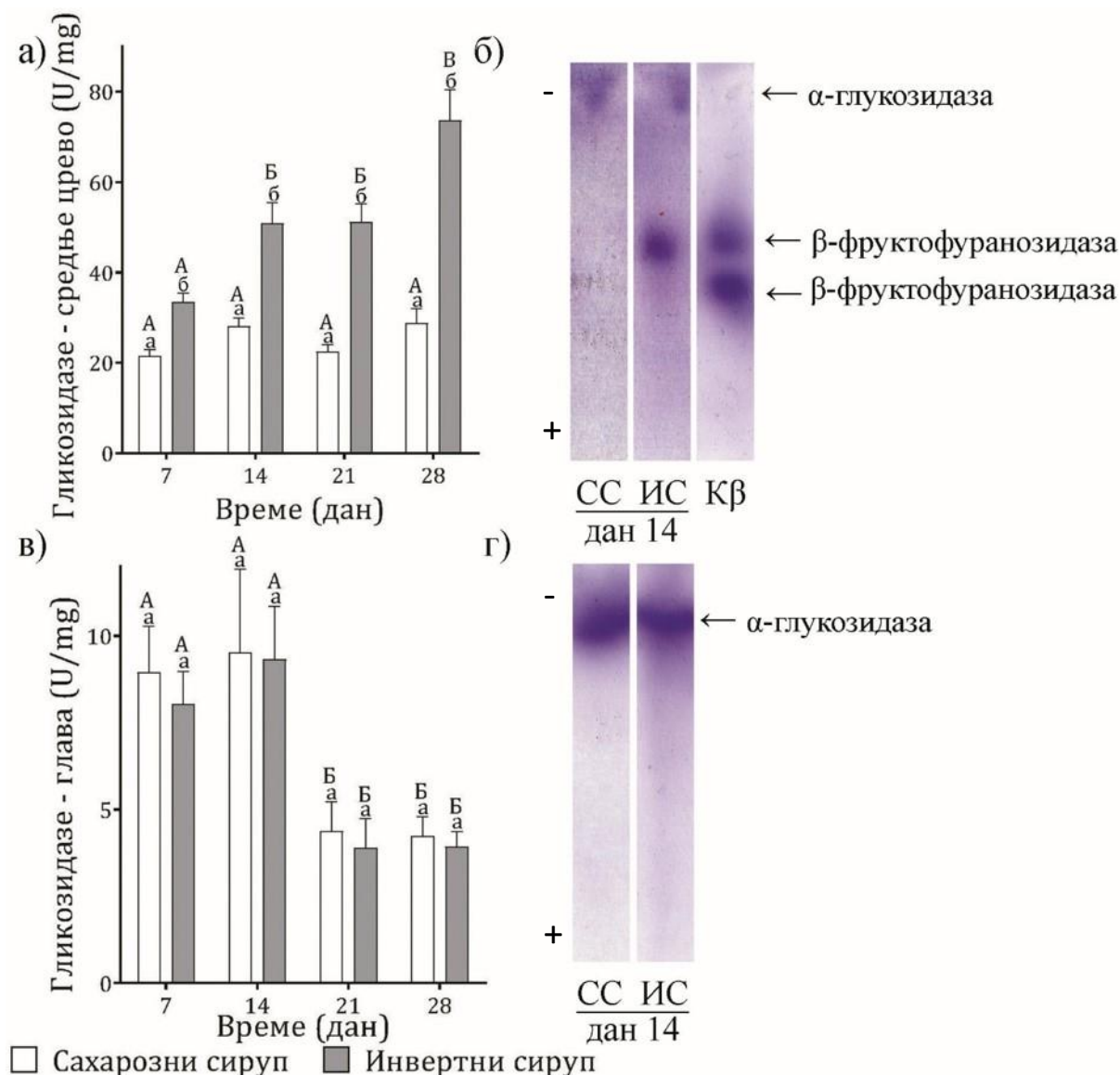
3.5.2 Утицај замена за нектар на профил дигестивних ензима

Шећери из нектара су основни извор угљених хидрата за пчеле, а његове замене могу значајно утицати на активности дигестивних ензима. Гликозидазе омогућавају пчелама прераду сакупљеног нектара и његових замена.

3.5.2.1 Утицај замена на гликозидазну активност у средњем цреву и глави

Специфична активност гликозидаза (U/mg) била је значајно виша у цревима групе храњене ИС (Слика 27а), док није било статистички значајне разлике у специфичној активности гликозидаза у екстрактима главе између две групе (Слика 27в). Током времена, активност гликозидаза у цревима код СС групе је константна, док код ИС

групе активност гликозидаза расте с временом, што је означено великим словима (Слика 27а). У обе групе активност гликозидаза у глави значајно опада током треће недеље експеримента (Слика 27в).



Слика 27. Специфична гликозидазна активност (U/mg) у: а) средњем цреву и в) глави медоносних пчела које су храњене сахарозним (СС) и инвертним сирупом (ИС) након одгајања током 7, 14, 21 и 28 дана. Сваки стубић приказује средњу вредност 5 независних мерења $\pm$ СД. Средње вредности означене истим малим словом нису статистички значајне према Бонферијевој тесту вишеструког поређења ($p < 0,05$) између група храњених различитим сирупом на исти дан. Статистички значајне разлике, према истом тесту, унутар исте групе када се пореде различити дани су означене великим словима. Зимограм после ИЕФ-а екстракта средњег б) и задњег г) црева после 14 дана одгајања. Кβ – зимограм пречишћене β-фруктофуранозидазе из квасца *Saccharomyces cerevisiae*, б).

Зимограми екстракта црева показују да виша активност гликозидаза (Слика 27а) потиче од β-фруктофуранозидазе из квасца, коришћене за припрему инвертног шећерног сирупа. Ово се може видети поређењем екстракта средњег црева ИС групе након 14 дана са пречишћеном β-фруктофуранозидазом из квасца (Кβ) (Слика 27б).

Занимљиво је да резидуална активност β-фруктофуранозидазе у средњем цреву расте до краја експеримента, иако се конзумација сирупа нагло смањује након две

недеље. Могуће је да је ово последица дејства перитрофног матрикса на очувању ензима описаног у поглављу 3.2.5.

Зимограми ензимског екстракта главе (Слика 27г) показују само α -глюкозидазу у обе групе, а њихов положај је сличан α -глюкозидази из црева (Слика 27б), па је то највероватније α -глюкозидаза III (149), јер је то једина пчелиња α -глюкозидаза која се налази у пчелињој глави, тј. у ХФЖ.

3.5.2.2 Зимограмска детекција ензима у сирупу прикупљеном из саћа

Медоносне пчеле имају два рецептора за укус помоћу којих осећају шећере, AmGr3 је рецептор за фруктозу, а AmGr2 је корецептор за сахарозу и глюкозу (235), па ово показује способност пчела да разликују врсту шећера у нектару или сирупу. Већа амилазна активност је примећена у меду из пчелињих заједница које су храњене сахарозним сирупом у поређењу са оним које су храњене инвертним сирупом (236). Ово сугерише да пчеле додају више амилазе (вероватно пљувачке са свим присутним ензимима) у сахарозни сируп него у инвертни сируп. Ово је значајно јер може да значи да је прерада инвертног сирупа мање захтевна за пчеле, него прерада сахарозног сирупа.

Амилаза је детектована у СМ али није у ИМ (Слика 28а), што наговештава да медоносне пчеле могу да разликују састав ова два различита вештачка меда или сирупа и да због тога лучше ензимима богату пљувачку у СС и/или СМ, а да је не лучше у ИС и/или ИМ, или је евентуално лучше у много мањој количини.

Ово је у складу са тврдњом да је количина глюкоза-оксидазе била значајно већа у прерађеном сахарозном сирупу (овде означен као СМ), него у прерађеном инвертном сирупу (овде означен као ИМ) (237).

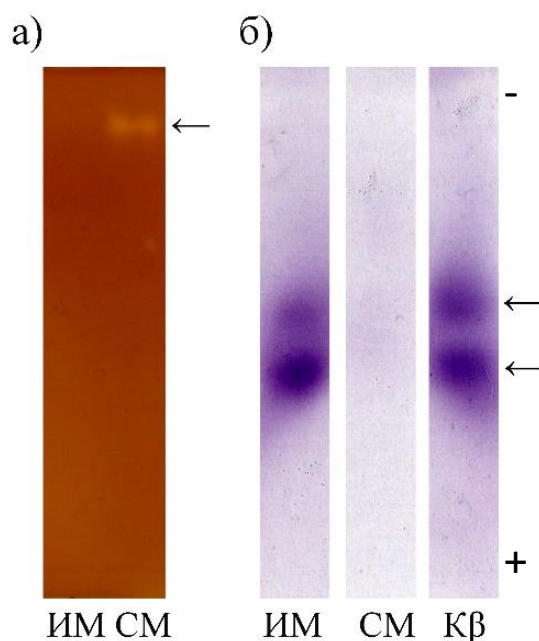
Хипотеза коју су поставили Бугарова и сар., 2021 наговештава способност пчела да осете присуство дисахарида у сирупу или меду и да реагују на то (237), а претходни резултат (Слика 28а), потврђује ову хипотезу.

Способност пчела да осете састојке нектара или меда може бити веома важна за опстанак пчелиње заједнице, због тога што пчеле стално премештају нектар и мед из једних ћелија саћа у друге, а при томе оне додају у ћелије пљувачку која садржи ензиме. Премештање нектара из ћелије у ћелију омогућава пчелама да концентрују нектар у мед (238), а додавање дигестивних ензима је кључни корак у овом поступку.

Пчеле премештају мед, из центра ка периферији, у пролеће да би прошириле легло, а у јесен када се легло скупља премештају мед ближе локацији где ће се образовати зимско клубе. Ово је трајан процес при коме пчеле теже да образују карактеристичан концентричан распоред легла, полена и меда која се појављује на саћу у пчелињој заједници (239).

Без ове способности пчеле би додавале ензим, тј. пљувачку са различитим ензимима и протеинима као што је главни протеин из матичног млеча (енг. „*major royal jelly protein*“), неселективно, што би водило већој концентрацији протеина у меду и исцрпљивању залиха у телу медоносних пчела. Вероватно би превелика количина ензима у меду била штетна за пчелињу заједницу, а највећи проблем би настао због повећања концентрације глюкоза-оксидазе до вредности која би била штетна за пчеле. То је због тога што пчеле разблажују мед пре него га поједу (240), па тако настаје водоник пероксид. Антибактеријска својства меда у многостави зависе од количине водоник-пероксида који настаје у разблаженом меду, а он настаје када глюкоза-оксидаза разлаже глюкозу на глюконску киселину и водоник пероксид (241).

Слика 28. Зимограмска детекција а) амилаза после нативне полиакриламидне гел електрофорезе употребом скроба и јодног реагенса, б) гликозидаза после ИЕФ употребом сахарозе и НБТ реагенса, у прерађеном сирупу прикупљеном из саћа после 28 дана. ИМ – инвертни мед који је направила група храњена инвертним сирупом; СМ – сахарозни мед који је направила група храњена сахарозним сирупом; Стрелице показују положај детектованих изоформи. К β – пречишћена β -фруктофуранозидаза изолована из квасца *Saccharomyces cerevisiae*.



Концентрација водоник-пероксида у меду је условљена вредностима глукоза-оксидазе и каталазе. Глукоза-оксидаза у меду потиче од пчела, али каталаза потиче из биљака (242). Ово значи да је концентрација каталазе у ускладиштеном меду коначна, док би концентрација глукоза-оксидазе била у сталном порасту после сваког премештања из ћелија у ћелије. Међутим, способност пчела да осете састав шећера у меду то спречава. Медоносне пчеле су веома толерантне на водоник пероксид у раствору којим су храњене, али избегавају растворе шећера који садрже значајне концентрације водоник-пероксида (243).

Медови са ниском α -глукозидазном активношћу обично имају и ниску амилазну активност и обрнуто (244). Ово наговештава да медоносне пчеле додају различиту количину пљувачке у сируп при свакој манипулацији, као што су нпр. премештање из ћелије у ћелију или трофилакса. У складу са овим су и овде приказани резултати који показују да ни амилаза, ни α -глукозидаза нису детектовани у ИМ. Инвертазна активност у ИМ вероватно потиче од квасца (β -фруктофуранозидаза) који је коришћен да се припреми инвертни сируп. То је због тога што у њему, за разлику од СМ, није детектован ниједан шећер осим глукозе и фруктозе.

3.6 Карактеризација α -глукозидазе

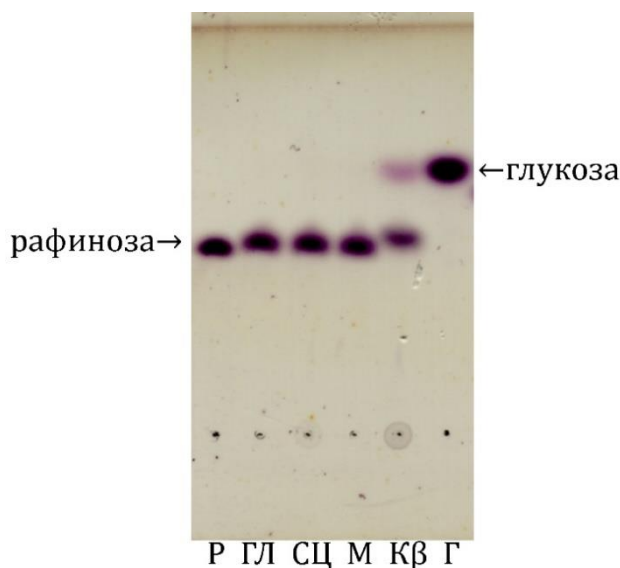
Карактеризација α -глукозидазе је важна за разумевање метаболизма угљених хидрата у пчелињим заједницама. Иако је овај ензим много истраживан, а присутан је и у меду, све његове особине још увек нису у потпуности истражене. Изоелектрична тачка пчелињих α -глукозидаза је била непозната до наших истраживања.

3.6.1 Супстратна специфичност α -глукозидазе

Да би се испитала супстратна специфичност детектоване гликозидазе која одређује тип ензима, тј. да ли је присутни ензим α -глукозидаза или β -фруктофуранозидаза урађен је есеј са рафинозом. Пчелиња α -глукозидаза не хидролизује рафинозу (245), за разлику од β -фруктофуранозидазе (246). Добијени

производи су раздвојени помоћу танкослојне хроматографије TLC (енг. „*thin layer chromatography*“), па детектовани раствором α -нафтола, Слика 29.

Слика 29. Анализа добијених сахарада после ензимског есеја са рафинозом. Ультрафилтрацијом сконцентровани ензими из главе (ГЛ), средњег црева (СЦ) и меда (М) не хидролизују рафинозу (Р). Пречишћена β -фруктофуранозидаза изолована из квасца *Saccharomyces cerevisiae* (К β) хидролизује рафинозу. Стандард - глюкоза (Г).



Са Сlike 29 се види да ензими присутни у средњем цреву и глави медоносне пчеле, као и они присутни у природном меду не могу да хидролизују рафинозу, што индиректно потврђује да је пчелињи ензим који хидролизује сахарозу α -глюкозидаза. За разлику од њих пречишћена β -фруктофуранозидаза изолована из квасца *Saccharomyces cerevisiae* (К β) хидролизује рафинозу.

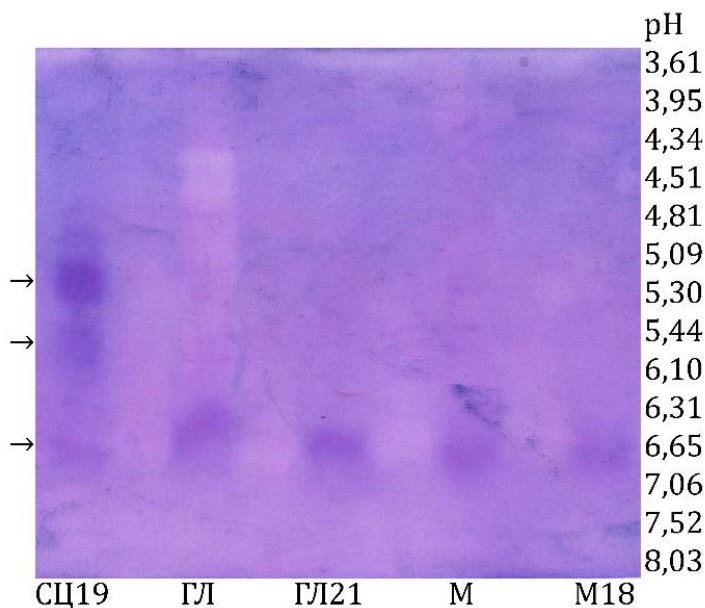
У старијој литератури се пчелињи ензим који хидролизује сахарозу често назива инвертаза, што често отежава преглед литературе. Међутим сада је прихваћено (BRENDA; Exrasy) да је инвертаза β -фруктофуранозидаза (EC 3.2.1.26), а пчелињи ензим који хидролизује сахарозу (главни шећер у нектару) α -глюкозидаза (EC 3.2.1.20).

3.6.2 Одређивање изоелектричне тачке (pI) α -глюкозидазе

Иако су пчелиње α -глюкозидазе окарактерисане, њихова изоелектрична тачка није публикована. Isoelectric point је одређена мерењем pH вредности у парчићима гела после ИЕФ-а. Ензим α -глюкозидаза је детектована помоћу супстрата сахарозе и НБТ (нитроплаво-тетразолијум-хлорид, енг. „*nitroblue tetrazolium chloride*“) реагенса који је коришћен за реакцију са насталим производима хидролизе (редукујућим шећерима).

Изоелектрична тачка је pH вредност у раствору у коме протеин има формално нулто наелектрисање. Ово је важно јер pH вредност утиче на растворљивост и стабилност протеина, као и на њихову интеракцију с другим молекулима. На основу измерених pH вредности у различитим деловима гела и положаја тих делова је нацртан графикон са кога су прочитане pI вредности.

Трака која се види у свим узорцима је највероватније α -глюкозидаза III, јер је то једина пчелиња α -глюкозидаза која је присутна у глави (тачније у ХФЖ), меду и средњем цреву у току зиме (149), а пчеле за овај експеримент су узорковане са лета кошница 23. фебруара, када су у кошницама биле присутне само зимске пчеле. То објашњава зашто се на истој позицији као у глави и меду налази и трака у средњем цреву. Очитана вредност изоелектричне тачке α -глюкозидазе III је 6,63 (Слика 30).



Слика 30. Зимограмска детекција α -глюкозидаза после ИЕФ употребом сахарозе и НБТ реагенса у ултрафилтрованим екстрактима главе пчеле (ГЛ) и меда (М) као и одабраних фракција после гел филтрације, 19. фракција екстракта средњег црева (СЦ 19), 21. фракција главе (ГЛ 21) и 18. фракција меда (М18). Најуочљивије изоформе су означене стрелицама (лево). Означене су рН вредности измерене у гелу после ИЕФ-а.

Поред ове α -глюкозидазе III у фракцији 19 средњег црева се виде још две изражене траке. Једна има изоелектричну тачку 5,20, а друга 5,77. Могуће је да су то α -глюкозидаза I и II јер је имунолошки потврђено да су две α -глюкозидазе (означене као α -глюкозидаза I и II) различите од α -глюкозидазе III присутне у средњем цреву пчела (149).

3.7 Елементарни састав пчелињег легла и пчелиње хране

Елементарни састав хране за пчеле и пчелињег легла није довољно истражен, иако су различити елементи сигурно важни за одржавање здравља и продуктивности пчелињих заједница. Недостатак студија о елементарном саставу хране и његовој повезаности са здрављем пчела оставља бројна питања о њиховом утицају на пчелињу заједницу.

3.7.1 Елементарни састав ларви и мумија

Мумије кречног легла су имале највећу концентрацију макроелемената (Na, Mg, P, S, K, Ca) и неких микроелемената (Rb) у поређењу са свим осталим узорцима (Слика 31а,б,г). У исто време мумије су имале најнижу концентрацију неких микроелемената (V, As, Sr, Ag, Cd, Sb, Ba, Pb) (Слика 31г,д). Могуће је да су ове ларве пре мумификације унеле више хране него ларве из исте кошнице, које нису показале симптоме болести. Храна којом су се храниле ларве које су се затим мумификовале је вероватно била уједначенија и садржала је много мање разноврсних микроелемената.

