Utjecaj snage pčelinje zajednice na skupljanje pčelinjeg otrova metodom elektrostimulacije

Balen Percela, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:131134

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Ekološka poljoprivreda i agroturizam

LEA BALEN PERCELA

Utjecaj snage pčelinje zajednice na skupljanje pčelinjeg otrova metodom elektrostimulacije

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Ekološka poljoprivreda i agroturizam

LEA BALEN PERCELA

Utjecaj snage pčelinje zajednice na skupljanje pčelinjeg otrova metodom elektrostimulacije

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Dragan Bubalo

Neposredni voditelj: dr. sc. Saša Prđun

Zagreb, 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Lea Balen Percela**, JMBAG 018090879, rođena dana 6. siječnja 1993. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

Utjecaj snage pčelinje zajednice na skupljanje pčelinjeg otrova metodom elektrostimulacije

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

_____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Lee Balen Percele**, JMBAG 018090879, naslova

Utjecaj snage pčelinje zajednice na skupljanje pčelinjeg otrova metodom elektrostimulacije

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo: potpisi:

prof. dr. sc. Dragan Bubalo - mentor _____

dr. sc. Saša Prđun - neposredni voditelj _____

doc. dr. sc. Krešimir Čopec - član _____

doc. dr. sc. Nenad Jalšenjak - član _____

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Lee Balen Percele**, naslova

Utjecaj snage pčelinje zajednice na skupljanje pčelinjeg otrova metodom elektrostimulacije

Proizvodnja meda u posljednje vrijeme postaje sve upitnija zbog češćih ekstremnih klimatskih promjena. Zbog navedenog se razloga nameće potreba razvijanja proizvodnje i drugih pčelinjih proizvoda. Jedan od pčelinjih proizvoda, koji zaslužuje pozornost, svakako je pčelinji otrov. Stoga je potrebno upotpuniti saznanja o mogućnostima proizvodnje pčelinjeg otrova suvremenom metodom elektrostimulacije radilica. Istraživanje je bilo provedeno na području Daruvara na ukupno 18 pčelinjih zajednica, koje su bile podijeljene u dvije skupine od po devet pčelinjih zajednica. Liebefeld metodom izdvojene su po tri ujednačene podskupine s tri pčelinje zajednice različite snage. Skupljanje se pčelinjeg otrova provodilo pomoću devet uređaja metodom elektrostimulacije radilica. Postupak se skupljanja provodio tijekom tri uzastopna dana na tri zajednice različite snage s razmakom od tjedan dana sa skupljačima postavljenim na ulazu u košnicu (leto košnice) i unutar košnice (na satonošama). U istraživanju su bile utvrđene statistički značajne razlike u masi pčelinjeg otrova između jakih (0,193 g) i srednje jakih (0,164 g) te između srednje jakih i slabih (0,111 g) pčelinjih zajednica. S obzirom na položaj skupljača pčelinjeg otrova bila je utvrđena statistički značajna razlika u masi pčelinjeg otrova kod skupljača postavljenih na satonošama (0,165 g) u odnosu na leto košnice (0,148 g). Također, statistički značajna razlika utvrđena je u količini skupljenog otrova u jutarnjim (0,173 g) u odnosu na količinu skupljenu u popodnevnim satima (0,131 g), kao i u količini skupljenog između predvečernjih (0,166 g) i popodnevnih sati, dok između jutarnjih i predvečernjih sati nije bilo statistički značajne razlike.

Ključne riječi: pčelinja zajednica, pčelinji otrov, metoda elektrostimulacije

Summary

Of the master's thesis – student **Lea Balen Percela,** entitled

Influence of the honey bee colony strength on collecting bee venom by electro stimulation method

Honey production has become more and more questionable lately because of more frequent extreme climate changes. For this reason, it's necessary to develop production and other bee products. One of the bee products that deserves attention is certainly bee venom. Therefore, it's necessary to complete the knowledge on the possibilities of producing bee venom by a modern method of electro stimulation. The study was conducted in Daruvar area. The experiment was carried out on a total of 18 honey bee colonies divided into two groups of nine colonies. Three unified subgroups with three beehives of different strength was separated by Liebefeld method. Collection of bee venom from worker bees was carried out by nine electro stimulation devices. The collection process was carried out over three consecutive days to three different strength colonies with a spacing of one week with the collectors placed at the entrance of the hive and into the hive (on frames). The study showed statistically significant differences in bee venom weight between strong (0.193 g), medium strong (0.164 g) and between medium strong and weak (0.111 g) honey bee colonies. Considering the position of the collector, a statistically significant difference in the weight of bee venom was found with the collectors on frames (0.165 g) compared to collector on entrance of the hive (0.148 g). A statistically significant difference was also found in the amount of collected bee venom in the morning (0.173 g) compared to the amount collected in the afternoon (0.131 g), as well as the amount in the early evening (0.166 g) and afternoon hours. There were no statistically significant differences between the morning and the early evening hours in the amount of collected bee venom.

Keywords: honey bee colony, bee venom, electro stimulation method

SADRŽAJ

1. Uvod 1
1.1. Hipoteze i cilj istraživanja 1
2. Pregled literature 2
2.1. Sistematika pčele 2
2.2. Građa žalčanog aparata 2
2.3. Kemijski sastav pčelinjeg otrova 3
2.3.1. Melitin 4
2.3.2. Apamin 5
2.3.3. MCD-peptid 6
2.3.4. Proteazni inhibitori 6
2.3.5. Adolapin 7
2.4. Kontrola kvalitete pčelinjeg otrova 7
2.5. Skupljanje pčelinjeg otrova 9
3. Materijali i metode 13
3.1. Područje istraživanja 13
3.2. Pokusne pčelinje zajednice 13
3.3. Skupljanje pčelinjeg otrova 14
3.4. Statistička obrada podataka 16
4. Rezultati i rasprava 17
4.1. Masa pčelinjeg otrova s obzirom na snagu pčelinje zajednice 17
4.2. Masa pčelinjeg otrova s obzirom na položaj skupljača 18
4.3. Masa pčelinjeg otrova prema danima skupljanja 19
4.4. Masa pčelinjeg otrova tijekom dana 20
5. Zaključak 22
6. Popis literature 23

1. Uvod

Proizvodnja meda u posljednje vrijeme postaje sve upitnija zbog češćih ekstremnih klimatskih promjena (suše, dugotrajna kišna razdoblja). Zbog navedenog se razloga nameće potreba razvijanja proizvodnje i drugih pčelinjih proizvoda. Jedan od pčelinjih proizvoda koji zaslužuje pozornost svakako je pčelinji otrov. Naime, proizvodnja pčelinjeg otrova nema dugu tradiciju, a u posljednje vrijeme potražnja za potrebe farmaceutske i kozmetičke industrije sve više raste, kako kod nas, tako i u Europi. Otrovi životinja, posebice kukaca, odavno se koriste u znanstvenim istraživanjima, a danas i kao osnova mnogih preparata i lijekova koji su od velike koristi u medicini. Od brojnih prirodnih spojeva koji se koriste u orijentalnoj i alternativnoj medicini, otrovi izolirani iz mnogih organizama svoju primjenu imaju već dugi niz godina, a među njima najznačajniji je otrov iz medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) (Gajski, 2012). Sve do 60-ih godina prošlog stoljeća proizvodnja je pčelinjeg otrova bila ograničena nedostatkom prigodnih tehnika za njegovo skupljanje. Do tada se otrov dobivao iz ekstrakata žalčanih aparata ili pažljivim odstranjivanjem otrovnog mjehura. Pčelinji se otrov dobivao i omamljivanjem pčela pomoću etera ili kloroforma. Navedene metode skupljanja otrova su bile spore i izvedive samo u laboratorijskim uvjetima, a posljedica je toga bila iznimna skupoća. Sredinom 50-ih godina prošlog stoljeća započela je primjena skupljanja otrova elektrošok metodom, tj. iritiranjem pčela slabo izmjeničnom strujom (Kezić i sur., 2014). Stoga je potrebno upotpuniti saznanja o mogućnostima proizvodnje pčelinjeg otrova suvremenom metodom elektrostimulacije radilica.

1.1. Hipoteze i cilj istraživanja

U ovom se istraživanju utvrđivao utjecaj snage pčelinje zajednice na skupljanje pčelinjeg otrova metodom elektrostimulacije te je za pretpostaviti bilo da će se količina skupljenog otrova razlikovati s obzirom na snagu pčelinje zajednice i na vrijeme skupljanja tijekom dana, a da se neće razlikovati količina pčelinjeg otrova skupljenog na ulazu (leto) i unutar košnice (satonošama). Stoga je cilj istraživanja bio utvrditi utjecaj snage pčelinje zajednice na količinu pčelinjeg otrova elektrostimulacijom pri skupljanju na ulazu (leto) i unutar košnice, (satonošama), kao i utvrditi postoje li razlike u količini pčelinjeg otrova skupljenog u jutarnjim, popodnevnim i predvečernjim satima.

2. Pregled literature

2.1. Sistematika pčele

Taksonomski gledano medonosna pčela (*Apis mellifera L*.) svrstana je u:

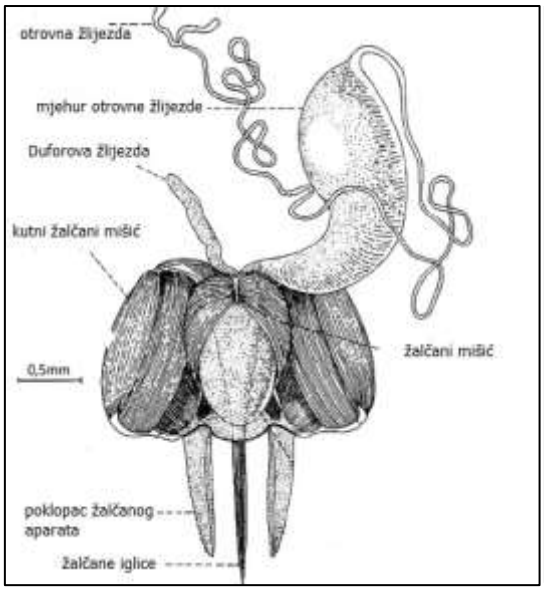
Koljeno: člankonošci (*Arthropoda*)
Red: kukci (*Insecta*)
Razred: opnokrilci (*Hymenoptera*)
Porodica: pčele (*Apidae*)
Rod: pčele (*Apis L.)*
Vrsta: *Apis mellifera* L.