Исхрана пчела је повезана са саставом биљног света у околини (247), што значи да излетнице које сакупљају храну уносе полен и нектар различитог порекла у кошницу, а пчеле неговатељице од те унете хране у заједницу производе храну за ларве. Мед, а посебно полен нису хомогене смеше.

Пчеле које су се храниле мање хранљивим поленом конзумирале су више хране и одгојиле мање легла, него пчеле које су се храниле хранљивијим поленом, а које су конзумирале мање хране и одгајиле више легла (199).

Чак и у заједници у којој нема никаквих поремећаја и која је снабдевена довољном количином хране одговарајућег састава, пчеле неговатељице наизглед стохастички занемарују неке ларве довољно дуго да то доведе до „глади“. Услед тога занемарена

ларва феромонски одашиље „сигнал глади“ што повећава њене шансе да буде нахрањена (248). Ово наговештава то да свака ларва не добија исту количину хране, а ни та храна није истог састава.

Разлике у исхрани ларви могу се уочити приликом процене исхрањености заједнице. Постоје очигледни симптоми који могу указивати на озбиљан нутритивни стрес, као што су ларве са мало или без имало млеча око ларви у леглу. За разлику од њих ларве које се негују у заједницама са великим залихама полена обично пливају у великој количини млеча који обезбеђују пчеле неговатељице (249).

Могуће је да заражене ларве покушавају да надокнаде недостатак хранљивих супстанци који настаје услед потрошње ових супстанци од стране патогена (*Ascosphaera apis*), на исти начин на који заражене пчеле покушавају да надокнаде енергетски стрес који узрокује други пчелињи патоген (*Nosema ceranae*), тако што једу више (250). Може бити да заражена ларва чешће шаље „сигнал глади“ и на тај начин позитивно утиче на њене шансе да добије више млеча (248). Разлике у маси свих стадијума медоносне пчеле су добро документовани (251, 252), што показује да ларве унутар исте заједнице добијају различиту количину хране.

Све ларве унутар једне заједнице неће показати симптоме кречног легла и неће се преобразити у мумије. Овде је изнета претпоставка да само оне ларве које ће постати мумије добијају више хране, па тако и сакупљају већу количину макроелемената и неких микроелемената, као што је овде показано за никл и хром. Мумије и ларве из заједница које показују симптоме кречног легла садрже статистички значајно мању количину Al, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Cd, Sb и Cs у поређењу са ларвама из заједница без симптома кречног легла са истог пчелињака и са ларвама са градског пчелињака (Слика 31).

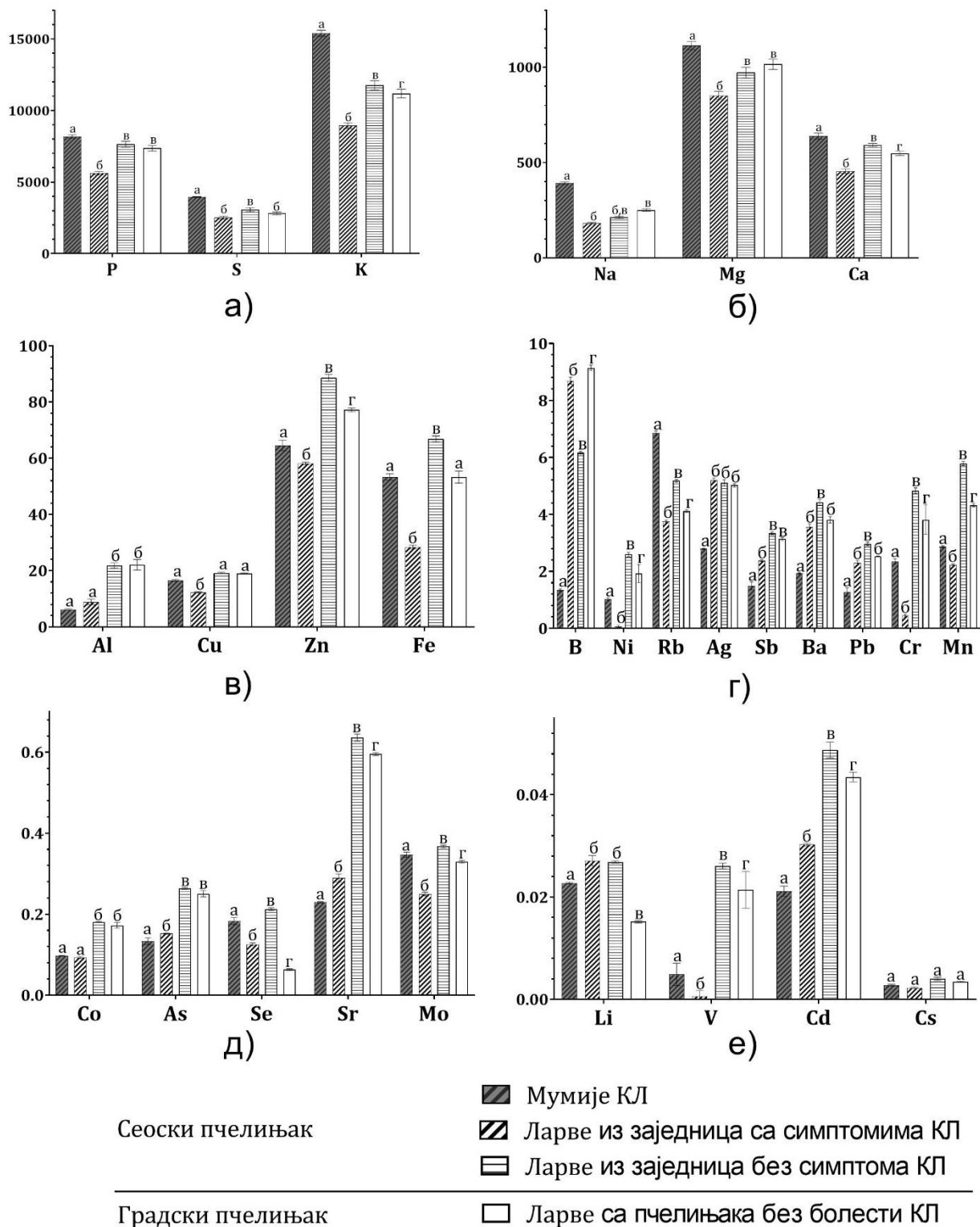
Ово наговештава да су ларве из оболелих заједница једноличније храњене у поређењу са ларвама из здравих заједница које су храњене разноврсније. Пчеле из оболелих заједница су или сакупљале мању количину полена или је тај полен био мање разноврстан. Постоје многи разлози са ово, укључујуће генетске особине пчела, што се види из експеримената где су пчеле селекционисане да сакупљају већу количину полена (80, 220), позитивне повратне спреге између сиромашне исхране и заразних болести, као и борбе за пчелињу пашу између пчелињих заједница (8, 23). Могуће је да су излетнице из здравих заједница успеле да сакупе већу количину полена, него пчеле из оболелих заједница са истог пчелињака, што се затим одразило на исхрану ларви.

До сада се сматрало да слаба исхрана није директан узрочник кречног легла, али да може да има значајан утицај на укупно здравље пчелиње заједнице. Пчелиње заједнице захтевају уравнотежену исхрану да би могле да прибаве све неопходне хранљиве састојке за свој развој, размножавање и правилан рад имунског система (9, 61).

Слаба исхрана може да наруши пчелињи имунски систем, услед чега пчеле лакше оболевају од различитих болести, што може да укључи и кречно легло. Услед ограничене исхране пчелиње ларве лакше оболевају од гљивичне болести коју изазива *Aspergillus fumigatus* Fresenius, међутим ово се може преокренути уколико се у пчелињу исхрану дода полифлорни полен који је добар извор хранљивих супстанци за пчелињу заједницу (71).

Постоји више чинилаца који утичу на појаву болести кречног легла, а на основу овде изнетих података се наговештава да недостатак појединих елемената може бити или могући узрок, или последица болести. Елементи B, As, Sr, Ag, Cd, Sb, Ba и Pb су посебно занимљиви јер је њихова концентрација у мумијама много мања од оне у здравим ларвама из истих кошница. Као што је претходно споменуто не постају све ларве из оболеле кошнице мумије. Све ларве унутар оболеле кошнице могу бити изложене спорама *Ascosphaera apis*, али неке од њих постају мумије, а неке се успешно развијају у адулте. На основу овде изнетих података може се извести закључак да се у мумије

преображавају оне ларве које имају нижу концентрацију претходно набројаних елемената.



Слика 31. Концентрација елемената (mg/kg) у сувој маси мумија кречног легла, ларви из заједница са симптомима, ларви из заједница без симптома и ларви са градског пчелињака без присуства болести; Различита слова изнад стубића показују статистички значајну разлику у концентрацији појединачних елемената између различитих узорака.

Осим тога, мумије и ларве из оболелих заједница имају нижу концентрацију Al, Cu, Zn, Ni, Cr, Mn, Co, Mo, V и Cs од здравих заједница са истог пчелињака и оних за пчелињака на коме није присутна болест кречног легла. Чињеница да ларве из здравих заједница садрже више микроелемената, у односу на оне из болесних заједница, потврђује овде изнету хипотезу да је кречно легло повезано са сиромашном исхраном. Ларве у здравим заједницама су укупно гледано боље храњене. Квалитет полена утиче на физиологију пчела које хране легло и на степен отпорности према пчелињем паразиту *Nosema ceranae* Fries et al. (62).

Концентрација бора у мумијама је веома ниска у односу на ларве из заражених кошница и свих осталих кошница. Неколико једињења која садрже бор показују одличну антигљивичну активност против важних гљивичних патогена *Mycosphaerella fijiensis* Morelet и *Colletotrichum sublineolum* Henn. (253).

Алуминијум и његове соли су привукли пажњу последњих деценија као алтернатива хемијским фунгицидима. Показала су се ефикасним против патогена из раздела *Ascomycota* (254).

Приказани резултати показују мањи садржај цинка у ларвама и мумијама из заражених заједница у поређењу са ларвама из здравих заједница. Додатак цинка повећава антиоксидативну одбрану пчела (255). Склоност ка храни третираној цинком је примећена код медоносних пчела и показује значај цинка за пчелињу заједницу (256). Цинк-оксид и наночестице сребра инхибирају развој кречног легла (257). Овде приказани резултати показују много нижу концентрацију сребра у мумијама у поређењу са ларвама из оболелих, али и из здравих заједница у складу са (257). Сребро је добро познато по својим антимикробним својствима (258, 259). Ларве су пре мумификације вероватно биле храњене храном са недовољно сребра, што је умањило његову антимикробну активност и тако дало прилику кречном леглу да се развије.

Поред тога, већина ових елемената, укључујући V, Cr, Mn и Sr је била присутна у веома ниским концентрацијама у мумијама и ларвама из оболелих заједница, а они су познати по својим антифунгалним својствима (260–262). Стога се може претпоставити да недостатак ових елемената погодује кречном леглу, а било би потребно урадити још истраживања на ову тему.

Слабо хигијенско понашање доприноси настанку болести кречног легла (80), али је једна друга генетска особина занемарена, а то је склоност ка сакупљању полена. Пчеле излетнице са подручја где је чест недостатак полена имају већу наследност ове особине. У таквим условима су заједнице са већом склоношћу за сакупљање полена успешније од заједница са мањом склоношћу за сакупљање полена, јер сакупљају више полена, који је главни извор протеина, липида и минерала у исхрани медоносних пчела (220).

У областима под монокултурама се често јавља недостатак полена, што је у складу са тврдњом да инциденција кречног легла може бити у порасту (75), с обзиром на то да су површине под монокултурама у порасту широм света. Недостатак полена не само да може смањити број јединки у пчелињем друштву, већ може довести и до повећане осетљивости на друге неповољне чиниоце (249), као што је *Ascosphaera apis*.

Овде приказани подаци показују да је концентрација неких елемената већа у мумијама у односу на здраве ларве из исте колоније, док је за друге елементе супротно. Ово је вероватно резултат квалитативних својстава хране којом се ове ларве хране, што зависи од састава полена. Заражене ларве које ће се претворити у мумије највероватније су храњене већом количином хране која је богата неким елементима (P, S, K, Na, Mg, Ca, Cu, Zn, Rb, Cr, Mn, Mo), док им неки елементи недостају (Al, B, Ag, Sb, Ba, Pb, As, Sr, Cd), од којих неки показују антифунгална својства (Слика 31).

Услед појаве нових пчелињих паразита и патогена, повећане употребе пестицида и климатских промена, имунски систем пчела је у последњих неколико деценија додатно ослабљен, што омогућава лакшу појаву болести, укључујући болест кречног легла (75,

263). А као додатак овим лошим околностима долази и слаба и једнолична исхрана, која услед недостатка неких микроелемената може бити један од узрочника болести кречног легла.

3.7.2 Поређење елементарног састава брашна од инсеката и полена

Поређење елементарног састава између брашна од трутовског легла и брашна од ларви великог брашнара је показало статистички значајну разлику према АНОВА тесту са накнадним Бонферонијевим тестом вишеструког поређења.

Трутовско брашно је имало више Ca, Al, Rb, Sr, Cr, Ag, Sb, Pb, Li и Co. У брашну од великог брашнара је било више P, S, K, Na, Mg, Cu, Zn, Mn, Ni, Se, Mo, Cd, али су Al и Ag били на граници квантификације. Није било разлике за Fe, As, V и Ba.

Најзаступљенији елементи су S, P, K, Mg, Ca и Na и чине 98,96% укупне масе анализираних елемената у трутовском брашну и 99,11% укупне масе анализираних елемената у брашну од великог брашнара. Најзаступљенији елементи у полену (S, P, K, Mg, Ca и Na) чине 97,69% укупне масе анализираних елемената, па се у полену налази значајно мањи удео P, S, K, Na и Mg него у обе врсте брашна од инсеката.

Из овога се види да је разноврсност различитих минерала (не рачунајући макроелементе S, P, K, Mg, Ca и Na) већа у трутовском брашну (укупно 1,04%) него у брашну од великог брашнара (укупно 0,89%), а највећа је у полену (укупно 2,31%). Ово показује да пчеле које слободно живе у природи сакупљају и користе много разноврснију храну, него што је то случај код гајених инсеката (као што су у овом случају ларве великог брашнара), који као и остале гајене животиње добијају релативно једноличну храну.

Иако су микронутријенти веома важни, њихова повезаност са здрављем пчела још увек није у потпуности испитана (190). У претходном експерименту је показано да мумије кречног легла и ларве из заражених кошница садрже значајно мање Al, Zn, Ni, Sb, Pb, Cr, Mn, Co, As, Sr, V и Cd у поређењу са другим тестираним ларвама. У полену се налази више Ca, Al, B, Rb, Cr, Ni, As, Ag, Sb и Cd него у обе врсте брашна од инсеката.

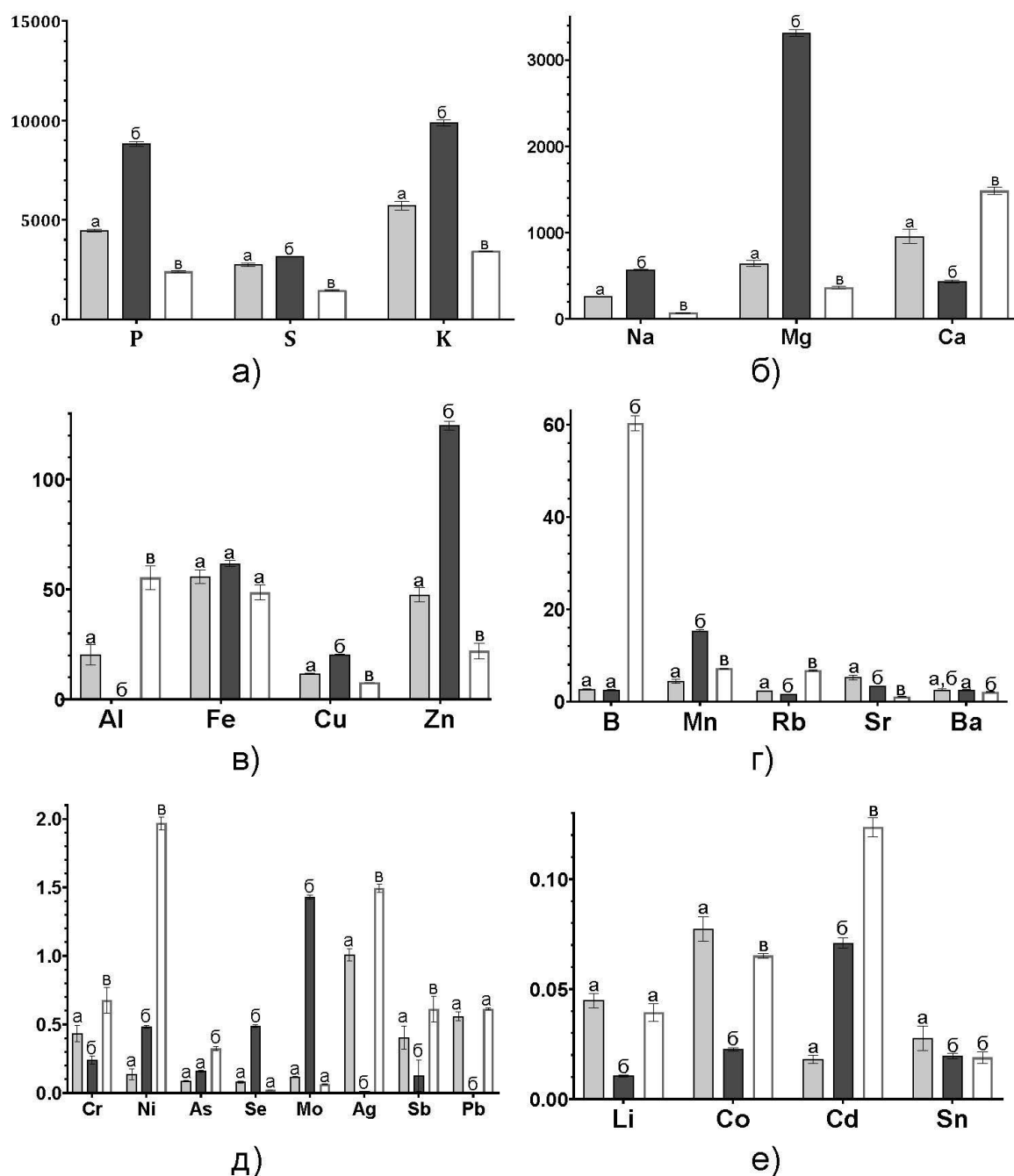
Неки од ових елемената (Al, Zn, Mn, Cr) имају позната антифунгална и антимикробна својства (254, 257–260). Трутовско брашно има веће концентрације већине елемената чији недостатак може бити повезан са појавом кречног легла и то: Al, Sr, Cr, Ag, Sb, Pb и Co, Слика 32. Само су концентрације Mn и Zn биле веће у брашну од великог брашнара. Поређењем елементарног састава трутовског и брашна од великог брашнара са саставом полена, види се да су концентрације Ba и Zn веће у брашну од инсеката. У полену се Ag обично налази у веома малој концентрацији (264, 265), али се у овде анализираном полену налази у знатно већој концентрацији. Ово сугерише да би се ове замене у храни могле да користе као потенцијалне антимикробне супстанце у кошници.

На основу елементарног састава и природног канибалистичког понашања пчела, може се закључити да трутовско брашно може бити погодна замена за полен, можда чак и боља од брашна од великог брашнара, које је у претходно описаним експериментима показало добре резултате. Пчеле у кавезима храњене са ТП су преживеле 28 дана у кавезу одржавајући телесну масу и највећу масу абдомена у поређењу са другим тестираним групама и показујући укупно најбољи резултат у поређењу са другим тестираним хранама.

Уклањање трутовског легла има већ добро познате предности, смањује зараженост вароом, истовремено смањујући употребу пестицида и уколико се саће претапа добија се висококвалитетан восак (88, 266, 267). Поред тога, има потенцијал за

нову намену која је потребна сваком пчелару, а то је замена за полен. Трутовско брашно би могло да се користи у периоду када у природи нема довољно полена. Пчелиње легло је одличан извор многих хранљивих супстанци и богато је протеинима, мастима и угљеним хидратима (162). Такође је добар извор минерала, што је показано и у овој студији. Одвајање ларви и лутки од воска је једноставан метод који сваки пчелар може спровести користећи једноставну опрему из домаћинства.

■ Трутовско легло ■ Ларве великог брашнара □ Полен



Слика 32. Концентрација елемената (mg/kg) у сувој маси брашна од трутовског легла, брашна од ларви великог брашнара и полена сакупљеном на истом пчелињаку где је сакупљено и трутовско легло; Различита слова изнад стубића показују статистички значајну разлику у концентрацији појединачних елемената између различитих узорака.