Pčele su zadružni kukci koji žive u velikim zajednicama, gdje svaka jedinka obavlja svoju ulogu te time predstavlja svojevrstan „superorganizam“ (Brodschneider i Crailsheim, 2010.). Prema strukturi pčelinja se zajednica sastoji od jedne matice i nekoliko desetaka tisuća radilica te od nekoliko stotina trutova.

2.2. Građa žalčanog aparata

Pčelinji otrov je izlučevina žalčane žlijezde radilica i matica, a ima ulogu zaštite pčela i pčelinje zajednice od različitih neprijatelja. Izlučivanjem otrova širi se alarmni feromon koji upozorava ostale članove pčelinje zajednice na prisutnost mogućeg neprijatelja i posljedično tome potrebu za obranom (Bovi i sur., 2017).

Žalac je smješten na kraju zatka, a za vrijeme mirovanja pokriven je desetom leđnom i trbušnom ljuskom (Kezić i sur., 2013). Građen je od preformiranih ljuščica 11. i 12. kolutića zatka, a završava s dvije žalčane iglice. Svaka od tih iglica ima na svojem zašiljenom kraju zupce koji su vrškom okrenuti naprijed. U neposrednoj vezi sa žalcem nalazi se i otrovna žlijezda koja se nalazi ispod crijeva u stražnjem dijelu šupljine zatka. Sastoji se od tanke, mnogo puta savijene cijevi koja se u prednjem dijelu račva u dvije kratke cijevi (slika 1 i 2). Na stražnjem se kraju ova žlijezda proširuje u veliki mjehur u kojem se skuplja otrov dok je otvor otrovne žlijezde u prednjem dijelu žalčanog žlijeba. Sam žalac se sastoji od žalčanog žlijeba i dviju žalčanih iglica. Iako je žalac skriven, on je ustvari vanjski organ i vrlo se laganim povlačenjem za žalčane iglice može izvući iz tijela.



Slika 1. Građa žalca



Slika 2. Žalac

Izvor: *(Ferreira i sur., 2012., modificirano)*

Izvor*: (flickr.com/photos/bowwowbeach)*

Žalčani žlijeb je dug 2,25 mm, prema gore proširen, a prema dolje sužen i otvoren. Šupalj je i sastoji se od dvije stijenke. Prema gore se na žalčani žlijeb nastavljaju dva luka, čiji su krajevi u vezi s tzv. duguljastim pločicama. U samom se žalčanom žlijebu nalaze dvije iglaste šuplje hitinske tvorbe, žalčane iglice, koje zajedno predstavljaju žalac u užem smislu. Svaka od tih iglica ima na svojem zašiljenom kraju zupce, koji su svojim vrškom okrenuti prema gore. Žalac radilice ima 10 takvih zubaca, a matica samo tri. U gornjem dijelu svaka iglica nosi po jednu izraslinu s malom elastičnom kožicom, koje prilikom međusobnog pomicanja iglica isišu otrov iz mjehura. Uz žalčani aparat nalazi se i manja Dufor-ova žlijezda (ranijeg naziva alkalna), a opisana je kao žlijezda koja luči sekret koji podmazuje žalčani aparat. Odvodni kanal ove žlijezde ulijeva se na početku žalčanog mehanizma ispod otvora mjehura. Sekret koji luči je sluzav i alkaličan. (Kezić i sur., 2014).

2.3. Kemijski sastav pčelinjeg otrova

Pčelinji otrov je veoma složenog kemijskog sastava. U mjehuru otrovne žlijezde, odnosno spremniku nalazi se 0,3 do 0,5 mg pčelinjeg otrova (Belčić i sur., 1985). Naime, 75% suhe tvari otrova se sastoji od bjelančevina, a od anorganskih tvari u nešto većoj količini zastupljeni su kalcij (0,26%), magnezij (0,49%) i fosfor (0,42%). Specifičnog je mirisa i kisele reakcije, pH 4,5 – 5,5 (El-Saeady i sur., 2016). Specifična težina mu je 1,131g. Na zraku brže očvrsne i oslobađa hlapljive frakcije.

Lako je topiv u vodi, a teže u alkoholu. Termostabilna je tvar, a na niskoj temperaturi ne gubi toksična svojstva. U suhom se obliku može čuvati i godinu dana. Na suhu tvar otpada 30 – 40%, a u hlapljivoj frakciji se osim vode nalaze i hlapljivi esteri za koje se smatra da izazivaju alarmnu reakciju u pčelinjoj zajednici (n-amil acetat, izoamil acetat, etil acetat).Sagorijevanjem otrova na 500 – 600°C zaostaje pepeo u količini od 3-4% suhog otrova. Oko 80% suhe tvari čine bjelančevine i peptidi, a ujedno su i najaktivniji sastojci u biokemijskom i farmakološkom smislu dok se sadržaj vode u pčelinjem otrovu kreće se između 55 i 70 % (Jašić i sur.,2017). Od enzima najzastupljeniji su hialurondidaza, fosfolipaza, kisela fosfataza, glukozidaza, lizofosfolipaza, a od bjelančevina melitin, apamin, MCD-peptid, proteazni inhibitori, adolapin (Jelli, 1990). Glavne sastavnice pčelinjeg otrova, poput melitina, apamina i fosfolipaze su otrovne za neke životinjske vrste (Bovi i sur., 2017). Unatoč svojoj otrovnosti, pčelinji otrov u određenoj dozi ima koristan učinak na ljudski organizam (Erler i Moritiz, 2016). Nadalje, otrovna žlijezda važan je izvor antimikrobnih substanci s dokazanim antibakterijskim učinkom (Han i sur., 2013).

2.3.1. Melitin

Melitin je bazni peptid formule $C_{131}\,H_{228}\,N_{38}\,O_{32}$ i čini oko 52% svih peptida u pčelinjem otrovu. Jaki je antiupalni agens, odnosno slab je alergen - stvaraju se antitijela male aktivnosti i potiče izlučivanje kortizola, hormona nadbubrežne žlijezde u tijelu. Uzrokuje oslobađanje histamina i glavna je komponenta koja uzrokuje bol. I melitin i apamin uzrokuju da tijelo oslobodi kortizol, prirodni steroid, dok je peptid 401 snažno protuupalno sredstvo. Glavne aminokiseline u pčelinjem otrovu su cistein i metionin, od kojih oba sadrže sumpor koji je važan u izazivanju otpuštanja kortizola iz nadbubrežne žlijezde (www.chm.bris.ac.uk.).

Sastavljen je od 26 aminokiselina (Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln), a oko 10% molekula melitina povezano je s radikalom mravlje kiseline (Gajski, 2012). U medicinskoj praksi se koriste male doze melitina (10 – 30mg/kg), a on sačinjava preko 90% terapeutski aktivnog peptidnog kompleksa otrova.

Mala koncentracija melitina u otopini s niskim sadržajem soli pokazuje raspored molekula peptida kao monomera, a u vodi je topiv kao tetramer (dolazi do sakupljanja monomera u tetramere). Površinska napetost je vrlo mala, što uvjetuje farmakološka svojstva melitina, isto tako omogućava pokretljivost aniona što je vrlo

važno za objašnjenje nastanka bola. Naime, bol nastaje nadražajem slobodnih živčanih receptora koji se nalaze u koži (nociceptori). U fazi mirovanja neuron je polariziran, odnosno s unutrašnje strane membrane se nalaze anioni izbalansirani s jednakom količinom K^+ iona, a s vanjske strane su pozitivni ioni Na^+ i negativni ioni Cl^-. Višak pozitivnog naboja je na vanjskoj strani membrane, a negativnog na unutrašnjoj. Ako se stanice nadraže mehanički, kemijski ili termički povećava se propusnost membrane za ione Na^+. Oni se raspršuju u unutrašnjost stanice zbog visoke vanjske koncentracije. Tako unutrašnjost stanice postaje elektropozitivna jer zbroj Na^+ i K^+ premašuje zbroj negativnih iona. Pri tome melitin disocira na neaktivne monomere, ali je i dalje na površini stanice. Kad živčana stanica obnovi potencijal odmora od -70mV, melitin ponovno stvori aktivne tetramere i depolarizira membranu. Potencijal membrane u odmoru je posljedica nejednake intra i ekstra celularne koncentracije iona. Taj ciklus traje dok se melitin ne razlije u okolno tkivo toliko da ne može dalje stvarati tetramere (Jelli, 1990).

Toksična doza melitina ubrizgana u kožu je 15 do 20 puta veća od one ubrizgane u venu, toksična doza primijenjena intravenski (4-6mg/kg) uzrokuje jaku povišenost krvnog tlaka i poremećaj u radu srčanog mišića (Jelli, 1990).

U tradicionalnoj medicini, pčelinji otrov se obično koristi u liječenju artritisa, amiotrofne lateralne skleroze, bolesti jetre, raka debelog crijeva, bolesti kože, metaboličkih poremećaja i bolesti živčanog sustava. Tradicionalna terapija koristi izravne ubode pčela, obzirom na broj čimbenika zbog kojih može biti nedostataka, potrebno je oblikovati odgovarajući sustav terapije koja daje izračunatu, dugotrajnu i stalnu terapijsku dozu (Saeed i Khalil, 2017).

Melitin se također istražuje kao sredstvo protiv raka. Modificiranjem molekule melitina – imunotoksina (sprječavanje alergijske reakcije i povezivanje antitijela specifičnih za rak) znanstvenici se nadaju da će proizvesti, tzv. "čarobni metak" tretman. Zbog toga što bi samo uništila stanice raka za razliku od uobičajenih kemoterapijskih sredstava (www.chm.bris.ac.u).