Јединке варое су 5 до 12 пута бројније у трутовском леглу у поређењу са радиличким леглом (96). Оне се радије размножавају у трутовском леглу и привучене су њиме. Непосредно пре него што пчеле затворе легло, вароа улази у њега и почиње да се храни и размножава. Како развој трутова траје дуже него развој радилица, вароа производи више потомства у трутовском леглу него у радиличком. Тако се уклањањем затвореног трутовског легла из заражене заједнице уклања несразмерно велики удео јединки варое из популације унутар пчелиње заједнице без утицаја на величину радиличке популације или производњу меда (86, 88, 266).

Сили (2002), је открио да заједнице са више трутовског саћа производе мање меда (267). Међутим, он сугерише да обезбеђивање колонија трутовским саћем може и даље бити пожељно, јер пракса уклањања трутовског легла ради убијања варое може у великој мери елиминисати негативне последице трутовског саћа на принос меда (267). Он процењује да пчелиња заједница троши око 15-20 kg меда годишње на узгој и одржавање трутова. Око 8 kg меда користе трутови за летове у потрази за матицама за спаривање и ова количина меда се може уштедети ако се уклони затворено трутовско легло (267). Ово показује да узгој трутова смањује ресурсе пчелиње заједнице, посебно храну потребну за узгој трутовског легла и синтезу пчелињег воска. Пчелињи восак се може претопити и поново користити, али се све трутовске лутке и ларве обично одбацују.

Укупна маса прикупљеног трутовског легла по пчелињој заједници је 1064 g (268), из чега се може на основу овде изнетих података проценити да се из сваке кошнице годишње може добити најмање 200 g трутовског брашна. Ова количина протеина, липида и микронутријената треба да буде више него довољна за исхрану кошнице током периода недостатка полена. Колико је познато, једина негативна страна канибалистичког понашања пчела је то што оно доприноси ширењу вирусне болести деформисаних крила (енг. „*deformed wing virus disease*“) (269). Због тога би вода у којој се топи трутовско легло требало да кључа, што је свакако део процеса приликом одвајања воска од трутовских ларви и лутки, да би се спречило ширење пчелињих вируса.

3.8 Закључци

- Медоносне пчеле могу да користе хранљиве супстанце из брашна великог брашнара као замену за полен,
- Пчеле када се хране различитом храном имају различиту масу тела и делова тела, која није директно условљена количином унете хране,
- Пчеле производе различите изоформе протеаза и амилаза када се хране различитим храном,
- Ензимска активност (амилазе и протеазе) се мења током живота,
- Пчеле прерађују сахарозни и инвертни сируп на различит начин услед чега се добијени мед разликује у саставу шећера и садржају ензима,
- Пчеле додају више амилазе у сахарозни сируп него у инвертни сируп.
- Показано је да у кавезима превелика количина воде у храни доводи до повећања масе црева и целих пчела, услед чега пчеле дефецирају унутар кавеза или престају да се хране што повећава морталитет,
- Уколико нема могућности за прочисни лет, најбоље је пчеле хранити храном са што мање несварљивих честица и са што мањим садржајем воде (нпр. инвертни сируп исте густине као мед),
- Код пчела храњених инвертним сирупом нема појаве кристала у саћу,
- Инвертни сируп је боља опција за прихрану пчела од сахарозног сирупа уколико се користи сируп максималне густине.
- Изоелектрична тачка α -глукозидазе III је 6,63,
- Исхрана сиромашна микроелементима је повезана са болешћу кречног легла,
- Брашно од трутовског легла има разноврснији елементарни састав у односу на брашно од великог брашнара што оправдава будућа истраживања на употреби ове замене за полен у исхрани пчела,
- Поређење ензимских профила у средњем цреву пчела и елементарног састава хране могу бити корисни поступци да се убрза избор нових замена у пчелињој исхрани.

4. Експериментални део

Списак коришћене опреме:

Аналитичка вага „Shimadzu AX200“
Аутоклав „Fedegari Autoklaven AG FVG3“
Аутосамплер „Agilent ASX-500“
Вертикална мини када домаће израде
Вибрациона мешалица „Tehtnica EV-100“
Водени инкубатор „JeioTech LabCompanion BW-20H“
Индустријска фритеза „ATALAY E AEF-360“
Инкубатор „Mettmert INB 300“
Исправљач „Pharmacia Biotech EPS 3500“
Исправљач „Pharmacia ECPS 2000/300“
Када за вертикалну електрофорезу „Hoefer SE260“
Када за хоризонталну електрофорезу „Pharmacia LKB Multiphor II“
Кондуктометар „WTW LF521, InoLab“
Лиофилизатор „Christ Gamma 1-16 LSC“
Магнетна мешалица „IKA Mag Rec G“
Масени спектрометар „Agilent 7700 Series ICP-MS“
Микроталасни дигестор „Milestone SCI ultraCLAVE IV MLS GmbH“
Проточни водени термостат „Pharmacia Biotech, Multitemp III“
Прилагођени инкубатор домаће производње са контролом температуре и влажности.
Систем за HPLC „Thermo Scientific UltiMate 3000“
Спектрофотометар „Shimadzu UV1800“
Техничка вага „Mettler PE 3600“
Универзални млин „IKA M20“
Центрифуга „Eppendorf miniSpin plus“
Центрифуга „Thermo Scientific SL 40R“
pH метар „InoLab pH7110“

4.1 Нове замене за полен

4.1.1 Гајење ларви великог брашнара и производња брашна

Ларве великог брашнара, коришћене за кавезне експерименте (*T. molitor*) су купљене од локалног продавца хране за кућне љубимце, па умножаване на пшеничним мекињама у које су додавани комади јабука, наранџи и купуса. Ларве су просејаване, при чему су одвајане најкрупније, а затим сушене до 40% почетне масе. Од њих је млевењем направљено брашно помоћу „IKA M20“ универзалног млина.

Ларве великог брашнара коришћене за одређивање елементарног састава у овом раду су узгајане у Лабораторији за ентомологију, Пољопривредног факултета, Универзитета у Новом Саду. Циклус узгоја је почео са 10 одраслих јединки које су стављене на супстрат за исхрану који је био мешавина пшеничних мекиња (95%) и пивског квасца (5%). Смеша је равномерно распоређена у стандардну пластичну посуду за узгој инсеката димензија 10x50x60 cm. Тацне су стављене у климатизовану комору на 26 °C и 60% релативне влажности. Одрасле јединке су остављене 7 дана на одабраној мешавини да би се париле и положили јаја. После седам дана одрасле јединке су уклоњене из тацне и посуде су враћене у климатизовану комору како би јаја завршила

ембриогенезу и како би се излегле ларве. Ларве су храњене свежим кришкама јабуке три пута недељно које су им служиле као извор влаге. После 30 и 60 дана након уклањања одраслих јединки, хранљиви супстрат је просејан, а при томе је додавана свежа храна. Циклус узгоја је трајао 90 дана.

Након 90 дана ларве су просејане из хранљивог супстрата и стављене у чисту посуду ради пражњења црева. Гладовање је трајало 24 h, а затим су ларве просејане да би се уклонио измет. Ларве су испране под текућом водом, а затим стављене у индустријску фритезу АЕФ-360 у кључалу воду на 100 °C. Ларве су бланширане у кључалој води 180 секунди, а затим су стављене на посуде за сушење 30 минута. Бланширане ларве су затим осушене и самлевене у брашно.

4.1.2 Узгој трутовског легла и припрема брашна

Из пет пчелињих друштава је сакупљено укупно 1,50 kg трутовског легла. Да би се уклонио восак, уклоњено трутовско легло је прокувано у 4,5 L воде. Чим је вода прокључала, мешавина воде, воска, ларви и лутки је процеђена. Затим је исти поступак поновљен још једном са 3 L воде. Ларве и лутке су оцеђене и осушене, а затим самлевене.

4.2 Гајење пчела, узимање и припрема узорака

У овом раду су узорци сакупљани за више различитих намена, па се због тога и поступак узорковања разликује, што је у наставку описано.

4.2.1 Гајење медоносне пчеле у лабораторијским условима

Оквир са поклопљеним леглом пред извођење је стављен у кутију прилагођену за ту намену, а потом у инкубатор (прилагођени инкубатор за кокошија јаја са контролом температуре и влажности), на 34 °C и 80% влажности ваздуха.

После 24h изведени адулти су сакупљани и паковани у кавезе димензија 12x12x9 cm. У сваком кавезу се налазило по парче изграђеног саћа и погача умотана у приањајућу фолију (за поређење замена за полен) или вајла са сирупом (за поређење замена за нектар). На сваком кавезу се налазила вајла са чесменском водом коју су пчеле користиле по потреби. Кавези су са доње и горње стране имали металне мреже које су омогућавале вентилацију. Два пута недељно је мењана вода, а угинуле пчеле су вађене са дна кавеза. У кавезе је паковано по 10 g пчела, што је отприлике 100 пчела.

4.2.2 Исхрана радилица у кавезима

Ради поређења замена за полен пчеле радилице су храњене са четири различите погаче. Погаче које су стављане у кавезе су добијене мешањем исте комерцијалне погаче и различитих додатака. Састав погача је приказан у Табели 1.

Комерцијална погача произвођача „Medica Plus“ – Јарковац је припремљена мешањем шећера у праху и инвертног сирупа. Полен, пореклом од различитих локалних биљака (што се види по различитој боји поленових зрна), је сакупљен помоћу сакупљача полена постављеним на улазу у кошницу на локалном пчелињаку. Полен је затим сушен и чуван у замрзивачу до мешања са комерцијалном погачом. Ларве великог брашна су гајене и од њих је добијано брашно што је детаљно описано у поглављу 4.1.1. Произвођач инактивисаног пивског квасца је „БИП“ – Београд. Полен, квасац и брашно од ларви великог брашна су аутоклавирани (Fedegari Autoklaven AG FVG3) на 121 °C и 106 kPa током 20 мин.

Ради поређења одабраних замена за нектар пчелама је у вајле на врху кавеза сипан 65% сахарозни или 65% инвертни сируп. Инвертни сируп је добијен ензимском хидролизом сахарозног сирупа помоћу ензима инвертазе (β -d-фруктофуранозид фруктохидролаза, ЕС 3.2.1.26) пореклом из пекарског квасца *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2.3 Сакупљање ларви и мумија кречног легла

Кошнице су прво прегледане да би се одабрале заједнице сличне јачине са и без симптома болести кречног легла. Затим су из оквира оболелих заједница узимане ларве и мумије, а из здравих заједница су узимане ларве. Ларве и мумије су сакупљане помоћу пинцете, према претходно описаним критеријумима у поглављу 3.2.3.

4.2.4 Сакупљање излетница на лету кошнице

Ради карактеризације α -глюкозидаза пчеле су хватане на улазима у кошнице. Из пет различитих кошница је ухваћено по нешто више од 100 пчела, а затим је направљен збирни узорак у коме је било нешто више од 500 пчела.

4.2.5 Дисекција и припрема сировог екстракта средњег црева пчела радилица

У кавезним експериментима је након 7, 14, 21 и 28 дана гајења узимано по 15 пчела из сваког кавеза и жртвовано на леду. Пчеле су претходно имобилизоване 30 мин. на 4 °C, а затим дисековане. Средње и задње црево су одвајани заједно са жаоком од остатка пчеле, помоћу пинцете. Пошто је коришћен велики број пчела оне су дисековане у групама од 15 или 50. Прво су одстрањивана црева из појединачних група пчела, па ређана на хладну стаклену плочу, а затим су скалпелом одвајани делови црева. Посебно је узорковано средње, а посебно задње црево. Остатак тела пчела је чуван ради осталих мерења. Средња и задња црева су хомогенизована појединачно у охлађеном авану са тучком, 0,9%-ним натријум-хлоридом у хладном 20 mM ацетатном пуферу pH 6,0 . Однос ткива и пуфера за хомогенизацију је био 1 g : 2,5 mL. Након хомогенизације, хомогенати су екстраховани 90 минута у фрижидеру, а након тога центрифугирани 60 s на 14500 x g. Липидни колач са површине после центрифугирања није узет. Талог је реекстрахован 60 минута у фрижидеру са два пута већом запремином пуфера. Реекстракт је исцентрифугиран. Екстракт, реекстракт и талог су замрзнути и чувани на -20 °C. Главе су хомогенизоване на исти начин, али је однос ткива и пуфера за хомогенизацију је био 1 g : 5,0 mL.

Пуфер за хомогенизацију је припремљен на следећи начин:

20 mM ацетатни пуфер pH 6,0:

Глацијална сирћетна киселина	1,14 mL
дестилована вода до	1 L
pH је подешен на 6,0 титровањем са	1 M NaOH.

4.2.6 Гел хроматографија и ултрафилтрација

Пре ултрафилтрације су узорци (екстракт средњег црева, екстракт главе и растворен мед) разблажени помоћу 50 mM ацетатног пуфера pH 5,5 (мед 1:3, средње

црево и глава 1:1), па центрифугирани 20 мин. (10 000 rpm), на 4 °C, да би се уклонио талог.

Затим су ултрафилтрцијом (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, 10KDa) уклоњени мали молекули, а узорци су сконцентровани. Узорци су центрифугирани док се нису избистрили и престали да буду вискозни (5 000 rpm, 4 °C, до запремине од 7 mL).

Гел хроматографија рађена је на FPLC систему. Коришћен је Sephacryl S 300 HR матрикс. Запремина колоне била је 300 mL. Колона је еквилибрисана 20 mM ацетатним пуфером pH 5,5. На колону је нането по 5 mL узорка. За елуирање је коришћен 20 mM ацетатни пуфер pH 5,5. Сакупљане су фракције од по 5 mL. Проток је био 1,5 mL/min.

4.3 Утицај одабраних замена на морталитет, потрошњу хране и масу радилица

Морталитет пчела, у сваком кавезу, је рачунат на основу односа броја угинулих пчела у току експеримента и укупног броја пчела на почетку експеримента.

4.3.1 Мерење масе пчела и потрошње хране

Средње и задње црево су уклоњени заједно са жаоком. Сирова маса пчела је мерена после уклањања црева. Потрошња чврсте хране (погача) и маса црева је мерена на техничкој ваги "Mettler PE 3600" (тачност 0,01 g). Сирова маса пчела и појединачних сегмената (глава, торакс и абдомен) је мерена на аналитичкој ваги "Shimadzu AX200" (тачност 0,0001 g).

Петност пчела или црева из једног кавеза је мерено после 7, 14, 21 и 28 дана. За мерење делова тела је узимано између 5 и 15 пчела из једног кавеза (већина узорака који су мерени се састојао од 12 -15 пчела, али је у пар случајева узорак чинило само 5-10 пчела). Пчеле или делови пчела умазани фецесом или оштећени приликом уклањања црева су одбацивани пре мерења масе. Сви резултати мерења масе представљају средњу вредност 5 узорака из пет различитих кавеза из једне групе исто храњених пчела.

Потрошња течне хране је читавана са вајли напуњених сирупом и постављених на врху кавеза после 7, 14, 21 и 28 дана.

4.4. Утицај састава шећерног сирупа на његову прераду

4.4.1 Одређивање густине сирупа и праћење кристализације у саћу

Густина сирупа је израчуната на основу измерене масе и запремине. Маса је мерена на техничкој ваги "Mettler PE 3600", а запремина читавана са градуисаних вајли.

Након завршеног експеримента сво саће је извађено из кавеза, а затим су све ћелије које су пчеле напуниле сирупом визуелно прегледане да би се у тврдило да ли је дошло до појаве кристала.

4.4.2 Квантификација сахара у сирупу HPLC методом

Анализа сахарозног и инвертног сирупа, којим су пчеле храњене у кавезима, као и „меда“ који су пчела направиле од ових сирупа после 28 дана је урађена течном хроматографијом под високим притиском (HPLC).

4.4.2.1 Припрема стандарда

Стандардни раствори глюкозе, фруктозе и сахарозе су припремљени у концентрацији од 20 mg/mL у 60% раствору ацетонитрила. Свежи раствори стандарда су припремљени непосредно пре анализе и чувани на 4 °C.

4.4.2.2 HPLC анализа

Анализа је рађена на „Ultimate 3000 Thermo Scientific“ систему са аутосамплером, коришћењем „RefractoMax 520“ детектора за детекцију индекса рефракције. Хроматографско раздвајање урађено је на „Shodex Asahipak NH2P-50 4E“ колони (4,6 x 250 mm), са предколоном „Shodex Asahipak NH2P-50G 4A“ (4,6 x 10 mm).

Запремина инјектованог узорка износила је 10 µL за стандарде и 20 µL за испитиване узорке. Колонa је еквилибрисана на 35 °C, а затим је та температура стално одржавана током анализе.

Мобилна фаза састојала се од ацетонитрила и воде (60:40 (V/V)). Раздвајање и детекција сахараида је трајала 40 мин. Сахариди су елуирани изократски са протоком од 0,5 mL/min. Прикупљени подаци су анализирани помоћу програма Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher Scientific, САД).

4.5 Утицај одабраних замена за полен и нектар на профил дигестивних ензима

4.5.1 Одређивање ензимских активности

Амилазна и инвертазна активност у узорцима је одређивана употребом ДНС-а. Укупна протеолитичка активност одређивана је ТНБС поступком.

4.5.1.1 Одређивање амилазне и инвертазне активности

Потребни раствори:

1. ДНС (динитросалицилни реагенс)

ДНС је направљен мешањем раствора А и Б.

Раствор А (0,4 М динитросалицилна киселина у 0,4 М NaOH): 8 g натријум хидроксида и 5 g 3,5-динитро-салицилне киселине је растворено у води до запремине од 100 mL.

Раствор Б (тартаратни раствор): 150 g калијум-натријум тартарата је растворено у води до запремине од 250 mL.

Раствор Б се дода у раствор А и допуни водом до 500 mL.

2. Малтозни стандард, 10 mM:

Малтоза	3,42 mg
вода до	10 mL

3. Глукозни стандард, 10mM:

Глукоза	18 mg
вода до	10 mL

4. Ацетатни пуфер pH 5,5, 50 mM:

гласијална сирћетна киселина	1,42 mL
NaOH (0,1M)	до pH 5,0
вода до	500 mL

5. Калцијум-хлорид (100 mM):

CaCl ₂	1,1 g
вода до	100 mL

6. Натријум-хлорид (100 mM):

NaCl	0,58 g
вода до	100 mL

7. Скробни раствор (1%):

растворни скроб	3,0 g
CaCl ₂ (5)	30 μ L
NaCl (6)	60 μ L
ацетатни пуфер pH 5,0 (4) до	300 mL

8. Раствор сахарозе (0,3 M):

Сахароза	5,13g
ацетатни пуфер pH 5,5 (4) до	50 mL

Поступак за одрађивање амилазне активности:

У епрувете је сипано по 50 μ L екстракта средњег црева пчела из ШП, КП, ПП и ТП групе после гајења у току 7, 14, 21 и 28 дана. Затим је додато по 450 μ L раствора 7. Епрувете су пребачене у водено купатило на 35 °C. Реакција је прекинута после 10 минута додатком 500 μ L ДНС-а. Узорци су затим грејани 5 мин. у кључалој води, па охлађени у хладној води. Садржај епрувета је разблажен са по 4 mL воде, а затим измешан на вибрационој мешалици. Апсорбанција је мерена на 540 nm. Слепа проба је добијена на исти начин, али је прво узорку додат ДНС, а затим раствор 7. За одмерену вредност A^{540} се са стандардне праве очита концентрација редукујућих шећера, односно малтозе, на основу које се израчунава амилазна активност (U/mL).

Поступак за одређивање инвертазне активности:

Инвертазна активност је одређивана помоћу 0,3 M раствора сахарозе у ацетатном пуферу (pH 5,5) и ДНС-а. У епрувету се сипа 50 μ L ензима (екстракта средњег црева из ШП, КП, ПП, ТП, СС и ИС и глава из СС и ИС група пчела после гајења у току 7, 14, 21 и 28 дана., затим се сипа 450 μ L супстрата (раствор сахарозе у ацетатном пуферу). Након 5 мин. реакција се прекида додатком ДНС-а. Даљи поступак је исти као за одређивање амилазне активности.

Калибрациона крива за малтозу и глукозу

Разблаживањем раствора 2 (за стандардну праву за малтозу) или раствора 3 (за стандардну праву за глукозу) добијени су раствори концентрације 8, 6, 4, 2, 1 и 0,5 mM.