2.3.2. Apamin

U suhom pčelinjem otrovu apamina ima 2-3 %, a sastavljen je od 18 aminokiselina i jedan je od najmanjih prirodnih peptida. Apamin je pčelinji neurotoksin, aktivan u središnjem živčanom sustavu. To je 18-peptid čiji

aminokiselinski ostaci 13 i 14 igraju bitnu ulogu za vezanje na njegov receptor i za prikazivanje toksičnosti (Albericio i sur., 1984).

Apamin je mala molekula koja može prelaziti iz krvi u mozak, odnosno ima sposobnost probiti krvno-moždanu barijeru, nepropusnu zμa mnoge lijekove, a kao komponenta pčelinjeg otrova najjače djeluje na hipofizno-nadbubrežni sustav. Povećava razinu kortizola i adrenalina koji sprječava manifestaciju nekih upalnih reakcija. Istovremeno povisuje krvni tlak i znatno smanjuje broj stanica koje proizvode antitijela. Ovaj biološki aktivan peptid ometa kanal iona kalija K^+ koji omogućava dosta brzo i selektivno propuštanje iona kalija izvan živčanog sustava. Dakle, blokiranjem ionskih membranskih kanala otežava se prolaz iona kroz stanične membrane, što u mozgu uzrokuje da živci postaju hipersenzibilni, čime se poboljšava sposobnost učenja, a to sve skupa ima dublje značenje u liječenju demencije i depresije. Osim toga, pokazalo se da injekcija apamina poboljšava opće stanje oboljelih od miotonične mišićne distrofije (MD-a). Također, pokazalo se da mali dio ubrizganog peptida u vene prelazi u mozak, dok se veći dio gomila u bubrezima. Rezultat toga je spoznaja da u malim dozama ima nadražajni efekt, a velike doze vode do toksičnih pojava (Jelli, 1990).

2.3.3. MCD-peptid

MCD peptid je frakcija koja pokazuje protuupalno djelovanje, a sastoji se od 22 aminokiseline i u pčelinjem otrovu ga ima vrlo malo. Testiran je njegov utjecaj na propusnost krvnih žila, što je mjerilo za procjenu upale. Ubrizgan potkožno sprječava pojavu propusnosti krvnih žila koju izazivaju upalni agensi, međutim, MCD peptid se sporo apsorbira pa je efikasan samo ako se ubrizga jedan sat prije djelovanja upalnih tvari. Ustanovilo se da MCD peptid umanjuje upalne promjene, odnosno ukazuje na moguću upotrebu u smanjenju tegoba uzrokovanih reumatskom upalom zglobova kod čovjeka (Jelli, 1990).

2.3.4. Proteazni inhibitori

Smatra se da je uloga proteaznih inhibitora u pčelinjem otrovu sačuvati aktivnost bjelančevinasto-peptidnog kompleksa otrova, sprječavajući djelovanje proteolitičkih enzima u izlučevinama žlijezde pčele, kao i u krvi i tkivu ubodenog organizma. U pčelinjem otrovu postoje dva tipa inhibitora (1 i 2) koji djeluju protuupalno. Protuupalna aktivnost inhibitora rezultat je sprečavanje aktivnosti

proteaza. Rezultat toga je sprječavanje kretanja nekih leukocita, zatim povećavanje proteazno-inhibitorne aktivnosti seruma te smanjene proteolitičke aktivnosti (Jelli, 1990). Pčelinji otrov nema proteolitičkih enzima. Međutim, biološka uloga prirodnih inhibitora sastoji se od regulacije i balansiranja aktivnosti odgovarajućih enzima u biološkim materijalima. Prema tome biološka uloga inhibitora proteaze u pčelinjem otrovu je vjerojatno da štiti agresivnu (hijaluronidaza) i toksičnu komponentu otrova (fosfolipaza, melitin i apamin) protiv proteaza ubodenog čovjeka ili životinje (Shkenderov, 1973).

2.3.5. Adolapin

Adolapin ima izražen utjecaj na smirenje bolova što nije poznato kod ostalih komponenti otrova, a osim toga djeluje protuupalno, ima veliki terapeutski indeks, slaba anafilaktogenost (preosjetljivost organizma na injektivno ubrizgane bjelančevine). Adolapin je testiran pomoću "tail flick" metode koja je omogućila demonstraciju njegovog analgetskog djelovanja. Djelomična inhibicija analgetičkog učinka adolapina induciranog aloksonom pokazala je sudjelovanje središnjeg mehanizma djelovanja. Slično drugim nesteroidnim analgeticima, adolapin je pokazao antipiretski učinak (40 μg/kg) izazvao je inhibiciju srednjeg porasta temperature oko 62% (Koburova i sur., 1985).

2.4. Kontrola kvalitete pčelinjeg otrova

Prvi dokument o standardizaciji kvalitete pčelinjeg otrova izradila je Bugarska, a uključuje 14 pokazatelja koji se utvrđuju organoleptički, fizikalnim, kemijskim i biokemijskim metodama (Jelli, 1990):

1. boja – svijetlosiva do siva, a utjecaj imaju sunčeva svjetlost, vlažnost, primjese, temperatura i vrijeme koje se čuva,
2. vlažnost – ne veća od 2%,
3. primjese – ne više od 0,8%,
4. šećer – maksimalno 6,5% fruktoze.