Прављење раствора стандардне серије за малтозу или глукозу:

Концентрација малтозе/глукозе (mM)	Запремина раствора 2/3 (mM)	Запремина воде (mM)
10,0	0,500	0,000
8,0	0,400	0,100
6,0	0,300	0,200
4,0	0,200	0,300
2,0	0,100	0,400
1,0	0,050	0,450
0,5	0,025	0,475
0,0	0,000	0,500

Од сваког раствора стандардне серије измерено је по 0,05 mL и урађен је тест ензимске активности као што је напред наведено, а затим је нацртана калибрациона крива (зависност A^{540} од концентрације редукујућих шећера).

Једна јединица амилазе/инвертазе је количина ензима која ослободи 1 μmol редукујућих шећера (обрачунато на малтозу/глукозу) у једном минути на 35 °C.

Израчунавање ензимске активности (U/mL):

Из података о концентрацији редукујућих шећера (C), реакционој запремини (Vr), запремини додатог ензима (Ve), времена трајања ензимске реакције (t) и разблажења додатог раствора ензима (R) може се израчунати ензимска активност (Ce) према формули:

$$Ce = \frac{C \cdot Vr}{t \cdot Ve} \cdot R$$

Специфична активност (U/mg) је број U по mg и израчунава се тако што се ензимска активност (U/mL) подели са концентрацијом протеина (mg/mL).

4.5.1.2 Одређивање протеолитичке активности

Потребни раствори:

1. 0,2 M Борна киселина

0,62 g борне киселине за 50 mL раствора
Дотитровати до pH 9,2 (чврст NaOH)

2. 15% трихлорсирћетна киселина

7,5 g трихлорсирћетна киселина
Вода до 50 mL

3. ТНБС (1,18 mg/mL)

0,059 g ТНБС
Вода до 50 mL

4. 2M NaH₂PO₄ и 18 mM Na₂SO₃

13,8g NaH₂PO₄ x H₂O
0,22g Na₂SO₃ x 7H₂O
Вода до 50 mL

5. 50 mM бикарбонатни пуфер pH 8,5

0,21 g NaHCO₃
Вода до 50 mL

6. 50 mM 1,0% желатин у фосфатном пуферу pH 8,0

0,5 g желатина
5 mL фосфатног пуфера pH 8,0
Вода до 50 mL

У епрувете је сипано по 50 µL узорка. Затим је додато по 500 µL раствора 6. Епрувете су пребачене у водено купатило на 35 °C. Након 30 минута реакција је прекинута додатком 275 µL раствора 2, а затим се додаје 900 µL раствора 1 и 500 µL раствора 3. Након 30 минута инкубирања на собној температури додаје се 500 µL раствора 4. Смеша се затим центрифугира, па мери апсорбанца на 420 nm. Слепа проба се добија када се помеша 550 µL пуфера + 275 µL трихлорсирћетне киселине.

За одмерену вредност A₄₂₀ се са стандардне праве (5 mg/mL, 7 mg/mL, 10 mg/mL, 12 mg/mL, 14 mg/mL, 16 mg/mL, 18 mg/mL, 20 mg/mL) очита концентрација аминокиселина, односно глицина, на основу које се израчунава укупна протеолитичка активност (U/mL).

4.5.2 Одређивање концентрације протеина по Брадфорду

1. Раствор боје CBV G-250

CBV G 250	100 mg
95% етанол	50 mL
H ₃ PO ₄	100 mL
Дестилована вода до	200 mL

Боја се раствори у етанолу, па се додају редом киселина и вода до финалне запремине.

2. Раствор говеђег серум албумина за стандардну праву 1 mg/mL се разблажује у опсегу 0,1 до 1,0 mg/mL:

говеђи серум албумин (1mg/mL) (μ L)	дест.вода (μ L)	финална конц. mg/mL
-	100	-
10	90	0,1
20	80	0,2
40	60	0,4
60	40	0,6
80	20	0,8
100	-	1,0

3. Брадфорд-ов реагенс:

Потребни раствори:

Раствор 1 100 mL

Дестилована вода до 500 mL

Свеже процеђени раствор је стабилан 2-3 недеље на собној температури.

Поступак: У 100 μ L раствора (узорак + пуфер) додаје се 5 mL разблаженог раствора боје. Промеша се на вибрационој мешалици. Након 5 до највише 30 минута мери се апсорбанција на 595 nm.

4.5.3 Електрофорезе

За раздвајање ензимских изоформи коришћена је нативна полиакриламидна гел електрофореза и ИЕФ . Док је за квантификацију количине протеина у цревима различито храњених пчела и проверу чистоће фракција после гел хроматографије коришћена SDS полиакриламидна гел електрофореза.

4.5.3.1 Нативна полиакриламидна гел електрофореза

Потребни раствори, начин припреме раствора и ток рада:

1. Мономерни раствор (30% Т, 2,7% Ц)². Ознака овог раствора у табели је АА:

акриламид	58,4 g
бисакриламид	1,6 g
дестилована вода до	200,0 mL

² Т је g акриламида + g бисакриламида у 100 mL раствора., Ц је g бисакриламида у односу на укупну масу акриламида и бисакриламида. Обе вредности се изражавају у процентима.

2. Пуфер за раздвајајући гел (1,5 М ТРИС-НСl, рН 8,8). Ознака у табlici је ТРИС рН 8,8:

ТРИС	36,3 g
дестилована вода до	200,0 mL
4 М НСl до	рН 8,8

3. Пуфер за концентрујући гел (0,5 М ТРИС-НСl, рН 6,8). Ознака у табlici је ТРИС рН 6,8:

ТРИС	6,0 g
дестилована вода до	100 mL
4 М НСl до	рН 6,8

4. Иницијатор (амонијум-персулфат) 10% m/V. Ознака овог раствора у табlici је АПС:

АПС	0,2 g
дестилована вода до	2,0 mL

5. Раствор за надслојавање (2-бутанол или *n*-бутанол засићен водом):

n-бутанол или 2-бутанол 100 mL
Дестилована вода до постојаног доњег слоја воде
Раствор се пре употребе промућка и остави да се слојеви раздвоје. Користи се горњи слој.

6. Пуфер за обраду узорака (ПУЗ):

Раствори за ПУЗ	за 25 mL, 3X ³
0,5 М ТРИС-НСl рН 6,8	9,38 mL
99% глицерол	7,5 mL
или 85% глицерол	9,0 mL
0,1% бромфенол-плаво	1,5 mL
Дестилована вода до	25,0 mL

Припрема узорака:

Узорци се мешају са пуфером за узорке (ПУЗ) у односу 2:1.

7. Пуфер за електрофорезу (0,025 М ТРИС, 0,192 М глицин, рН 8,3), радни пуфер и 10 пута концентрованији пуфер, који се до употребе чува замрзнут.

Компоненте	1 x
ТРИС	3,0 g
глицин	14,4 g
дестилована вода до	1,0 L

8. Раствор за фиксирање, бојење и обезбојавање (50% (V/V) метанол, 10% (V/V) сирћетна киселина):

метанол	500 mL
сирћетна киселина	100 mL
дестилована вода до	1 L

³ За разблажене узорке.

9. Раствор боје (0,1% (m/V) CBV, 50% (V/V) метанол, 10% (V/V) сирћетна киселина):

CBV G или R 250 0,5 g
Раствор 8 до 500,0 mL

10. Раствор сирћетне киселине, 7% (V/V) сирћетна киселина:

сирћетна киселина 70 mL
дестилована вода до 1 L

Припрема гела и поступак:

раствори	гел за раздвајање (10%)	гел за концентровање (4%)
АА	3,33 mL	0,66 mL
ТРИС pH 8,8	2,5 mL	-
ТРИС pH 6,8	-	1,25 mL
дестилована вода	4,0 mL	3,0 mL
ТЕМЕД	0,004 mL	0,005 mL
	дезаерација 5-10 минута	
АПС	0,05 mL	0,025 mL
Крајња запремина	10,0 mL	5,0 mL

Деаерисани раствор гела за раздвајање се сипа између две стаклене плоче, и надслоји раствором 5. Када се полимеризација доњег гела заврши, сипа се деаерисани раствор за концентрујући гел. У раствор се стави „чешаљ“. Када се заврши полимеризација горњег гела, извади се „чешаљ“, а настали „бунарчићи“ се оперу и у њих се нанесу узорци.

Услови електрофорезе: Напон је константан (80 V) док узорци не уђу у раздвајајући гел, затим се повишава од 150 до 400 V до краја рада или се кроз концентрујући гел пропушта струја константне јачине од 12 mA, а кроз раздвајајући гел струја константне јачине од 25 mA.

Детекција протеина се обавља CBV-ом R 250

Поступак бојења по фазама:

Фаза	раствор	време (мин)
испирање	Дестилована вода	1
фиксирање	8	20
бојење	9	20
обезбојавање	8	20
обезбојавање	10	преко ноћи

4.5.3.2 Натријум-додecilсулфат полиакриламидна гел електрофореза

Потребни раствори, начин припреме раствора и ток рада:

Потребни раствори су исти као за нативну електрофорезу (одељак 4.5.3.1) уз додатак раствора детергента који се припрема на следећи начин:

1. Раствор детергената 10% (m/V) SDS натријум додецил - сулфат:

SDS	10,0 g
дестилована вода до	100 mL

Пуфери који се разликују од оних за нативну електрофорезу се припремају на следећи начин:

2. Пуфер за обраду узорка (ПУЗ):

раствори за ПУЗ	за 25 mL, 3x
0,5 М ТРИС-НСl pH 6,8	9,38 mL
85% глицерол	9,0 mL
чврст SDS	1,5 g
0,1% бромфенол-плаво	1,5 mL
комерцијални β-меркаптоетанол	3,75 mL
дестилована вода до	25,0 mL

Припрема узорка:

Нерезблажени сирови екстракти средњег црева пчела храњених различитим погачама после 7 и 28 дана су исцентрифугирани 2 мин. (14500 x g). Помешано је по 20 µL узорка и 10 µL пуфера за узорке (ПУЗ), а затим је добијени раствор загреван 4 минута на кључалом воденом купатилу. Затим је нането по 20 µL добијеног раствора у „бунарчиће“ у гелу.

3. Пуфер за електрофорезу (0,025 М ТРИС, 0,192 М глицин, 0,1% SDS pH 8,3), радни пуфер и 10 пута концентрованији који се до употребе чува замрзнут.

Компоненте	1x
ТРИС	3,0 g
глицин	14,4 g
10% SDS	10,0 mL
дестилована вода до	1,0 L

Дезаерисани раствор гела за раздвајање се сипа између две стаклене плоче, и надслоји раствором 5. Када се полимеризација доњег гела заврши, сипа се дезаерисани раствор за концентрујући гел. У раствор се стави „чешаљ“. Када се заврши полимеризација горњег гела, извади се „чешаљ“, а настали „бунарчићи“ се оперу и у њих се нанесу узорци.

Услови електрофорезе: Напон је константан (80 V) док узорци не уђу у раздвајајући гел, затим се повишава од 150 до 400 V до краја рада или се кроз

концентрујући гел пропушта струја константне јачине од 12 mA, а кроз раздвајајући гел струја константне јачине од 25 mA.

Припрема гела:

Раствори	гел за раздвајање (10%)	гел за концентровање (4%)
AA	3,33 mL	0,66 mL
ТРИС pH 8,8	2,5 mL	-
ТРИС pH 6,8	-	1,25 mL
дестилована вода	4,0 mL	3,0 mL
ТЕМЕД	0,004 mL	0,005 mL
	дезаерација 5-10 минута	
SDS	0,10 mL	0,05 mL
АПС	0,05 mL	0,025 mL
крајња запремина	10,0 mL	5,0 mL

Након завршене електрофорезе, гел је обојен помоћу CBV R 250 боје као што је описано (у одељку 4.5.3.1) за нативну електрофорезу. Затим је гел анализиран програмом „ImageJ2”, помоћу кога су израчунате молекулске масе и интензитет протеинских трака.

Одређивање молекулске масе и удела протеина

Молекулска маса протеина израчуната је из стандардне праве ($y = -1,086x + 2,1355$; $R^2 = 0,9929$) која је направљена тако што је нацртан семи-логаритамски график зависности R_f вредности (x-оса) у односу на молекулску масу стандардних протеина (y-оса). R_f вредности за конструкцију стандардне праве и за циљане протеине су добијене из скениране слике користећи програм ImageJ и алат Measure distance.

Удео протеина је одређен употребом Image J програма и алата Measure Integrated density. Одређена је интегрисана густина сваког протеина на инвертованој слици гела након чега се добила укупна интегрисана густина свих протеина у узорку, а потом срачуната процентуална заступљеност сваког од њих.

4.5.3.3 Изоелектрично фокусирање

Изоелектрично фокусирање је урађено на Pharmacia LKB Multiphor II систему за електрофорезу према упутству произвођача.

Потребни раствори, начин припреме раствора и ток рада:

Припрема гела:

акриламид (30%)	3,75 mL
амфолити pI 2,0 – 6,0	1,0 mL
глицерол (50%)	4,0 mL
дестилована вода	6,75 mL
ТЕМЕД	12 μ L
	дезаерација пар минута
АПС	75 μ L

Након наливања између две стаклене плоче, раствор за полимеризацију се надслоји *n*-бутанолом претходно засићеним водом или уместо тога прекрије парафилмом. Након једног сата полимеризације сендвич се пажљиво отвори, а гел постави на хладњак. Хладњак се накваси дестилованом водом. Плоча се поставља тако да се течност равномерно распореди у облику филма испод плоче. Вишак раствора који плоча истисне уклони се папирном ватом. На гел се постављају папирне електроде натопљене електроодним растворима.

Електродни раствори:

Анодни електролит: 0,5% раствор електролита рН 5,0 – 7,0
Катодни електролит: 1М Н₃РО₄

Електродни папири се умоче у одговарајуће растворе и просуше у сендвичу од папирне вате. Тако припремљене траке се ставе на гел, а платинске електроде преко њих. Радна температура је 10 °С. Струја је 1000V, 50mA, 7W, а време је 1,5h.

Припрема и наношење узорка:

За анализу амилаза и протеаза је наношено по 20 µL 10 пута разблаженог узорка, а за α-глюкозидазу по 40 µL узорка.

Фокусирање:

Фаза	U (V)	I (mA)	P (W)	време (мин)
фокусирање	до 1000	до 50	3	90
крај	до 1000	до 50	4	15

Након фокусирања гел је принтован, тако што је на њега постављан гел са супстратом, 2 филтер папира и папирна вата, па стаклена плоча и тег. У супстратном гелу се затим зимограмски детектују различити ензими. За различите ензиме је био уграђен различит супстрат у гел што је описано у поглављу 4.5.4.

4.5.4 Зимограмска детекција

Зимограмска анализа је техника која је коришћена за детекцију ензимске активности у гелу након електрофорезе. У првој фази се електрофоретски гел принтује на супстратни гел, или се електрофоретски гел потапа у супстрат. У другој фази се гел инкубира при чему ензим реагује са супстратом, а у трећој фази се гел боји.

4.5.4.1 Зимограмска детекција α-амилазе

За амилазни зимограм, гел се по завршетку електрофорезе пренесе у стаклену посуду где се амилаза детектује по следећој процедури:

Потребни раствори:

1. 10 mM калцијум-хлорид:

CaCl₂ 1,1g
вода до 100 mL

2. 100 mM натријум-хлорид:

NaCl	0,58 g
вода до	100 mL

3. 50 mM ацетатни пуфер pH 5,5; 0,1, mM CaCl₂; 2mM NaCl:

гласијална сирћетна киселина	1,42 mL
0,1 M NaOH	до pH 5,0
CaCl ₂ (1)	0,5 mL
NaCl (2)	1 mL
вода до	500 mL

4. 1% скробни раствор, 0,1 mM CaCl₂, 2 mM NaCl:

растворни скроб, 1%	3,0 g
CaCl ₂ (1)	30 µL
NaCl (2)	60 µL
ацетатни пуфер, pH 5,0 (3)до	0,3 L

5. Јодни реагенс:

KI	2,2 g
I ₂	1,1 g
вода до	100 mL

6. Тинктура јода:

KI	4 g
I ₂	5 g
Вода	10 g
етанол до	100 mL

Поступак:

(А) За гел после нативне електрофорезе, дебљине 1 mm (детектовање амилаза у меду који су пчеле произвеле у кавезима од инвертног и сахарозног сирупа):

(А)	Фаза	време и температура
1	испирање водом	2-5 мин
2	испирање пуфером (3)	2 мин
3	1% скроб (4)	30 мин на 30 °C
4	испирање водом	2 мин
5	кратко испирање пуфером (3)	1 мин
6	испирање пуфером (3)	30 мин на 30 °C
7	испирање водом	5 пута по 30 секунди
8	јодни реагенс (5), 5 пута разблажен	до појаве просветљења на гелу
9	тинктура јода (6), 10 пута разблажена	1 мин до изоштравања трака добијених у фази 8
10	испирање водом	

(Б) за гел после ИЕФ-а, дебљине 1 mm (детектовање амилаза у екстрактима средњег црева код пчела храњених различитим погачама):

(А)	Фаза	време и температура
1	испирање водом	2-5 мин
2	испирање пуфером (3)	20 мин
3	0,5% скроб у пуферу; 2 пута разблажен раствор (4)	15 мин на 30 °C
4	испирање водом	2 мин
5	кратко испирање пуфером (3)	1 мин
6	испирање пуфером (3)	20 мин на 30 °C
7	испирање водом	5 пута по 30 секунди
8	јодни реагенс (5), 10 пута разблажен	до појаве просветљења на гелу
9	тинктура јода (6), 100 пута разблажена	1 мин до изоштравања трака добијених у фази 8
10	испирање водом	

4.5.4.2 Симултана зимограмска детекција α -амилазе и глуко-амилазе

Сви екстракти црева су 5 пута разблажени. Нането је по 20 μ L узорка. Потребни раствори, начин припреме раствора и ток рада:

Декстрински гел (0,8%) за 15 mL:		
АА		3,75 mL
50 mM ацетатни пуфер pH 5 + 2mM NaCl + 0,1 mM CaCl ₂		3,75 mL
10% раствор β -граничних декстрина		1,20 mL
вода		6,15 mL
	Дезаерација 5 мин.	
ТЕМЕД		10 μ L
АПС		125 μ L

После завршене електрофорезе гел се истовремено принтује на нитроцелулозну мембрану где се детектује глуко-амилаза и на гел са кополимеризованим β -граничним декстринима где се детектује α -амилаза.

Сендвич се састави тако да је гел после електрофорезе у средини. Испод њега се постави гел са декстринима, а на електрофорезни гел мембрана. На мембрану се поставе 2 филтер папира и папирна вата, сендвич се покрије стакленом плочом и постави се тег. Принт на мембрану траје 80 минута на собној температури после чега се мембрана скида и развија се зимограм.

Зимограмска детекција глуко-амилазе (на мембрани):

Потребни раствори:

1. 4-хлор- α -нафтол

4-хлор- α -нафтол	6 mg
Метанол	1 mL

2. 1% скроб у пуферу (50 mM ацетатни пуфер pH 5,5)

Скроб	0,5 g
50 mM ацетатни пуфер pH 5,5	до 50 mL

3. ПАП реагенс (Infinity™ Glucose (Oxidase) Reagent, Thermo Fisher Scientific)

Глукозо-оксидаза: >15 000 U/L
Пероксидаза: >100 U/L
4-аминоантипирин: 0,5 mmol/L
4-хидроксибензоева киселина: 10 mmol/L
Фосфатни буфер: 119 mmol/L

Поступак:

Супстрат се раствори у метанолу па се помеша са раствором скроба и прелије преко мембране. Затим се дода ПАП реагенс и остави на тамном месту до појаве љубичастих трака. Инкубација са реагенсом траје 80 минута на 37 °C, па преко ноћи на 25 °C.

Други део сендвича (електрофорезни гел и декстрински гел) се поквасе и прекрију фолијом и овај принт се инкубира на 37 °C још 80 минута.

Детекција α-амилазе (у декстринском гелу):

Декстрински гел је испран у ацетатном пуферу pH 5,5, па инкубиран у пуферу 30 мин. на 37 °C.

Гел се боји раствором јода.

Раствор за бојење:

I ₂	200 mg
KI	2 g
вода до	500 mL

Добија се тамноплаво обојени гел са необојеним тракама на местима де је α-амилаза хидролизовала декстрине.

У електрофорезном гелу се са скробом детектују све амилазе по процедури за зимограмску детекцију амилаза (4.5.4.1).

4.5.4.3 Зимограмска детекција протеаза

Након ИЕФ-а гел је преклопљен супстратним гелом са желатином (60 мин.). Капиларни трансфер са гела за изоелектрофокусирање на гел за детектовање се постиже постављањем супстратног гела на ИЕФ гел. На горњи гел се постављају два филтер папира и папирни убриси истих димензија. Све заједно је равномерно притиснуто стакленом плочом и тегом (приближно 0,5 kg).

Супстратни гел (15 mL):

АА	5 mL
ТРИС рН 8,8	3,75 mL
вода	4,5 mL
желатин (1% у води)	1,5 mL
ТЕМЕД	6 µL
АПС	75 µL

Након тога супстратни гел је инкубиран 30 мин. на 35 °C у влажној средини у 75 mM ТРИС-НСl пуферу рН 8,8, а затим обојен.

4.5.4.4 Зимограмска детекција α-глюкозидазе и β-фруктофуранозидазе

Након ИЕФ-а гел је испран 2 пута по 3 min дестилованом водом, а затим је пребачен на 5 мин. у пуфер (50 mM ацетатни пуфер, рН 5,0). Затим је гел инкубиран 30 мин у супстрату (раствор сахарозе (5%) у 50mM ацетатном пуферу, рН 5,0) на 35 °C. Реакција је прекинута 0,3 M раствором NaOH, а добијени производи ензимске реакције (редукујући шећери) су детектовани раствором НБТ-а раствореног у 0,3 M NaOH до крајње концентрације 1 mg/mL. Нерастворни комплекс који је настао између НБТ -а и редукујућих шећера је плаво љубичасте боје.

4.6 Карактеризација α-глюкозидазе

4.6.1 Ензимски есеј са рафинозом и танкослојна хроматографија

Помешано је 15 µL 10 пута разблаженог узорка (ултрафилтрацијом пречишћен и сконцентрован екстракт главе, средњег црева, меда и пречишћене β-фруктофуранозидазе изоловане из квасца *Saccharomyces cerevisiae*) и 135 µL рафинозе (1 mg/mL). Реакција је трајала 30 мин. на 35 °C, а прекинута је кувањем 3 мин. у кључалој води. Добијени узорци су нанети на плочу за танкослојну хроматографију.

За TLC анализу коришћене су плоче димензије 4.5 cm × 6 cm (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Дармштат, Немачка). Наношено је по 1 µL узорка и стандардних шећера. Рађено је на собној температури (22±2 °C). За визуелизацију добијених шећера коришћен је раствор α-нафтола праћен грејањем плоча 5 min на 150 °C.

Потребни раствори за танкослојну хроматографију:

Мобилна фаза

Мобилну фазу чине n-бутанол/етанол/вода/сирћетна киселина (5:3:2:0,5; V/V/V/V).

Раствор стандарда

Концентрација стандардних шећера (рафинозе и глюкозе) је 1 mg/mL.

Раствор за визуелизацију (раствор α-нафтола)

α-нафтол	0,5 g
етанол (96%)	95 mL
сумпорна киселина	5 mL

α -нафтол се раствори у 80 mL етанола, затим се дода 5 mL концентроване H_2SO_4 и допуни етанолом до 100 mL.

4.6.2 Одређивање pI α -глюкозидазе помоћу ИЕФ

Изоелектрично фокусирање је урађено као што је описано у поглављу 4.5.3.3, али су коришћени различити амфолити и електродни раствори:

Анодни електролит:	150 mM NaOH
Катодни електролит:	70 mM H_2SO_4

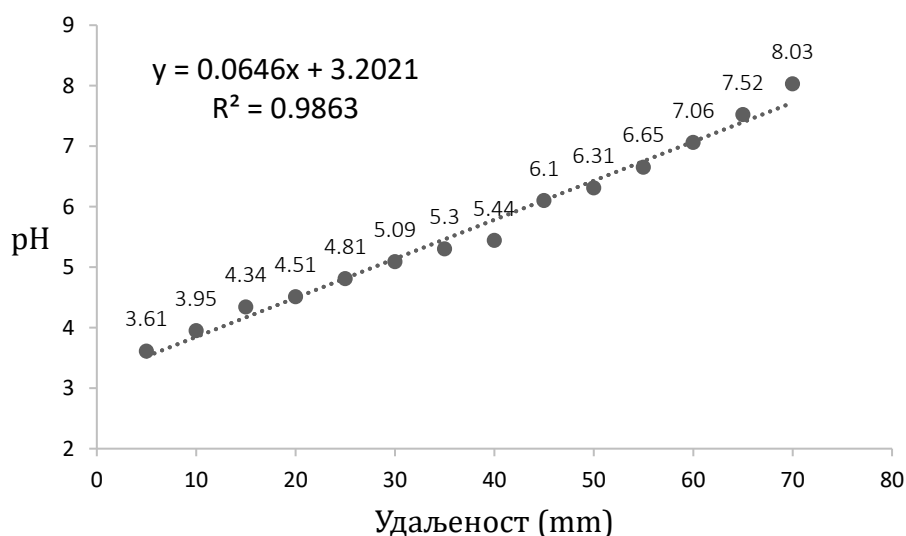
Припрема гела (7.5%):

акриламид (30%)	3,75 mL
амфолити pI 3,5 – 9,5	0,75 mL
глицерол (50%)	4,0 mL
дестилована вода	6,5 mL
ТЕМЕД	12 μL

дезаерација пар минута

АПС	75 μL
-----	------------------

Зимограм је урађен као што је описано у поглављу 4.5.4.4. Приликом наношења узорака на ИЕФ-гел један бунар је остављен празан, а затим је након завршеног ИЕФ одсечено припадајуће парче гела, па исечено на парчиће димензије 0,5 x 0,7 mm.



Стандардна права зависности pH вредности од положаја у гелу након ИЕФ-а. Изнад стандардне праве су назначене измерене pH вредности у деловима гела.

Парчићи гела су потапани у засебне вајле у 7 mL дестиловане воде, кључале па охлађене да би се из ње уклонио CO_2 . Након тога се гел на шејкеру мешао 90 мин. са дестилованом водом, а након тога је у свакој вајли измерен pH. На основу измерених делова гела и pH вредности у њима је нацртана график са кога је очитана pI вредност, пошто је претходно положај трака одређен помоћу програма ImageJ2.

4.7 Елементарни састав пчелињег легла и пчелиње хране

Концентрације елемената у пчелињем леглу и пчелињој храни је одређивана помоћу масене спектрометрије са индуковано-куплованом плазмом (ICP-MS, енг. „*inductively coupled plasma mass spectrometry*“).

4.7.1 Потребни раствори и стандарди

Да би се добила пречишћена вода (18.2 МΩ cm) коришћен је систем „Milli-Q“ (Merck Millipore, Дармштат, Немачка).

Азотна киселина, HNO₃ (Rotipuran p. a. ≥ 65%, Carl Roth, Карлсруе, Немачка) је прокувана помоћу „MLS duoPUR“ (Milestone, Лојткирх, Немачка) система за пречишћавање, пре употребе за припремање узорак.

За интерни стандард и припрему калибрационих стандарда су кориштени „ICP Single-Element Standards Certipur“ (Merck Millipore, Дармштат, Немачка) и „Single Element Standards for ICP“ (Carl Roth, Карлсруе, Немачка).

Полипропиленске вајле од 15 и 50 mL „Cellstar“, (Greiner Bio-One International GmbH, Кремсминстер, Аустрија) су коришћене за припрему свих раствора.

4.7.2 Припрема узорак

Узорци су припремани тако што је у сваку кивету је сипано по 100 mg лиофилизованих и хомогенизованих ларви или мумија кречног легла, или лиофилизованог брашна од трутова и великог брашнара и 5 mL концентроване HNO₃. Затим су узорци дигестовани у микроталасном систему за дигестију „ultraCLAVE IV MLS GmbH“ (Milestone, Лојткирх, Немачка).

Дигестија је обављана уз истовремено присуство три следеће пробе (5 mL концентроване HNO₃) и три референтна материјала, по 250 mg праха од говеђих мишића „BOVM-1“ (од. енг. „*bovine muscle powder*“, NRC, Canada) у 5 mL концентроване HNO₃. После дигестије узорци су остављени да се охладе, пребачени у вајле од 50 mL, па разблажени помоћу пречишћене воде до крајње запремине од 50 mL (10% (v/v) азотна киселина).

4.7.3 Одређивање концентрације елемената

Концентрација елемената је одређивана помоћу масене спектрометрије са индуковано-куплованом плазмом ICP-MS. Коришћена је стандардна права са шест тачака и четири опсега концентрација, која је прављена у 10% HNO₃.

Стандардна права - опсези концентрација:

Да би се направила стандардна права за различите елементе у приказаним различитим опсезима концентрација прво су направљени раствори 1-4, који су касније помешани као што је приказано у табели.

0,0100–5.00 µg L⁻¹: Li, V, Cr, Co, Ni, As, Se, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Cs, Tl, Pb и U

0,1–50 µg L⁻¹: B, Ba, Cu, Rb и Sr

1,00–500 µg L⁻¹: Al, Mn, Fe и Zn

100–50,000 µg L⁻¹: Na, K, Ca, Mg, P и S

Раствор 1: У вајлу је сипано по 100 µL стандардних раствора (1000 ppm) Li, V, Cr, Co, Ni, As, Se, Mo, Ag, Cd, Sn, Sb, Cs, Tl, Pb и U, 1,0 mL HNO₃ и 7,3 mL пречишћене воде.

Раствор 2: У вајлу је сипано по 100 μL стандардних раствора (1000 ppm) В, Ва, Cu, Rb и Sr, 100 μL HNO_3 и 9,4 mL пречишћене воде.

Раствор 3: У вајлу је сипано по 100 μL стандардних раствора (1000 ppm) Al, Mn, Fe и Zn, 100 μL раствора 1, 1,0 mL раствора 2, 1 mL HNO_3 и 7,5 mL пречишћене воде.

Раствор 4: У вајлу је сипано по 100 μL стандардних раствора (10000 ppm) Na, K, Ca, Mg, P и S и 9,4 mL пречишћене воде.

Прављење раствора стандардне серије за различите елементе и опсеге концентрација:

Раствор	Опсези концентрација ($\mu\text{g/L}$)	Запремине означених раствора (mL)	HNO_3 (mL)	H_2O (mL)
А	Слепа проба		1	9,0
	0,01	А (1,00)	1	8,0
	0,05	А (0,50)	1	8,5
	0,1	А (0,10)	1	8,9
	0,5	раствор 3 (0,05)	1	9,0
	1	раствор 3 (0,10)	1	8,9
	5	раствор 3 (0,50)	1	8,5
	100	Б (0,10)	1	8,9
	500	раствор 4 (0,05)	1	9,0
	1 000	раствор 4 (0,10)	1	8,9
Б	5 000	раствор 4 (0,50)	1	8,5
	10 000	раствор 4 (1,00)	1	8,0
	50 000	раствор 4 (5,00)	1	4,0

Контрола квалитета:

Контрола квалитета је постигнута кроз континуирано додавање Ве, Ге, In и Lu (200 $\mu\text{g L}^{-1}$ у 1% V/V HNO_3) и анализом стандарда за дрифт после 10 узорака.

Раствор дрифта:

раствор 3	250 μL
раствор 4	2,5 mL
HNO_3	5,0 mL
H_2O	до 50,0 mL

Ефикасност екстракције је проверена помоћу референтног материјала „BOVM-1“ (Certified Reference Material for Trace Metals and other Constituents, NRC, Канада) при свакој дигестији.

Поред тога, тачност анализе је проверена помоћу референтног материјала „SRM 1643f Trace elements in natural water“ (National Institute of Standards & Technology, Гејтерсбург, САД).

Раствор „SRM 1643f“:

„SRM 1643f“	0,5 mL
HNO_3	0,5 mL
H_2O	4,0 mL

5. Литература

1. Hein, L. The Economic Value of the Pollination Service, a Review Across Scales; The Open Ecology Journal 2009, 2, 74-82. doi:10.2174/1874213000902010074.
2. Kleijn, D.; Winfree, R.; Bartomeus, I.; Carvalheiro, L. G.; Henry, M.; Isaacs, R.; et al. Delivery of crop pollination services is an insufficient argument for wild pollinator conservation. Nature Communications 2015, 6, 1-8. doi:10.1038/ncomms8414.
3. Stein, K.; Coulibaly, D.; Stenchly, K.; Goetze, D.; Porembski, S.; Lindner, A.; et al. Bee pollination increases yield quantity and quality of cash crops in Burkina Faso, West Africa. Scientific Reports 2017, 7(1), 1-10. doi:10.1038/s41598-017-17970-2.
4. VanEngelsdorp, D.; Hayes, J.; Underwood, R. M.; Caron, D.; Pettis, J. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. Journal of Apicultural Research 2011, 50(1), 1-10. doi:10.3896/IBRA.1.50.1.01.
5. Wright, G. A.; Nicolson, S. W.; Shafir, S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. Annual Review of Entomology 2017, (63), 327-344. doi:10.1146/annurev-ento-020117-043423.
6. VanEngelsdorp, D.; Meixner, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. Journal of Invertebrate Pathology 2010, 103(1), 80-95. doi:10.1016/j.jip.2009.06.011.
7. Havard, T.; Laurent, M.; Chauzat, M. P. Impact of stressors on honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae): Some guidance for research emerge from a meta-analysis. Diversity 2020, 12(1), 1-13. doi:10.3390/D12010007.
8. Henry, M.; Rodet, G. Controlling the impact of the managed honeybee on wild bees in protected areas. Scientific Reports 2018, 8(1), 1-10. doi:10.1038/s41598-018-27591-y.
9. Alaux, C.; Ducloz, F.; Crauser, D.; Le Conte, Y. Diet effects on honeybee immunocompetence. Biology Letters 2010, 6(4), 562-565. doi:10.1098/rsbl.2009.0986.
10. Michener, C. D. The Bees of the World; Second Edition.; The Johns Hopkins University Press: Baltimore 2000. ISBN-10. 0801885736.
11. Seeley, T. D. Honeybee Democracy; Princeton University Press 2010. ISBN: 9780691147215
12. Maderspacher, F. All the queen's men. Current Biology 2007, (17)6, 191-195. doi:10.1016/j.cub.2007.02.017.
13. Langstroth, L. L. On the Hive and the Honey Bee; Northampton: Hopkins, Bridgman & Company 1853. ISBN-10:1940849020.
14. Schulz, D. J.; Huang, Z. Y.; Robinson, G. E. Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. Behavioral Ecology and Sociobiology 1998, 42(5), 295-303. doi:10.1007/s002650050442.
15. Toth, A. L.; Robinson, G. E. Worker nutrition and division of labour in honeybees. Animal Behaviour 2005, 69(2), 427-435. doi:10.1016/j.anbehav.2004.03.017.

16. DeGrandi-Hoffman, G.; Hagler, J. The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Sociaux* 2000, 47(4), 302–306. doi:10.1007/PL00001720.
17. Herbert, E. W.; Vanderslice, J. T.; Higgs, D. J. Effect of dietary vitamin C levels on the rate of brood production of free-flying and confined colonies of honey bees. *Apidologie* 1985, 16(4), 385–394. doi: 10.1051/apido:19850403.
18. Liao, L. H.; Wu, W. Y.; Berenbaum, M. R. Behavioral responses of honey bees (*Apis mellifera*) to natural and synthetic xenobiotics in food. *Scientific Reports* 2017, 7(1), 1–8. doi:10.1038/s41598-017-15066-5.
19. Bryś, M. S.; Skowronek, P.; Strachecka, A. Pollen diet - properties and impact on a bee colony. *Insects* 2021, 12(9), 1-9. doi:10.3390/insects12090798.
20. Herbert, J. E. W.; Hill, D. A. Honey Bee Nutrition. In *The Hive and the Honey Bee*. Graham, J. M., Ed.; Dadant&Sons: Hamilton, Illinois 2015, 237–268. ISBN 10: 0915698161.
21. Di Pasquale, G.; Alaux, C.; Conte, Y. Le; Odoux, J. F.; Pioz, M.; Vaissière, B. E.; Belzunces, L. C.; Decourtye, A. Variations in the availability of pollen resources affect honey bee health. *PLoS ONE* 2016, 11(9), 1-15. doi:10.1371/journal.pone.0162818.
22. Somerville, D. *Fat Bees Skinny Bees : A Manual on Honey Bee Nutrition for Beekeepers*. Rural Industries Research and Development Corporation 2005. ISBN: 1741511526
23. Dolezal, A. G.; Toth, A. L. Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science* 2018, 26, 1-6. doi: 10.1016/j.cois.2018.02.006.
24. Brodschneider, R.; Crailsheim, K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 2010, 41(3), 278–294. doi:10.1051/apido/2010012.
25. Scofield, H. N.; Mattila, H. R. Honey bee workers that are pollen stressed as larvae become poor foragers and waggle dancers as adults. *PLoS ONE* 2015, 10(4), 1-19. doi:10.1371/journal.pone.0121731.
26. Ziska, L. H.; Pettis, J. S.; Edwards, J.; Hancock, J. E.; Tomecek, M. B.; Clark, A.; Dukes, J. S.; Loladze I.; Wayne Polley H. Rising atmospheric CO₂ is reducing the protein concentration of a floral pollen source essential for north American bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2016, 283, 1-7. doi:10.1098/rspb.2016.0414.
27. Haydak, M. H. Brood Rearing by Honeybees Confined to a Pure Carbohydrate Diet. *Journal of Economic Entomology* 1935, 28(4), 657–660. doi:10.1093/jee/28.4.657.
28. Patel, N.; Haydak, M.; Gochnauer, T. Electrophoretic Components of the Proteins in Honeybee Larval Food. *Nature* 1960, 186, 633–634. doi:https://doi.org/10.1038/186633a0.
29. Kucharski, R.; Maleszka, J.; Foret, S.; Maleszka, R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 2008, 319, 1827–1830. doi:10.1126/science.1153069.
30. Haydak, M. H. Changes in total nitrogen content during the life of the imago of the worker honeybee. *Journal of Agricultural Research* 1934, 49(1), 21–28.
31. De Groot, A.P. Amino acid requirements for growth of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Experientia* 1952, 8, 192–194. doi:https://doi.org/10.1007/BF02173740.

32. Ohashi, K.; Natori, S.; Kubo, T. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry* 1999, 265(1), 127–133. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00696.x.
33. Crailsheim, K. The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie* 1990, 21(5), 417–429. doi:10.1051/apido:19900504.
34. Eishchen, F. A.; Rothenbuhler, W. C.; Kulinčević, J. M. Length of Life and Dry Weight of Worker Honeybees Reared in Colonies with Different Worker-Larva Ratios. *Journal of Apicultural Research* 1982, 21(1), 19–25. doi:10.1080/00218839.1982.11100511.
35. Simpson, J.; Riedel, I. B. M.; Wilding, N. Invertase in the Hypopharyngeal Glands of the Honeybee. *Journal of Apicultural Research* 1968, 7(1), 29–36. doi:10.1080/00218839.1968.11100184.
36. Maurizio, A.; Hodges, F. E. D. The Influence of Pollen Feeding and Brood Rearing on the Length of Life and Physiological Condition of the Honeybee Preliminary Report. *Bee World* 1950, 31(2), 9–12. doi:10.1080/0005772x.1950.11094617.
37. Crailsheim, K. Trophallactic interactions in the adult honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 1998, 29(1–2), 97–112. doi:10.1051/apido:19980106.
38. Peng, Y. S. Midgut Lactase of the Honeybee. *Journal of Apicultural Research* 1981, 20(2), 84–88. doi:10.1080/00218839.1981.11100477.
39. Van Neerbos, F. A. C.; de Boer, J. G.; Salis, L.; Tollenaar, W.; Kos, M.; Vet, L. E. M.; Harvey, J. A. Honeydew composition and its effect on life-history parameters of hyperparasitoids. *Ecological Entomology* 2020, 45(2), 278–289. doi:10.1111/een.12799.
40. Nicolson, S. W. Sweet solutions: Nectar chemistry and quality. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society Publishing 2022, 377, 1–9. doi:10.1098/rstb.2021.0163.
41. Nicolson, S. W.; Thornburg, R. W. Nectar chemistry. Springer, Dordrecht 2007. ISBN 978-1-4020-5937-7.
42. Nicolson, S. W.; Fleming, P. A. Nectar as food for birds: The physiological consequences of drinking dilute sugar solutions. *Plant Systematics and Evolution* 2003, 238(1–4), 139–153. doi:10.1007/s00606-003-0276-7.
43. Minami, A.; Kang, X.; Carter, C. J. A cell wall invertase controls nectar volume and sugar composition. *Plant Journal* 2021, 107(4), 1016–1028. doi:10.1111/tjp.15357.
44. Nicolson, S. W.; Human, H.; Pirk, C. W. W. Honey bees save energy in honey processing by dehydrating nectar before returning to the nest. *Scientific Reports* 2022, 12(1), 1–8. doi:10.1038/s41598-022-20626-5.
45. Nicolson, S. W.; Human, H. Bees get a head start on honey production. *Biology Letters* 2008, 4(3), 299–301. doi:10.1098/rsbl.2008.0034.
46. Machado De-Melo, A. A.; Almeida-Muradian, L. B. de; Sancho, M. T.; Pascual-Maté, A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research* 2017, 57(1), 1–32. doi:10.1080/00218839.2017.1338444.