Enzimi hijalurodinaza i fosfolipaza su termolabilni i nepostojani ako se čuvaju u neodgovarajućim uvjetima pa je prema tome njihova aktivnost ujedno i indikator kvalitete pčelinjeg otrova. Aktivnost melitina je važna za farmakološku aktivnost, a određuje se prema njegovoj sposobnosti da vrši hemolizu eritrocita. Otrov dobiven

pomoću elektrostimulacije ne sadrži šećere za razliku od onog koji je dobiven ekstrakcijom. Liofilizirani otrov (osušen bez tekuće faze) je lako hlapljivi, svijetlosivi do sivkastožuti prašak (slika 2). Sadrži najmanje 18 aktivnih supstanci: razne enzime, male peptide, fiziološki aktivne biogene amine, neuroprijenosnike (histamin, dopamin, noradrenalin, serotonin), aminokiseline te veću količinu mineralnih tvari (http://up-zrinski.hr/proizvodi/pcel_otrov/).



Slika 2. Osušeni pčelinji otrov

Izvor: (Balen Percela, 2017.)

Pčelinji otrov se koristi u obliku praška koji se čuva u zatamnjenim hermetički zatvorenim staklenim bočicama (slika 3) na -20°C. Količina suhe tvari kreće se između 30 i 45%.



Slika 3. Staklene bočice napunjene suhim pčelinjim otrovom

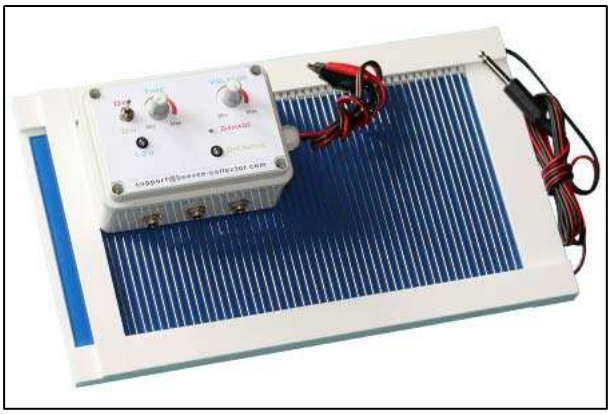
Izvor: (Balen Percela, 2017)

2.5. Skupljanje pčelinjeg otrova

Sve do 60-ih godina prošlog stoljeća proizvodnja je pčelinjeg otrova bila ograničena nedostatkom prigodnih tehnika za njegovo skupljanje. Do tada se otrov dobivao iz ekstrakata žalčanih aparata ili pažljivim odstranjivanjem otrovnog mjehura. Pčelinji se otrov dobivao i omamljivanjem pčela pomoću etera ili kloroforma. Navedene metode skupljanja otrova su bile spore i izvedive samo u laboratorijskim uvjetima, a posljedica je toga bila iznimna skupoća. Sredinom 50-ih godina prošlog stoljeća započela je primjena skupljanja otrova elektrošok metodom, tj. iritiranjem pčela slabo izmjeničnom strujom (Kezić i sur., 2014).

Značajne su promjene u skupljanju pčelinjeg otrova dogodile sredinom 60-ih godina prošlog stoljeća kada se razvila druga generacija skupljača pčelinjeg otrova. Tada je prvi put korištena tehnika izmjeničnog električnog pobuđivanja cjelokupne zajednice. S razvojem elektronike i uvođenjem tranzistora pojavila se mogućnost razvoja skupljača kod kojeg se mogla regulirati voltaža, frekvencija i struja. Glavna prednost je bila što je pčelama sačuvan žalac, a otrov se mogao skupiti u većim količinama i poboljšana mu je čistoća.

Navedena tehnika temeljila se na principu blagog elektrošoka, a uređaj se sastoji od pravokutne staklene ploče oko koje je namotana tanka žica. Kroz nju se pušta slaba istosmjerna struja (9V) s razmacima između udara tzv. pulsirajuća struja (slika 4). Bez obzira na konstrukcijsko rješenje, svi su uređaji zasnovani na principu malih strujnih udara kojima se izlažu radilice. Ploča se postavlja ispred leta košnice pa radilice prilikom ulaska ili izlaska prelaze preko nje i kada dodirnu žicu osjete blagi strujni udar i ispuste kapljicu otrova. Nakon jednog do dva sata ploča se mora maknuti s leta te se skupljene kapljice otrova stave na sušenje. Kada se otrov osuši, on se oštrim skalpelom ili žiletom sastruže. Radilice od kojih se na ovaj način skuplja otrov redovito prežive, ali zbog velike količine ispuštenog alarmnog feromona zajednica postaje agresivna pa se uređaj može koristiti ograničeno vrijeme i ne u blizini naselja.



Slika 4. Skupljač pčelinjeg otrova

Izvor: (https://www.beevee-collector.com/)

Početkom 90-ih razvijena je treća generacija skupljača. Uporabom integriranih krugova u uređajima za skupljanje omogućena je kontrola frekvencije, voltaže, struje, valne dužine i vremenskog intervala pa se za ubrzavanje skupljanje pčelinjeg otrova može odjednom skupljati otrov sa 40 skupljačkih okvira.