47. Ruiz-Matute, A. I.; Brokl, M.; Soria, A. C.; Sanz, M. L.; Martínez-Castro, I. Gas chromatographic-mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey. *Food Chemistry* 2010, 120(2), 637–642. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.050.
48. Mangas-Sánchez, J.; Adlercreutz, P. Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2015, 122, 51–55. doi:10.1016/j.molcatb.2015.08.014.
49. Silva, S. P.; Moreira, A. S. P.; Domingues, M. D. R. M.; Evtuguin, D. V.; Coelho, E.; Coimbra, M. A. Contribution of non-enzymatic transglycosylation reactions to the honey oligosaccharides origin and diversity. *Pure and Applied Chemistry* 2019, 91(7), 1231–1242. doi:10.1515/pac-2019-0209.
50. Kieliszek, M.; Piwowarek, K.; Kot, A. M.; Błażej, S.; Chlebowska-Śmigiel, A.; Wolska, I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science and Technology* 2018, 71, 170–180. doi:10.1016/j.tifs.2017.10.021.
51. Herbert, E. W.; Shimanuki, H.; Jr, E. W. H.; Shimanuki, H. Chemical Composition and Nutritive Value of Bee-Collected and Bee-Stored Pollen. *Apidologie* 1978, 9(1), 33–40. doi:10.1051/apido:19780103.
52. Loper, G. M.; Berdel, R. L. A Nutritional Bioassay of Honeybee Brood-Rearing Potential. *Apidologie* 1980, 11(2), 181–189. doi:10.1051/apido:19800208.
53. Carroll, M. J.; Brown, N.; Goodall, C.; Downs, A. M.; Sheenan, T. H.; Anderson, K. E. Honey bees preferentially consume freshly-stored Pollen. *PLoS ONE* 2017, 12(4), 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0175933.
54. Anderson, K. E.; Carroll, M. J.; Sheehan, T.; Lanan, M. C.; Mott, B. M.; Maes, P.; Corby-Harris, V. Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular Ecology* 2014, 23, 5904–5917. doi:10.1111/mec.12966.
55. Nicolson, S. W.; Da Silva Das Neves, S.; Human, H.; Pirk, C. W. W. Digestibility and nutritional value of fresh and stored pollen for honey bees (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Insect Physiology* 2018, 107, 302–308. doi:10.1016/j.jinsphys.2017.12.008.
56. Imdorf, A.; Rickli, M.; Kilchenmann, V.; Bogdanov, S.; Wille, H. Nitrogen and mineral constituents of honey bee worker brood during pollen shortage. *Apidologie* 1998, 29(4), 315–325. doi:10.1051/apido:19980402.
57. Noordyke, E. R.; Ellis, J. D. Reviewing the Efficacy of Pollen Substitutes as a Management Tool for Improving the Health and Productivity of Western Honey Bee (*Apis mellifera*) Colonies. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 2021, 5, 1–15. doi:10.3389/fsufs.2021.772897.
58. Omar, E.; Abd-Ella, A. A.; Khodairy, M. M.; Moosbeckhofer, R.; Crailsheim, K.; Brodschneider, R. Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 2017, 48(4), 425–436. doi:10.1007/s13592-016-0487-x.

59. Dietz, A.; Stevenson, H. R. Influence of Long Term Storage on the Nutritional Value of Frozen Pollen for Brood Rearing of Honey Bees . *Apidologie* 1980, 11(2), 143 – 151. doi.org/10.1051/apido:19800204.
60. Goulson, D.; Nicholls, E.; Botías, C.; Rotheray, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 2015, 347, 1-9. doi:10.1126/science.1255957.
61. Danihlík, J.; Škrabišová, M.; Lenobel, R.; Šebela, M.; Omar, E.; Petřivalský, M.; et al. Does the Pollen Diet Influence the Production and Expression of Antimicrobial Peptides in Individual Honey Bees? *Insects* 2018, 9(3), 1-12. doi:10.3390/insects9030079.
62. Di Pasquale, G.; Salignon, M.; Le Conte, Y.; Belzunces, L. P.; Decourtye, A.; Kretzschmar, A.; Suchail, S.; Brunet, J.; Alaux, C. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? *PLOS ONE* 2013, 8(8), 1-13. doi.org/10.1371/journal.pone.0072016.
63. Barroso-Arévalo, S.; Vicente-Rubiano, M.; Ruiz, J. A.; Bentabol, A.; Sánchez-Vizcaíno, J. M. Does pollen diversity influence honey bee colony health? *Spanish Journal of Agricultural Research* 2019, 17(3), 1-12. doi:10.5424/sjar/2019173-13991.
64. Khan, K. A.; Ghramh, H. A.; Ahmad, Z.; El-Niweiri, M. A. A.; Mohammed, M. E. A. Honey bee (*Apis mellifera*) preference towards micronutrients and their impact on bee colonies. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2021, 28(6), 3362–3366. doi:10.1016/j.sjbs.2021.02.084.
65. Monchanin, C.; Blanc-Brude, A.; Drujont, E.; Negahi, M. M.; Pasquaretta, C.; Silvestre, J.; Baqué, D.; Elger, A.; Barron, A. B.; Devaud, J.; Lihoreau, M. Chronic exposure to trace lead impairs honey bee learning. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2021, 212, 1-9. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112008.
66. Ilijević, K.; Vujanović, D.; Orčić, S.; Purać, J.; Kojić, D.; Zarić, N.; Gržetić, I.; Blagojević, D. P.; Čelić, T. V. Anthropogenic influence on seasonal and spatial variation in bioelements and non-essential elements in honeybees and their hemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 2021, 239, 1-8. doi:10.1016/j.cbpc.2020.108852.
67. Al osman, M.; Yang, F.; Massey, I. Y. Exposure routes and health effects of heavy metals on children. *BioMetals* 2019, 32(4), 563–573. doi:10.1007/s10534-019-00193-5.
68. Rani, A.; Kumar, A.; Lal, A.; Pant, M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International Journal of Environmental Health Research* 2014, 24(4), 378–399. doi:10.1080/09603123.2013.835032.
69. Bonoan, R. E.; Tai, T. M.; Tagle Rodriguez, M.; Feller, L.; Daddario, S. R.; Czaja, R. A.; O'connor, L. D.; Burruss, G.; Starks, P. T. Seasonality of salt foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Ecological Entomology* 2017, 42(2), 195–201. doi:https://doi.org/10.1111/een.12375.
70. Schmickl, T.; Crailsheim, K. Inner nest homeostasis in a changing environment with special emphasis on honey bee brood nursing and pollen supply. *Apidologie* 2004, 35(3), 249–263. doi.org/10.1051/apido:2004019.

71. Foley, K.; Fazio, G.; Jensen, A. B.; Hughes, W. O. H. Nutritional limitation and resistance to opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 2012, 111(1), 68–73. doi.org/10.1016/j.jip.2012.06.006.
72. Gerdt, J. R.; Roberts, J. M. K.; Simone-Finstrom, M.; Ogbourne, S. M.; Tucci, J. Genetic variation of *Ascosphaera apis* and colony attributes do not explain chalkbrood disease outbreaks in Australian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 2021, 180, 1-8. doi.org/10.1016/j.jip.2021.107540.
73. Rowland, B. W.; Rushton, S. P.; Shirley, M. D. F.; Brown, M. A.; Budge, G. E. Identifying the climatic drivers of honey bee disease in England and Wales. *Scientific Reports* 2021, 11(1), 1-10. doi:10.1038/s41598-021-01495-w.
74. Sevim, A.; Akpınar, R.; Karaoğlu, Ş. A.; Bozdeveci, A.; Sevim, E. Prevalence and phylogenetic analysis of *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) LS Olive & Spiltoir (1955) isolates from honeybee colonies in Turkey. *Biologia* 2022, 77(2), 2689–2699. doi:10.1007/s11756-022-01114-7.
75. Aronstein, K. A.; Murray, K. D. Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 2010, 103, 20-29. doi:10.1016/j.jip.2009.06.018.
76. Heath, L. A. F. Development of Chalk Brood in a Honeybee Colony: A Review. *Bee World* 1982, 63(3), 119–130. doi:10.1080/0005772x.1982.11097876.
77. Jensen, A. B.; Aronstein, K.; Flores, J. M.; Vojvodic, S.; Palacio, M. A.; Spivak, M. Standard methods for fungal brood disease research. *Journal of Apicultural Research* 2013, 52(1), 1-20. doi:10.3896/IBRA.1.52.1.13.
78. Deneke, Y. A.; Dero, B. S.; Mekonnen, A. S. Review on chalkbrood disease of honey bee. *Veterinary Medicine - Open Journal* 2023, 8(2), 47–55. doi:10.17140/VMOJ-8-176.
79. Castagnino, G. L. B.; Mateos, A.; Meana, A.; Montejo, L.; Zamorano Iturralde, L. V.; Cutuli De Simón, M. T. Etiology, symptoms and prevention of chalkbrood disease: A literature review. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 2020, 21(373), 1-16. doi:10.1590/S1519-9940210332020.
80. Gilliam, M.; Taber, S.; Lorenz, B. J.; Prest, D. B. Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 1988, 52(2), 314–325. doi.org/10.1016/0022-2011(88)90141-3.
81. Flores, J. M.; Ruiz, J. A.; Ruz, J. M.; Puerta, F.; Bustos, M.; Padilla, F.; Campano, F. Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie* 1996, 27(4), 185–192. doi:10.1051/apido:19960401.
82. Yoder, J. A.; Nelson, B. W.; Main, L. R.; Lorenz, A. L.; Jajack, A. J.; Aronstein, K. A. Water activity of the bee fungal pathogen *Ascosphaera apis* in relation to colony conditions. *Apidologie* 2017, 48(2), 159–167. doi:10.1007/s13592-016-0461-7.
83. Puerta, F.; Flores, J. M.; Bustos, M.; Padilla, F.; Campano, F. Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions. *Apidologie* 1994, 25(6), 540–546. doi:10.1051/apido:19940604.

84. DeGrandi-Hoffman, G.; Chen, Y.; Huang, E.; Huang, M. H. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 2010, 56(9), 1184–1191. doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.017.
85. Goblirsch, M. *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 2018, 49(1), 131–150. doi:10.1007/s13592-017-0535-1.
86. Jack, C. J.; Ellis, J. D. Integrated Pest Management Control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), the Most Damaging Pest of (*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)) Colonies. *Journal of Insect Science* 2021, 21(5), 1-32. doi:10.1093/jisesa/ieab058.
87. Ramsey, S. D.; Ochoa, R.; Baughan, G.; Gulbranson, C.; Mowery, J. D.; Cohen, A.; Lim, D.; Joklik, J.; Cicero, J. M.; Ellis, J. D.; Hawthorne, D.; VanEngelsdorp, D. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2019, 116(5), 1792–1801. doi:10.1073/pnas.1818371116.
88. Rosenkranz, P.; Aumeier, P.; Ziegelmann, B. Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 2010, 103, 96-119. doi:10.1016/j.jip.2009.07.016.
89. Elzen, P. J.; Baxter, J. R.; Spivak, M.; Wilson, W. T. Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos. *Apidologie* 2000, 31(3), 437–441. doi:10.1051/apido:2000134.
90. Mitton, G. A.; Szawarski, N.; Ramos, F.; Fuselli, S.; Meroi Arcerito, F. R.; Eguaras, M. J.; Ruffinengo, S. R.; Maggi, M. D. *Varroa destructor*: when reversion to coumaphos resistance does not happen. *Journal of Apicultural Research* 2018, 57(4), 536–540. doi:10.1080/00218839.2018.1475038.
91. Pettis, J. A scientific note on *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States. *Apidologie* 2004, 35(1), 91-92. doi.org/10.1051/apido:2003060.
92. Rodríguez-Dehaibes, S. R.; Otero-Colina, G.; Sedas, V. P.; Jiménez, J. A. V. Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. *Journal of Apicultural Research* 2005, 44(3), 124–125. doi:10.1080/00218839.2005.11101162.
93. Glenny, W.; Cavigli, I.; Daughenbaugh, K. F.; Radford, R.; Kegley, S. E.; Flenniken, M. L. Honey bee (*Apis mellifera*) colony health and pathogen composition in migratory beekeeping operations involved in California almond pollination. *PLoS ONE* 2017, 12(8), 1-24. doi:10.1371/journal.pone.0182814.
94. Martin, S. J.; Highfield, A. C.; Brettell, L.; Villalobos, E. M.; Budge, G. E.; Powell, M.; Nikaido, S.; Schroeder, D. C. Global Honey Bee Viral Landscape Altered by a Parasitic Mite. *Science* 2012, 336, 1304–1306. doi: 10.1126/science.1220941.
95. Johnson, R. M.; Dahlgren, L.; Siegfried, B. D.; Ellis, M. D. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* 2013, 8(1), 1-10. doi:10.1371/journal.pone.0054092.

96. Calderone, N. W.; Kuenen, L. P. S. Effects of western honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony, cell type, and larval sex on host acquisition by female *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Journal of Economic Entomology* 2001, 94(5), 1022–1030. doi:10.1603/0022-0493-94.5.1022.
97. Calis, J.N.M.; Schmidt-Bailey, J.; Beetsma, J.; Boot, W.J.; Van Den Eijnde, J. H. P. M.; Fuchs, S.; De Ruijter, A.; Van der Steen, J. J. M. Successful Trapping of *Varroa Jacobsoni* with Drone Brood in Broodless *Apis mellifera* Colonies. *Apiacta* 1997, 32, 65-71.
98. Charrière, J. D.; Imdorf, A.; Bachofen, B.; Tschan, A. The removal of capped drone brood: An effective means of reducing the infestation of varroa in honey bee colonies. *Bee World* 2003, 84(3), 117–124. doi:10.1080/0005772X.2003.11099587.
99. Wantuch, H. A.; Tarpy, D. R. Removal of drone brood from *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and retain adult drones. *Journal of Economic Entomology* 2009, 102(6), 2033–2040. doi:10.1603/029.102.0603.
100. Evans, J.; Müller, A.; Jensen, A. B.; Dahle, B.; Flore, R.; Eilenberg, J.; Frøst, M.B. A descriptive sensory analysis of honeybee drone brood from Denmark and Norway. *Journal of Insects as Food and Feed* 2016, 2(4), 277–283. doi:10.3920/JIFF2016.0014.
101. Jonas Levi, A.; Benjamin, O.; Martinez, J.-J. I. Does a parasite infestation change the nutritional value of an insect? Varroa mites on honey bees as a model. *Journal of Insects as Food and Feed* 2015, 1(2), 141-147. doi:10.3920/JIFF2014.0007.
102. Terra, W. R.; Ferreira, C. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. In *Insect molecular biology and biochemistry*. Lawrence I. Gilbert, Ed.; Elsevier/Academic Press: London, 2012, 365-418. ISBN: 9780123847485
103. Terra, W. R.; Ferreira, C. Comprehensive Molecular Insect Science—Biochemistry and Molecular Biology. Iatrou, K., Gill, S. S., Eds.; Pergamon, 2004; Vol. 4, 171–224. ISBN: 978-0-444-51924-5.
104. Schowalter, T. D. *Insect Ecology: An Ecosystem Approach: Fourth Edition*; 2016. ISBN: 9780128030370
105. Bertholf, L. M. The Utilization of Carbohydrates as Food by Honeybee Larvae. *Journal of Agricultural Research* 1927, 35(5), 429-452.
106. Nation, J. L. *Insect Physiology and Biochemistry; Second Edition*.; CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, 2008. ISBN: 9780429148071
107. Snodgrass, R. E. *The Anatomy of the Honey Bee*. Washington: Government Printing Office 1910.
108. Jimenez, D. R.; Gilliam, M. Age-related changes in midgut ultrastructure and trypsin activity in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 1989, 20(4), 287–303. doi.org/10.1051/apido:19890402.
109. Jimenez, D. R.; Gilliam, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. *Cell and Tissue Research* 1990, 261, 431–443. doi.org/10.1007/BF00313521.

110. Zheng, H.; Powell, J. E.; Steele, M. I.; Dietrich, C.; Moran, N. A. Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2017, 114(18), 4775–4780. doi:10.1073/pnas.1701819114.
111. Herbert, E. W.; Shimanuki, H. Effect of Diet pH on the Consumption, Brood Rearing, and pH of Worker Jelly Produced by Caged Honey Bees. *Apidologie* 1983, 14(3), 191–196. doi:10.1051/apido:19830304.
112. Pavlovsky, E. N.; Zarin, E. J. On the Structure of the Alimentary Canal and its Ferments in the Bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Cell Science* 1922, 66(263), 509–556. doi.org/10.1242/jcs.s2-66.263.509
113. Douglas, A. E. Multiorganismal insects: Diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology* 2015, 60, 17–34. doi:10.1146/annurev-ento-010814-020822.
114. Lee, F. J.; Rusch, D. B.; Stewart, F. J.; Mattila, H. R.; Newton, I. L. G. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental Microbiology* 2015, 17(3), 796–815. doi:10.1111/1462-2920.12526.
115. Engel, P.; Martinson, V. G.; Moran, N. A. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, 109(27), 11002–11007. doi:10.1073/pnas.1202970109.
116. Kakumanu, M. L.; Reeves, A. M.; Anderson, T. D.; Rodrigues, R. R.; Williams, M. A. Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Frontiers in Microbiology* 2016, 7, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2016.01255.
117. Romero, S.; Nastasa, A.; Chapman, A.; Kwong, W. K.; Foster, L. J. The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Molecular Biology* 2019, 28(4), 455–472. doi:10.1111/imb.12567.
118. Ricigliano, V. A.; Fitz, W.; Copeland, D. C.; Mott, B. M.; Maes, P.; Floyd, A. S.; et al. The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive physiology and carbohydrate metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 2017, 96(2), 1–14. doi:10.1002/arch.21406.
119. Grogan, D. E.; Hunt, J. H. Pollen proteases: Their potential role in insect digestion. *Insect Biochemistry* 1979, 9(3), 309–313. doi.org/10.1016/0020-1790(79)90011-8.
120. Seeley, T. D. *The Wisdom of the Hive: The Social Physiology of Honey Bee Colonies*. Harvard University Press, Cambridge 1995. ISBN 9780674953765.
121. Terra, W. R.; Ferreira, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 1994, 109(1), 1–62. doi:10.1016/0305-0491(94)90141-4.
122. Moritz, B.; Crailsheim, K. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 1987, 33(12), 923–931. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(87\)90004-7](https://doi.org/10.1016/0022-1910(87)90004-7).

123. Crailsheim, K.; Schneider, L.H.W.; Hrassnigg, N.; Bühlmann, G.; Brosch, U.; Gmeinbauer, R.; Schöffmann, B. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology* 1992, 38(6), 409-419. doi.org/10.1016/0022-1910(92)90117-V.
124. Grogan, D.; Hunt, J. Age correlated changes in midgut protease activity of the honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Experientia* 1980, 36, 1347-1348. doi.org/10.1007/BF01960089.
125. Li, C.; Xu, B.; Wang, Y.; Feng, Q.; Yang, W. Effects of dietary crude protein levels on development, antioxidant status, and total midgut protease activity of honey bee (*Apis mellifera ligustica*). *Apidologie* 2012, 43(5), 576-586. doi:10.1007/s13592-012-0126-0.
126. Sterchi, E. E.; Stocker, W. *Proteolytic Enzymes Tools and Targets*; Springer Berlin, Heidelberg, 1999. ISBN: 978-3-642-59816-6.
127. Giebel, W.; Zwilling, R.; Pfeleiderer, G. The evolution of endopeptidases—XII. The proteolytic enzymes of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 1971, 38(1), 207-210. doi:10.1016/0305-0491(71)90297-5.
128. Dahlmann, B.; Jany, K. D.; Pfeleiderer, G. The midgut endopeptidases of the honey bee (*Apis mellifica*): Comparison of the enzymes in different ontogenetic stages. *Insect Biochemistry* 1978, 8(3), 203-211. doi:10.1016/0020-1790(78)90075-6.
129. Matsuoka, T.; Kawashima, T.; Nakamura, T.; Kanamaru, Y.; Yabe, T. Isolation and characterization of proteases that hydrolyze royal jelly proteins from queen bee larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 2012, 43(6), 685-697. doi:10.1007/s13592-012-0143-z.
130. Matsuoka, T.; Takasaki, A.; Mishima, T.; Kawashima, T.; Kanamaru, Y.; Nakamura, T.; et al. Expression and characterization of honeybee, *Apis mellifera*, larva chymotrypsin-like protease. *Apidologie* 2015, 46(2), 167-176. doi:10.1007/s13592-014-0313-2.
131. Matsuoka, T.; Kawashima, T.; Nakamura, T.; Yabe, T. Characterization and comparison of recombinant honeybee chymotrypsin-like protease (HCLPase) expressed in *Escherichia coli* and insect cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2017, 81(7), 1401-1404. doi:10.1080/09168451.2017.1318698.
132. Pacini, E.; Guarnieri, M.; Nepi, M. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: A short review. *Protoplasma* 2006, 228, 73-77. doi:10.1007/s00709-006-0169-z.
133. Resh, V. H.; Cardé, R. T. *Encyclopedia of Insects*. Academic Press 2009. ISBN: 978-0-12-374144-8.
134. Miyazaki, T.; Park, E. Y. Structure-function analysis of silkworm sucrose hydrolase uncovers the mechanism of substrate specificity in GH13 subfamily 17 exo- α -glucosidases. *Journal of Biological Chemistry* 2020, 295(26), 8784-8797. doi:10.1074/jbc.ra120.013595.
135. Nishimoto, M.; Kubota, M.; Tsuji, M.; Mori, H.; Kimura, A.; Matsui, H.; Chiba, S. Purification and substrate specificity of honeybee, *Apis mellifera* L., α -glucosidase III. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2001, 65(7), 1610-1616. doi:10.1271/bbb.65.1610.

136. Terra, W. R.; Ferreira, C.; Baker, J. E. Compartmentalization of digestion. In *Biology of the insect midgut*. Lehane, M. J., Billingsley, P. F., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1996, 206–235. ISBN 10: 041261670X.
137. Żółtowska, K.; Lipiński, Z.; Łopieńska-Biernat, E.; Farjan, M.; Dmitryjuk, M. The activity of carbohydrate-degrading enzymes in the development of brood and newly emerged workers and drones of the Carniolan honeybee, *Apis mellifera carnica*. *Journal of Insect Science* 2012, 12, 1–11. doi:DOI:10.1673/031.012.2201.
138. Hrassnigg, N.; Brodschneider, R.; Fleischmann, P. H.; Crailsheim, K. Unlike nectar foragers, honeybee drones (*Apis mellifera*) are not able to utilize starch as fuel for flight. *Apidologie* 2005, 36(4), 547–557. doi:10.1051/apido:2005042.
139. Resh, V. H.; Cardé, R. T. *Encyclopedia of Insects*. Academic Press 2003. ISBN: 0-12-586990-8.
140. Rinaudo, M. T.; Ponzetto, C.; Vidano, C.; Marletto, F. The origin of honey amylase. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 1973, 46, 253–256. doi.org/10.1016/0305-0491(73)90315-5.
141. Babacan, S.; Rand, A. G. Purification of amylase from honey. *Journal of Food Science* 2005, 70(6), 413–418. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb11439.x.
142. Kubo, T.; Sasaki, M.; Nakamura, J.; Sasagawa, H.; Ohashi, K.; Takeuchi, H.; Natori, S. Change in the Expression of Hypopharyngeal-Gland Proteins of the Worker Honeybees (*Apis Mellifera* L.) with Age and/or Role. *The Journal of Biochemistry* 1996; 119(2), 291-295. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021237.
143. Takewaki, S.; Chiba, S.; Kimura, A.; Matsui, H.; Koike, Y. Purification and Properties of α -Glucosidases of the Honey Bee *Apis mellifera* L. *Agricultural and Biological Chemistry* 1980, 44(4), 731–740. doi:10.1080/00021369.1980.10864027.
144. Punnnatin, P.; Chanchao, C.; Chunsriviro, S. Molecular dynamics reveals insight into how N226P and H227Y mutations affect maltose binding in the active site of α -glucosidase II from European honeybee, *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 2020, 15(3), 1-17. doi:10.1371/journal.pone.0229734.
145. Huber, R. E.; Mathison, R. D. Physical, chemical, and enzymatic studies on the major sucrase of honey bees (*Apis mellifera*). *Canadian Journal of Biochemistry* 1976, 54(2), 153–164. doi:10.1139/o76-023.
146. White, J. W.; Maher, J. Transglucosidation by Honey Invertase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1953, 42(2), 360–367. doi: 10.1016/0003-9861(53)90365-8.
147. Kaewmuangmoon, J.; Kilaso, M.; Leartsakulpanich, U.; Kimura, K.; Kimura, A.; Chanchao, C. Expression of a secretory α -glucosidase II from *Apis cerana indica* in *Pichia pastoris* and its characterization. *BMC Biotechnology* 2013, 13, 1-13. doi:10.1186/1472-6750-13-16.
148. Wongchawalit, J.; Yamamoto, T.; Nakai, H.; Kim, Y. M.; Sato, N.; Nishimoto, M.; Okuyama, M.; Mori, H.; Saji, O.; Chanchao, C.; Wongsiri, S.; Surarit, R.; Svasti, J.; Chiba S.; Kimura A. Purification and characterization of α -glucosidase I from Japanese honeybee (*Apis cerana japonica*) and molecular cloning of Its cDNA. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2006, 70(12), 2889–2898. doi:10.1271/bbb.60302.

149. Kubota, M.; Tsuji, M.; Nishimoto, M.; Wongchawalit, J.; Okuyama, M.; Mori, H.; Matsui, H.; Surarit, R.; Svasti, J.; Kimura, A.; Chiba, S. Localization of α -Glucosidases I, II, and III in Organs of European Honeybees, *Apis mellifera* L., and the Origin of α -Glucosidase in Honey. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2004, 68(11), 2346–2352. doi:10.1271/bbb.68.2346.
150. Bojarová, P.; Křen, V. Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. *Trends in Biotechnology* 2009, 27(4), 199–209. doi: 10.1016/j.tibtech.2008.12.003.
151. Ricigliano, V. A.; Williams, S. T.; Oliver, R. Effects of different artificial diets on commercial honey bee colony performance, health biomarkers, and gut microbiota. *BMC Veterinary Research* 2022, 18, 1–14. doi:10.1186/s12917-022-03151-5.
152. Doull, K. M. Relationships Between Consumption of a Pollen Supplement, Honey Production and Broodrearing in Colonies of Honeybees *Apis mellifera* L. II. *Apidologie* 1980, 11(4), 367–374. doi:10.1051/apido:19800405.
153. Standifer, L. N.; Moeller, F. E.; Kauffeld, N. M.; Herbert, E. W., Jr.; Shimanuki, H. Supplemental Feeding of Honey Bee Colonies. United States Department of Agriculture Agriculture Information Bulletin 1978, 413, 1–8. doi: 10.22004/ag.econ.309296.
154. Van der Steen, J. Effect of a home-made pollen substitute on honey bee colony development. *Journal of Apicultural Research* 2007, 46(2), 114–119. doi:10.1080/00218839.2007.11101377.
155. Paray, B. A.; Kumari, I.; Hajam, Y. A.; Sharma, B.; Kumar, R.; Albeshr, M. F.; Farah M. A.; Khan, J. M. Honeybee nutrition and pollen substitutes: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2021, 28(1), 1167–1176. doi:10.1016/j.sjbs.2020.11.053.
156. Haydak, M. H. Causes of Deficiency of Soybean Flour as a Pollen Substitute for Honeybees. *Journal of Economic Entomology* 1949, 42(4), 573–579. doi.org/10.1093/jee/42.4.573.
157. Herbert, E. W.; Shimanuki, H.; Shasha, B. S. Brood Rearing and Food Consumption by Honeybee Colonies Fed Pollen Substitutes Supplemented with Starch-Encapsulated Pollen Extracts. *Journal of Apicultural Research* 1980, 19(2), 115–118. doi:10.1080/00218839.1980.11100008.
158. Borkovcová, M.; Mlček, J.; Adámková, A.; Adámek, M.; Bednářová, M.; Musilová, Z.; Ševčíková, V. Use of Foods Based on Bee Drone Brood: Their Sensory and Microbiological Evaluation and Mineral Composition. *Sustainability* 2022, 14(5), 1–13. doi:10.3390/su14052814.
159. Payne, C. L. R.; Dobermann, D.; Forkes, A.; House, J.; Josephs, J.; McBride, A.; Müller, A.; Quilliam, R.S.; Soares, S. Insects as food and feed: European perspectives on recent research and future priorities. *Journal of Insects as Food and Feed* 2016, 2(4), 269–276. doi:10.3920/JIFF2016.0011.
160. Van Huis, A. Edible insects are the future? *Proceedings of the Nutrition Society* 2016, 75(3), 294–305. doi:10.1017/S0029665116000069.
161. Van Huis, A. Insects as food and feed, a new emerging agricultural sector: A review. *Journal of Insects as Food and Feed* 2020, 6(1), 27–44. doi:10.3920/JIFF2019.0017.

162. Finke, M. D. Nutrient composition of bee brood and its potential as human food. *Ecology of Food and Nutrition* 2005, 44(4), 257–270. doi:10.1080/03670240500187278.
163. Schmickl, T.; Crailsheim, K. Cannibalism and early capping: Strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. *Journal of Comparative Physiology - A Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 2001, 187(7), 541–547. doi:10.1007/s003590100226.
164. Woyke, J. What happens to diploid drone larvae in a honeybee colony. *Journal of Apicultural Research* 1963, 2(2), 73–75. doi:10.1080/00218839.1963.11100063.
165. Garófalo, C. A. Brood viability in normal colonies of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 1977, 16(1), 3–13. doi:10.1080/00218839.1977.11099854.
166. Wester, T. C.; Peng, Y.; Duffey, S. S. Conservation of nutrients in larval tissue by cannibalizing honey bees. *Physiological Entomology* 1987, 12, 225–231. doi:10.1111/j.1365-3032.1987.tb00745.x.
167. Lehnert, T. Plural brood in a queenright colony. *Journal of Apicultural Research* 1965, 4(2), 99–100. doi:10.1080/00218839.1965.11100111.
168. Fukuda, H.; Sakagami, S. F. Worker brood survival in honeybees. *Population Ecology* 1968, 10, 31–39. doi.org/10.1007/BF02514731.
169. Newton, D. C.; Michl, D. J. Cannibalism as an indication of pollen insufficiency in honeybees: ingestion or recapping of manually exposed pupae. *Journal of Apicultural Research* 1974, 13(4), 235–241. doi:10.1080/00218839.1974.11099786.
170. Taylor, M. A.; Robertson, A. W.; Biggs, P. J.; Richards, K. K.; Jones, D. F.; Parkar, S. G. The effect of carbohydrate sources: Sucrose, invert sugar and components of mānuka honey, on core bacteria in the digestive tract of adult honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* 2019, 14(12), 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0225845.
171. Wheeler, M. M.; Robinson, G. E. Diet-dependent gene expression in honey bees: Honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Scientific Reports* 2014, 4, 1–5. doi:10.1038/srep05726.
172. Přidal, A.; Musila, J.; Svoboda, J. Condition and Honey Productivity of Honeybee Colonies Depending on Type of Supplemental Feed for Overwintering. *Animals* 2023, 13(3), 1–15. doi:10.3390/ani13030323.
173. Liao, C.; Xu, Y.; Sun, Y.; Lehnert, M. S.; Xiang, W.; Wu, J.; Wu, Z. Feeding behavior of honey bees on dry sugar. *Journal of Insect Physiology* 2020, 124, 1–10. doi:10.1016/j.jinsphys.2020.104059.
174. Barker, R. J.; Lehner, Y. Laboratory Comparison of High Fructose Corn Syrup, Grape Syrup, Honey, and Sucrose Syrup as Maintenance Food for Caged Honey Bees. *Apidologie* 1978, 9(2), 111–116. doi.org/10.1051/apido:19780203.
175. Kotwal, S. M.; Shankar, V. Immobilized invertase. *Biotechnology Advances* 2009, 27(4), 311–322. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.01.009.
176. Atallah, M. A.; Naby, A. A. Effect of invert sugar on brood rearing, honey production and fat and glycogen contents of honeybees. *Journal of Apicultural Research* 1979, 18(1), 40–42. doi:10.1080/00218839.1979.11099941.

177. Margetić, A.; Vujčić, Z. Comparative study of stability of soluble and cell wall invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 2017, 47(3), 305–311. doi:10.1080/10826068.2016.1244683.
178. Sainz-Polo, M. A.; Ramírez-Escudero, M.; Lafraya, A.; González, B.; Marín-Navarro, J.; Polaina, J.; Sanz-Aparicio J. Three-dimensional structure of *Saccharomyces* invertase: Role of a non-catalytic domain in oligomerization and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* 2013, 288(14), 9755–9766. doi:10.1074/jbc.M112.446435.
179. Baseer, A.; Shall, S. Properties of the internal invertase of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta – Enzymology* 1971, 250(1), 192–202. doi:10.1016/0005-2744(71)90133-1.
180. Chand Bhalla, T.; Bansuli; Thakur, N.; Savitri; Thakur, N. Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides. *LWT* 2017, 77, 178–185. doi:10.1016/j.lwt.2016.11.034.
181. Lehane, M. J.; Blakemore, D.; Williams, S.; Moffatt, M. R. Regulation of digestive enzyme levels in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 1995; 110(2), 285–289. doi.org/10.1016/0305-0491(94)00157-P.
182. Simon, E.; Baranyai, E.; Braun, M.; Fábrián, I.; Tóthmérész, B. Elemental concentration in mealworm beetle (*Tenebrio molitor* L.) during metamorphosis. *Biological Trace Element Research* 2013, 154(1), 81–87. doi:10.1007/s12011-013-9700-1.
183. Costa, S.; Pedro, S.; Lourenço, H.; Batista, I.; Teixeira, B.; Bandarra, N. M.; Murta, D.; Nunes, R.; Pires, C. Evaluation of *Tenebrio molitor* larvae as an alternative food source. *NFS Journal* 2020, 21, 57–64. doi:10.1016/j.nfs.2020.10.001.
184. Jajić, I.; Popović, A.; Urošević, M.; Krstović, S.; Petrović, M.; Guljaš, D. Chemical Composition of Mealworm Larvae (*Tenebrio molitor*) Reared in Serbia . *Contemporary Agriculture* 2019, 68(1–2), 23–27. doi:10.2478/contagri-2019-0005.
185. Matsumoto, E.; Matsumoto, M. Determination of Arsenic Species in Edible Insects by LC-ICP-MS. *Journal of AOAC International* 2023, 106(6), 1525–1531. doi:10.1093/jaoacint/qsad083.
186. Ravisankar, M.; Alexandar, S.; Senthil Kumar, R.; Kumar, M.; Venkateswarlu, B. S. A New ICP-MS Based Approach for the Analysis of Heavy Metals in Feeder Insect *Tenebrio molitor*. *Indian Journal of Entomology* 2023, 1–3. doi:10.55446/ije.2023.1483.
187. Ghosh, S.; Sohn, H. Y.; Pyo, S. J.; Jensen, A. B.; Meyer-Rochow, V. B.; Jung, C. Nutritional composition of *Apis mellifera* Drones from Korea and Denmark as a potential sustainable alternative food source: Comparison between developmental stages. *Foods* 2020, 9(4), 1–16. doi:10.3390/foods9040389.
188. Prihodko, A.; Yankina, O.; Kim, N.; Koltun, G.; Skolov, A. Chemical composition of the far eastern homogenate of drone brood. In *E3S Web of Conferences*; EDP Sciences, 2020, 203, 1–6. doi:10.1051/e3sconf/202020304015.
189. Sidor, E.; Miłek, M.; Zagula, G.; Bocian, A.; Džugan, M. Searching for differences in chemical composition and biological activity of crude drone brood and royal jelly useful for their authentication. *Foods* 2021, 10(9), 1–20. doi:10.3390/foods10092233.

190. Khan, K. A.; Ghramh, H. A.; Ahmad, Z.; El-Niweiri, M. A. A.; Mohammed, M. E. A. Honey bee (*Apis mellifera*) preference towards micronutrients and their impact on bee colonies. Saudi Journal of Biological Sciences 2021, 28(6), 3362–3366. doi:10.1016/j.sjbs.2021.02.084.
191. Vauterin, A.; Steiner, B.; Sillman, J.; Kahiluoto, H. The potential of insect protein to reduce food-based carbon footprints in Europe: The case of broiler meat production. Journal of Cleaner Production 2021, 320., 1-12 doi:10.1016/j.jclepro.2021.128799.
192. Liu, C.; Masri, J.; Perez, V.; Maya, C.; Zhao, J. Growth performance and nutrient composition of mealworms (*Tenebrio molitor*) fed on fresh plant materials-supplemented diets. Foods 2020, 9(2), 1-10. doi:10.3390/foods9020151.
193. Campos, M. G. R.; Bogdanov, S.; De Almeida-Muradian, L. B.; Szczesna, T.; Mancebo, Y.; Frigerio, C.; Ferreira, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. Journal of Apicultural Research. 2008, 47(2), 154-161. doi:10.1080/00218839.2008.11101443.
194. Zhao, X.; Vázquez-Gutiérrez, J. L.; Johansson, D. P.; Landberg, R.; Langton, M. Yellow mealworm protein for food purposes - Extraction and functional properties. PLoS ONE 2016, 11(2), 1-17. doi:10.1371/journal.pone.0147791.
195. Pirk, C. W. W.; Boodhoo, C.; Human, H.; Nicolson, S. W. The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (*Apis mellifera scutellata*). Apidologie 2010, 41(1), 62–72. doi:10.1051/apido/2009055.
196. Kulinčević, J. R.; Rothenbuhler, W. C.; Stairs, G. R. The effect of presence of a queen upon outbreak of a hairless-black syndrome in the honey bee. Journal of Invertebrate Pathology 1973, 21(3), 241–247. doi.org/10.1016/0022-2011(73)90208-5.
197. Powell, J. E.; Martinson, V. G.; Urban-Mead, K.; Moran, N. A. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. Applied and Environmental Microbiology 2014, 80(23), 7378–7387. doi:10.1128/AEM.01861-14.
198. Martinson, V. G.; Moy, J.; Moran, N. A. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. Applied and Environmental Microbiology 2012, 78(8), 2830–2840. doi:10.1128/AEM.07810-11.
199. Höcherl, N.; Siede, R.; Illies, I.; Gätschenberger, H.; Tautz, J. Evaluation of the nutritive value of maize for honey bees. Journal of Insect Physiology 2012, 58(2), 278–285. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.12.001.
200. Alfonsus, E. C. The cause of dysentery in honeybees. Journal of Economic Entomology 1935, 28(3), 568–576. doi.org/10.1093/jee/28.3.568.
201. Woodrow, A. W. Some Effects of Relative Humidity on the Length of Life and Food Consumption of Honeybees. Journal of Economic Entomology 1935, 28(3), 565–568. doi.org/10.1093/jee/28.3.565.
202. Hendriksma, H. P.; Pachow, C. D.; Nieh, J. C. Effects of essential amino acid supplementation to promote honey bee gland and muscle development in cages and colonies. Journal of Insect Physiology 2019, 117, 1-8. doi:10.1016/j.jinsphys.2019.103906.
203. Doull, K. M. Effects of attractants and phagostimulants in pollen and pollen supplement on the feeding behaviour of honeybees in the hive. Journal of Apicultural Research 1974, 13(1), 47–54. doi:10.1080/00218839.1974.11099758.