U razvojnoj je fazi i četvrta generacija skupljača pčelinjeg otrova koji će biti kontrolirani pomoću mikroprocesora. Međutim, potrebno je istaknuti da su količine otrova koje se općenito mogu skupiti izuzetno male i ne postoje skupljači ili metode koje nisu opasne za pčele. Naime, u 30 minuta skupljanja, dobar skupljač ne usmrti više od 10 pčela po zajednici tako da ovaj gubitak nije značajan za populaciju pčela i ne utječe na razvoj zajednice. Najveći proizvođač pčelinjeg otrova u SAD-u proizveo je samo 3 kg otrova u 30 godina (Kezić i sur., 2014).

Takav uređaj, odnosno skupljač uzrokuje električni šok koji omogućuje skupljanje pčelinjeg otrova od nekoliko tisuća radilica. Skupljač se može premještati iz košnice u košnicu ili paralelno spajati. Svaka zajednica ubada 5 minuta. Prosječno 20 košnica mora biti kontinuirano elektro stimulirano kako bi se dobio 1 gram otrova. Pod optimalnim uvjetima, ovu količinu otrova proizvodi 10 000 radilica (Benton i sur. 1963). Skupljanje otrova pomoću električnog skupljača potiče oslobađanje alarmnog feromona, mijenjajući komunikaciju i ponašanje radilica te njihovu skupljačku aktivnost (Johnson, 2003).

Moguće je da će se u budućnosti prikupljanje otrova elektrostimulacijom moći uspješno koristiti i kao metoda u borbi protiv bolesti. Naime, El-Saeady i sur. (2016) u svom su istraživanju otkrili da je skupljanje pčelinjeg otrova pozitivno utjecalo na higijenu pčelinje zajednice, odnosno aktivnost pčela čistačica se povećala za 22%. To znači da se skupljanje pčelinjeg otrova pozitivno odražava na otpornost zajednice

na nametnike i bolesti kao što su američka gnjiloća, vapnenasto leglo i varooza. Također, El-Saeady i sur. (2016.) navode da je povećan unos nektara, peludi i skladištenje meda tijekom pokusa što je rezultat alarmiranja ili stimuliranja pčela radilica.

Najčešće su upotrebljavani električni sakupljači modificiranog dizajna, a preporučuje se dimenzija skupljača od 650 cm^2 koji radi na 12 V te frekvenciji od 58 Hz s razmakom impulsa od 3 do 6 sekundi. Najbolji rezultati su dobiveni kada je skupljanje pčelinjeg otrova bilo provedeno svakih 14 dana tijekom jednog ili dva sata (Sanad i Mohanny, 2015).

Dosada su provedena razna istraživanja o električnim skupljačima otrova pa su tako Sanad i Mohanny (2013) prema Miau (1983), Nobreu (1990) i Malconu (1992) opisali uređaj za skupljanje pčelinjeg otrova koji sadrži elektrificiranu staklenu ploču; prilikom ubadanja pčela ne gubi žalac i ne dolazi do ugibanja zbog električnih impulsa. Primarna zavojnica je prekinuta kontaktnim prekidačem dok druga proizvodi veliki napon visokofrekventnom strujom. Struja prolazi fleksibilnim kabelom na metalnu ploču koja je pritisnuta na staklenu ploču, a uzemljenje je na vrhu staklene ploče pa se tako zatvara strujni krug i dolazi do elektrošoka kod radilica. Takav sustav je dovoljan za opskrbu strujom više od 20 ploča. Tako skupljeni pčelinji otrov se na staklenoj ploči brzo suši te se lako može ukloniti pomoću fleksibilnih oštrica.

Vrlo zanimljiv sakupljač pčelinjeg otrova konstruirao je Fakhimzadeh (1998) koji predstavlja kavez čije se strane sastoje od bakrenih žica postavljene okomito s razmakom od 3,63 mm (slika 5), kroz koje prolazi izmjenična struja i uzemljenje. Dno je pomično i ožičeno, dok je poklopac izrađen od plastične mreže (1,5 mm).



Slika 5. Skupljač pčelinjeg otrova u obliku kaveza

Izvor: (Fakhimzadeh, 1998)

Jedino mjesto gdje se pčele mogu odmoriti je pokretan štap, koji je pomoću drvenog postolja uglavljen u središte uređaja. Prije početka skupljanja otrova, potrebno je štap prekriti šećerno mednim tijestom. Pomoću komadića žice ili konca fiksiranog na vrh štapa moguće je manipulirati štapom (slika 6).



Slika 6. Pokretni štap sa šećerno mednim tijestom na kojem se nalaze radilice

Izvor: (Fakhimzadeh, 1998)

Staklene ploče prekrivene plastičnom pločom (kroz koju radilice ubadaju) se pričvršćuju na stjenke. Uređaj pokreće izmjenična struja (22, 50 Hz). Ukupno radno vrijeme uređaja je 5 minuta u intervalima od 3 i 7 s, kada je struja uključena i isključena. U svakom skupljanju se koriste dva do četiri okvira po zajednici. Prilikom testiranja uređaja korišteno je osam pčelinjih zajednica od kojih je skupljeno prosječno 0,21 g pčelinjeg otrova, tj. 0,026 g/zajednici.