204. Ravzanaadii, N.; Kim, S.-H.; Choi, W.-H.; Hong, S.-J.; Kim, N.-J. Nutritional Value of Mealworm, *Tenebrio molitor* as Food Source. *International Journal of Industrial Entomology* 2012, 25(1), 93–98. doi:10.7852/ijie.2012.25.1.093.
205. DeGrandi-Hoffman, G.; Wardell, G.; Ahumada-Segura, F.; Rinderer, T.; Danka, R.; Pettis, J. Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: Consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *Journal of Apicultural Research* 2008, 47(4), 265–270. doi:10.1080/00218839.2008.11101473.
206. Lotmar, R. Gewichtsbestimmungen bei gesunden und noseimakranken Bienen. Ein Beitrag zum Problem des Stoffwechsels und Wasserhaushaltes. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* 1951, 33, 195–206. <https://doi.org/10.1007/BF00298978>.
207. Hrassnigg, N.; Crailsheim, K. Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Insect Physiology* 1998, 44(10), 929–939. doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00058-4.
208. Brodschneider, R.; Riessberger-Gallé, U.; Crailsheim, K. Flight performance of artificially reared honeybees (*Apis mellifera*) . *Apidologie* 2009, 40(4), 441–449. doi:10.1051/apido/2009006.
209. Vance, J. T.; Williams, J. B.; Elekonich, M. M.; Roberts, S. R. The effects of age and behavioral development on honey bee (*Apis mellifera*) flight performance. *Journal of Experimental Biology* 2009, 212(16), 2604–2611. doi:10.1242/jeb.028100.
210. Bailey, L.; Ball, B. V. *Honey Bee Pathology*. Academic Press 1991. ISBN: 0120734818.
211. Crailsheim, K. Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of insect physiology* 1988, 34(9), 839–845. doi.org/10.1016/0022-1910(88)90117-5.
212. Brodschneider, R.; Omar, E.; Crailsheim, K. Flight performance of pollen starved honey bees and incomplete compensation through ingestion after early life pollen deprivation. *Frontiers in Physiology* 2022, 13, 1–11. doi:10.3389/fphys.2022.1004150.
213. Kešnerová, L.; Emery, O.; Troilo, M.; Liberti, J.; Erkosar, B.; Engel, P. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *ISME Journal* 2020, 14(3), 801–814. doi:10.1038/s41396-019-0568-8.
214. Hungerford, N. L.; Zhang, J.; Smith, T. J.; Yates, H. S. A.; Chowdhury, S. A.; Carter, J. F.; De Jesus, M. C.; Fletcher, M. C. Feeding Sugars to Stingless Bees: Identifying the Origin of Trehalulose-Rich Honey Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2021, 69(35), 10292–10300. doi:10.1021/acs.jafc.1c02859.
215. Dobre, I.; Georgescu, L. A.; Alexe, P.; Escuredo, O.; Seijo, M. C. Rheological behavior of different honey types from Romania. *Food Research International* 2012, 49(1), 126–132. doi:10.1016/j.foodres.2012.08.009.
216. Schrenk, D.; Bignami, M.; Bodin, L.; Chipman, J. K.; Del Mazo, J.; Grasl-Kraupp, B.; Hogstrand C.; Hoogenboom, L.; Leblanc, J.; Nebbia, C. S.; Nielsen, E.; Ntzani, E.; Petersen, A.; Schwerdtle, T.; Vleminckx, C.; Wallace, H.; Focks, A.; Gregorc, A.; Metzler, M.; Sgolastra, F.; Tosi, S.; Horvath, Z.; Ippolito, A.; Rortais, A.; Steinkellner, H.; Szentés, C.; Sand, S. Evaluation of the risks for animal health related to the presence of hydroxymethylfurfural (HMF) in feed for honey bees. *EFSA Journal* 2022, 20(4), 1–101. doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7227.

217. Krishnan, R.; Mohammed, T.; Kumar, G. S.; Arunima, S. H. Honey crystallization: Mechanism, evaluation and application. *The Pharma Innovation* 2021, 10(5), 222–231. doi:10.22271/tpi.2021.v10.i5sd.6213.
218. Kimura, A.; Yoshida-Kitahara, F.; Chiba, S. Characteristics of Transglucosylation of Honeybee α -Glucosidase I. *Agricultural and Biological Chemistry* 1987; 51(7), 1859-1864. doi.org/10.1080/00021369.1987.10868294.
219. Mitchell, D. Thermal efficiency extends distance and variety for honeybee foragers: Analysis of the energetics of nectar collection and desiccation by *Apis mellifera*. *Journal of the Royal Society Interface* 2019, 16(150). doi:10.1098/rsif.2018.0879.
220. Hellmich, R. L.; Kulinčević, J. M.; Rothenbuhler, W. C. Selection for high and low pollenhoarding honey bees. *The Journal of Heredity* 1985, 76(3), 155–158. doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110056
221. Leponiemi, M.; Freitak, D.; Moreno-Torres, M.; Pferschy-Wenzig, E. M.; Becker-Scarpitta, A.; Tiusanen, M.; Vesterinen E. J.; Wirta, H. Honeybees' foraging choices for nectar and pollen revealed by DNA metabarcoding. *Scientific Reports* 2023, 13, 1-15. doi:10.1038/s41598-023-42102-4.
222. Oxley, P. R.; Oldroyd, B. P. Chapter 3 - The Genetic Architecture of Honeybee Breeding. *Advances in Insect Physiology* 2010, 39, 83-118. doi:10.1016/B978-0-12-381387-9.00003-8.
223. Metz, B. N.; Tarpy, D. R. Reproductive senescence in drones of the honey bee (*Apis mellifera*). *Insects* 2019, 10(1), 1-17. doi:10.3390/insects10010011.
224. Baudry, E.; Solignac, M.; Garnery, L.; Gries, M.; Cornuet, J.-M.; Koeniger, N. Relatedness among Honeybees (*Apis mellifera*) of a Drone Congregation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 1998, 265, 2009-2014. doi: 10.1098/rspb.1998.0533.
225. Bernfeld, P. [17] Amylases, α and β . *Methods in Enzymology* 1955; 1, 149–158. doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5.
226. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976, 72(1-2), 248-254. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.
227. Al-Sherif, A. A.; Mazeed, A. M.; Ewis, M. A.; Nafea, E. A.; Hagag, E. S. E.; Kamel, A. A. Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two subspecies of honeybee (*Apis mellifera* L). *Physiological Entomology* 2017, 42(4), 397–403. doi:10.1111/phen.12213.
228. Davis, B. J. Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1964, 121(2), 404-427. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x>.
229. Dojnov, B.; Vujčić, Z. Fast and reliable method for simultaneous zymographic detection of glucoamylase and α -amylase in fungal fermentation. *Analytical Biochemistry* 2012, 421(2), 802–804. doi:10.1016/j.ab.2011.11.039.
230. Heussen, C.; Dowdle, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry* 1980, 102(1), 196-202. doi.org/10.1016/0003-2697(80)90338-3.

231. Crailsheim, K.; Stolberg, E. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 1989; 35(8), 595-602. doi.org/10.1016/0022-1910(89)90121-2
232. Zhu-Salzman, K.; Zeng, R. Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors. *Annual Review of Entomology* 2015, 60, 233–252. doi:10.1146/annurev-ento-010814-020816.
233. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680–685. doi:10.1038/227680a0.
234. Dojnov, B.; Pavlović, R.; Božić, N.; Margetić, A.; Nenadović, V.; Ivanović, J.; Vujčić, Z. Expression and distribution of cellulase, amylase and peptidase isoforms along the midgut of *Morimus funereus* L. (Coleoptera: Cerambycidae) larvae is dependent on nutrient substrate composition. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 2013, 164(4), 259–267. doi:10.1016/j.cbpb.2013.02.001.
235. Değirmenci, L.; Rogé Ferreira, F. L.; Vukosavljevic, A.; Heindl, C.; Keller, A.; Geiger, D.; Scheiner, R. Sugar perception in honeybees. *Frontiers in Physiology* 2023, 13, 1-9. doi:10.3389/fphys.2022.1089669.
236. Özcan, M.; Arslan, D.; Ali Ceylan, D. Effect of inverted saccharose on some properties of honey. *Food Chemistry* 2006, 99(1), 24–29. doi:10.1016/j.foodchem.2005.07.009.
237. Bugarova, V.; Godocikova, J.; Bucekova, M.; Brodschneider, R.; Majtan, J. Effects of the carbohydrate sources nectar, sucrose and invert sugar on antibacterial activity of honey and bee-processed syrups. *Antibiotics* 2021, 10(8), 1-15. doi:10.3390/antibiotics10080985.
238. Eyer, M.; Neumann, P.; Dietemann, V. A look into the cell: Honey storage in honey bees, *Apis mellifera*. *PLoS ONE* 2016, 11(8), 1-20. doi:10.1371/journal.pone.0161059.
239. Camazine, S.; Sneyd, J.; Jenkins, M. J.; Murray, J. D. A Mathematical Model of Self-Organized Pattern Formation on the Combs of Honeybee Colonies. *Journal of Theoretical Biology* 1990, 147(4), 553-571. doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80264-4.
240. Visscher, K.; Crailsheim, K.; Sherman, G. How do honey bees (*Apis mellifera*) fuel their water foraging flights? *Journal of Insect Physiology* 1996, 42(11-12), 1089–1094. doi.org/10.1016/S0022-1910(96)00058-3.
241. Bucekova, M.; Valachova, I.; Kohutova, L.; Prochazka, E.; Klaudiny, J.; Majtan, J. Honeybee glucose oxidase - Its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften* 2014, 101(8), 661–670. doi:10.1007/s00114-014-1205-z.
242. Weston, R. J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry* 2000, 71, 235–239. doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00162-X.
243. Bartlett, L. J.; Martinez-Mejia, C.; Delaplane, K. S. Honey Bees (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae) Preferentially Avoid Sugar Solutions Supplemented with Field-Relevant Concentrations of Hydrogen Peroxide Despite High Tolerance Limits. *Journal of Insect Science* 2022, 22(1). doi:10.1093/jisesa/ieab102.
244. Persano Oddo, L.; Piazza, M. G.; Pulcini, P. Invertase activity in honey. *Apidologie* 1999, 30(1), 57–65. doi:10.1051/apido:19990107.

245. Kimura, A.; Takewaki, S.; Matsui, H.; Kubota, M.; Chiba, S. Allosteric properties, substrate specificity, and subsite affinities of honeybee alpha-glucosidase I. *The Journal of Biochemistry* 1990, 107(5), 762-768. doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123122.
246. Liu, J.; Cheng, J.; Huang, M.; Shen, C.; Xu, K.; Xiao, Y.; Pan, W.; Fang, Z. Identification of an Invertase With High Specific Activity for Raffinose Hydrolysis and Its Application in Soymilk Treatment. *Frontiers in Microbiology* 2021, 12, 1-13. doi:10.3389/fmicb.2021.646801.
247. Donkersley, P.; Rhodes, G.; Pickup, R. W.; Jones, K. C.; Wilson, K. Honeybee nutrition is linked to landscape composition. *Ecology and Evolution* 2014, 4(21), 4195-4206. doi:10.1002/ece3.1293.
248. Sagili, R. R.; Metz, B. N.; Lucas, H. M.; Chakrabarti, P.; Breece, C. R. Honey bees consider larval nutritional status rather than genetic relatedness when selecting larvae for emergency queen rearing. *Scientific Reports* 2018, 8(1), 1-11. doi:10.1038/s41598-018-25976-7.
249. Tsuruda, J. M.; Chakrabarti, P.; Sagili, R. R. Honey Bee Nutrition. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice* 2021, 37(3), 505-519. doi:10.1016/j.cvfa.2021.06.006.
250. Mayack, C.; Naug, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 2009, 100(3), 185-188. doi:10.1016/j.jip.2008.12.001.
251. Wang, Y.; Ma, L. T.; Xu, B. H. Diversity in life history of queen and worker honey bees, *Apis mellifera* L. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 2015, 18(2), 145-149. doi:10.1016/j.aspen.2014.11.005.
252. Zoltowska, K.; Frączek, R.; Lipiński, Z. Hydrolases of developing worker brood and newly emerged worker of *Apis mellifera carnica*. *Journal of Apicultural Science* 2011, 55(1), 27-36.
253. Liu, C.; Steere, L.; McGregor, C.; Frederick, B. H.; Pastoor, T.; Zhou, Y.; Liu, T.; Cai, Y.; Zhou, H.; Xu, M.; Wang, J.; Kim, S. H.; Whitesell, L.; Cowen, L. E.; Zhang, Y. Exploring boron applications in modern agriculture: A structure-activity relationship study of a novel series of multi-substitution benzoxaboroles for identification of potential fungicides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2021, 43, 1-8. doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128089.
254. Avis, T. J.; Rioux, D.; Simard, M.; Michaud, M.; Tweddell, R. J. Ultrastructural Alterations in *Fusarium sambucinum* and *Heterobasidion annosum* Treated with Aluminum Chloride and Sodium Metabisulfite. *Phytopathology* 2009, 99(2), 167-175. doi:10.1094/PHYTO-99-2-0167.
255. Zhang, G.; Zhang, W.; Cui, X.; Xu, B. Zinc nutrition increases the antioxidant defenses of honey bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 2015, 156(3), 201-210. doi:https://doi.org/10.1111/eea.12342.
256. Hýbl, M.; Šipoš, J.; Krejčová, A.; Sodomová, K.; Polák, O.; Koláčková, I.; Mráz, P. Preference of Pollinators over Various Forage Mixtures and Microelement Treatments. *Agronomy* 2022, 12(2), 1-14. doi:10.3390/agronomy12020370.
257. Hussain, R.; Hasan, M.; Iqbal, K. J.; Zafar, A.; Tariq, T.; Saif, M. S.; Hassan, S. G.; Shu, X.; Caprioli, G.; Anjum, S. I. Nano-managing silver and zinc as bio-conservational approach against pathogens of the honey bee. *Journal of Biotechnology* 2023, 365, 1-10. doi:10.1016/j.jbiotec.2023.01.009.

258. Sibiya, A.; Gopi, N.; Jeyavani, J.; Mahboob, S.; Al-Ghanim, K. A.; Sultana, S.; Mustafa, A.; Govindarajan, A.; Vaseeharan, B. Comparative toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate in freshwater fish *Oreochromis mossambicus*: A multi-biomarker approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2022, 259, 1-11. doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109391.
259. Pacheco, N. I. N.; Semerad, J.; Pivokonsky, M.; Cajthaml, T.; Filip, J.; Busquets-Fité, M.; Dvorak, J.; Rico, A.; Prochazkova, P. Effects of silver sulfide nanoparticles on the earthworm *Eisenia andrei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2022, 257, 1-9. doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109355.
260. Nriagu, J. O.; Nieboer, E. *Chromium in the Natural and Human Environments* 1988, 20, John Wiley & Sons, New York. ISBN: 978-0-471-85643-6.
261. Ścibior, A.; Pietrzyk, Ł.; Plewa, Z.; Skiba, A. Vanadium: Risks and possible benefits in the light of a comprehensive overview of its pharmacotoxicological mechanisms and multi-applications with a summary of further research trends. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2020, 61, 1-25. doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126508.
262. Ali, M.; Wang, X.; Haroon, U.; Chaudhary, H. J.; Kamal, A.; Ali, Q.; Saleem, M. H.; Usman, K.; Alatawi, A.; Ali, S.; Munis, M. F. H. Antifungal activity of Zinc nitrate derived nano ZnO fungicide synthesized from *Trachyspermum ammi* to control fruit rot disease of grapefruit. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2022, 233, 1-8. doi:10.1016/j.ecoenv.2022.113311.
263. Cho, S.; Lee, S. H.; Kim, S. Determination of the optimal maturation temperature for adult honey bee toxicity testing. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2022, 257, 1-8. doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109359.
264. Aldgini, H. M. M.; Abdullah Al-Abbadi, A.; Abu-Nameh, E. S. M.; Alghazeer, R. O. Determination of metals as bio indicators in some selected bee pollen samples from Jordan. *Saudi Journal of Biological Sciences* 2019, 26(7), 1418–1422. doi:https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.03.005.
265. Temizer, İ. K.; Güder, A.; Temel, F. A.; Avci, E. A comparison of the antioxidant activities and biomonitoring of heavy metals by pollen in the urban environments. *Environmental Monitoring and Assessment* 2018, 190(8), 1-12. doi:10.1007/s10661-018-6829-6.
266. Calderone, N. W. Evaluation of drone brood removal for management of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the northeastern United States. *Journal of Economic Entomology* 2005, 98(3), 645–650. doi:10.1603/0022-0493-98.3.645.
267. Seeley, T. D. The effect of drone comb on a honey bee colony's production of honey. *Apidologie* 2002, 33(1), 78-86. 10.1051/apido:2001008.
268. Lecocq, A.; Foley, K.; Jensen, A. B. Drone brood production in Danish apiaries and its potential for human consumption. *Journal of Apicultural Research* 2018, 57(3), 331–336. doi:10.1080/00218839.2018.1454376.
269. Posada-Florez, F.; Lamas, Z. S.; Hawthorne, D. J.; Chen, Y.; Evans, J. D.; Ryabov, E. V. Pupal cannibalism by worker honey bees contributes to the spread of deformed wing virus. *Scientific reports* 2021, 11(1), 1-12. doi:10.1038/s41598-021-88649-y.

Биографски подаци кандидата

Ратко П. Павловић је рођен 12.08.1982 године у Сарајеву. Уписао је Универзитет у Београду - Биолошки факултет 2001. године, а завршио га је 2007. године и стекао звање дипломирани професор биологије и хемије за основну школу. Одбранио је дипломски рад под насловом „Оптимизовање добивања инвертазе из пекарског квасца *Saccharomyces cerevisiae*“.

Године 2009. је уписао мастер академске студије на Универзитету у Београду - Хемијском факултету, на студијском програму Биохемија, а завршио их је 2011 и стекао звање мастер биохемичар. Одбранио је мастер рад под насловом „Дистрибуција целулаза и амилаза у дигестивном тракту ларви букове стрижибубе (*Morimus funereus* Muls.) у зависности од хранљивог супстрата“.

Школске 2018/2019. године уписао је докторске академске студије на Универзитету у Београду - Хемијском факултету, на студијском програму Биохемија. У току докторских студија се усавршавао на катедри за аналитичку хемију (Универзитет Карл Францис, Грац, Аустрија) током боравака у оквиру „СЕЕРУС“ размене студената.

Пчеларством се бави од детињства, а професионално од 2014. године. Он је званични предавач Савеза пчеларских организација Србије и дуги низ година држи предавања из различитих области пчеларства широм Србије. Објавио је више чланака у нашем најважнијем стручном часопису „Српски пчелар“, где је и члан редакције.

Научно-истраживачки рад Ратка Павловића је усмерен на изучавање дигестивних ензима и исхране инсеката. У току докторског рада своја истраживања усмерио је на испитивање утицаја хране на медоносну пчелу.

Циљеви истраживања су унапређење пчеларства кроз научно доказане позитивне ефекте нових замена за полен и нектар у исхрани пчела. Резултате својих истраживања публикује у међународним научним часописима и представља их на престижним научним конференцијама.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ратко П. Павловић

Број индекса ДБ 05/2018

Изјављујем

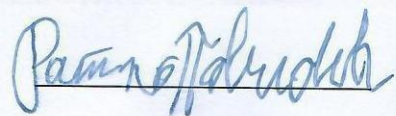
да је докторска дисертација под насловом

Испитивање утицаја одабраних замена за полен и нектар у исхрани медоносне пчеле
(*Apis mellifera* L.) на профил дигестивних ензима, варење, дужину живота и масу
радилица

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 23. 01. 2025.



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ратко П. Павловић

Број индекса ДБ 05/2018

Студијски програм Доктор биохемијских наука

Наслов рада

Испитивање утицаја одабраних замена за полен и нектар у исхрани медоносне пчеле (*Apis mellifera* L.) на профил дигестивних ензима, варење, дужину живота и масу радилица

Ментор

др Зоран Вујчић, редовни професор Хемијског факултета, Универзитета у Београду

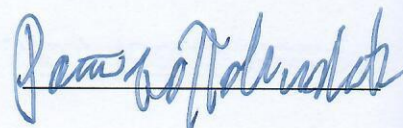
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 23.01.2025.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање утицаја одабраних замена за полен и нектар у исхрани медоносне пчеле (*Apis mellifera* L.) на профил дигестивних ензима, варење, дужину живота и масу радилица

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)

② Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

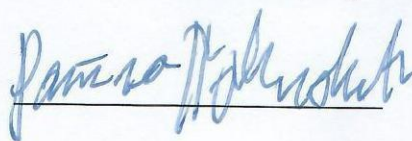
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 23.01.2025.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.