Također, u svom istraživanju Sanad i sur. (2013) navodi Bahreina i sur. (2000) gdje opisuju uređaj za skupljanje otrova. Uređaj predstavlja kavez dimenzija 42 x 50 x 58 cm, dok su s unutarnje strane kaveza postavljene električne žice koje su uzastopno pod naponom i bez napona. Radilice koje dolaze u dodir s dvije susjedne žice dobivaju električni šok od 21 volti 3 sekunde. Nakon 7 sekundi, žica se napuni i spremna je za slijedeći električni udar. Ovaj ciklus od 10 sekundi traje 5 minuta, tijekom kojeg radilice ubadaju na plastični pokrov staklene ploče. Skupljeni pčelinji otrov na staklenim pločama ostruže se oštrom lancetom u laboratoriju. U 6-mjesečnom istraživanju, otrov je ekstrahiran iz 16 pčelinjih zajednica svakih 15 dana i skupljeno je 838 mg pčelinjeg otrova po pčelinjoj zajednici.

3. Materijali i metode

3.1. Područje istraživanja

Istraživanje je bilo provedeno tijekom lipnja i srpnja 2017. godine u vrijeme intenzivnog skupljanja pčelinjeg otrova na OPG-u Matijević u Daruvarskom Brestovcu. Na stacioniranom pčelinjaku nalazilo se 28 pčelinjih zajednica sive pčele (*Apis mellifera carnica* Pollman, 1879) smještenih u Langstroth-Root-ove košnice (slika 7).



Slika 7. Pčelinjak OPG-a Matijević

Izvor: (Balen Percela, 2017)

3.2. Pokusne pčelinje zajednice

Za potrebe istraživanja „Liebefeld“ je metodom prema različitoj jakosti izdvojeno 18 pčelinjih zajednica koje su bile podijeljene u dvije skupine od po devet zajednica. Svaku su skupinu činile tri slabe, zatim tri srednje jake te tri jake pčelinje zajednice (slika 8).



Slika 8. Razmještaj pčelinjih zajednica prema jakosti

Izvor: (Balen Percela, 2017)

3.3. Skupljanje pčelinjeg otrova

U istraživanju je bio korišten elektrostimulacijski skupljač otrova s istosmjernom strujom (slika 9) prema modelu pčelara Ivana Curiša.



Slika 9. Elektrostimulacijski skupljač otrova

Izvor: (Balen Percela, 2017)

Postupak skupljanja pčelinjeg otrova provodio se tijekom tri uzastopna dana i to u 9:00, 13:00 i 17:00 na tri pčelinje zajednice različite jakosti sa skupljačima postavljenim na ulazu u košnicu (leto) (slika 10) i tijekom 10:00, 14:00 i 18:00 na skupljačima postavljenim unutar košnice (satonoše) (slika 11). Ukupno su bila izvršena tri ponavljanja s razmakom od tjedan dana.



Slika 10. Skupljač pčelinjeg otrova postavljen na leto

Izvor: (*Matijević, 2017)*



Slika 11. Skupljač pčelinjeg otrova postavljen na satonoše

Izvor: (Balen Percela, 2017)

Prije svakog postavljanja uređaja, stakla na koje su radilice ubadale su bila dobro očišćena, vagana te premotana prozirnom folijom (slika 12).



Slika 12. Zamatanje stakla folijom

Izvor: (Balen Percela, 2017)

Skupljanje se pčelinjeg otrova po pčelinjoj zajednici provodilo u razdoblju od 60 min. Zatim se staklo sa skupljenim otrovom nosilo na sušenje uz što manje izlaganje sunčevim zrakama te zamijenilo s prethodno pripremljenim čistim staklom kako bi uređaj bio spreman za ponovno skupljanje na sljedećoj pčelinjoj zajednici.

Nakon što se skupljeni pčelinji otrov osušio, uslijedilo je ponovno vaganje stakala, zatim skidanje folije te njegovo struganje. Struganje se pčelinjeg otrova izvršilo pomoću žileta (slika 13) u nekontaminiranim uvjetima te potom vaganje i spremanje u tamne staklene bočice (slika 14).



Slika 13. Struganje pčelinjeg otrova

Izvor: (Matijević, 2017.)



Slika 14. Vaganje pčelinjeg otrova

Izvor: (Balen Percela, 2017.)

3.4. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podatci iz provedenih istraživanja uneseni su u računalni program Microsoft Excel u kojem su pripremljeni za statističku obradu, a statistička je obrada podataka provedena u programu SAS 9.4 (SAS, 2012). Opisni (deskriptivni) statistički podaci (srednja vrijednost, standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrijednost) dobiveni su procedurom MEANS, dok je usporedba razlika srednjih vrijednosti ispitnih skupina provedena ANOVA procedurom programskog paketa SAS (SAS, 2012) prema modelu:

$$y_{ij}=\mu+ D_i+e_{ij}$$

gdje je y_{ij} = svojstvo (masa otrova),

μ = srednja vrijednost,

D_i= fiksni utjecaj (i=snaga zajednica, položaj sakupljača, datum sakupljanja, doba dana) te

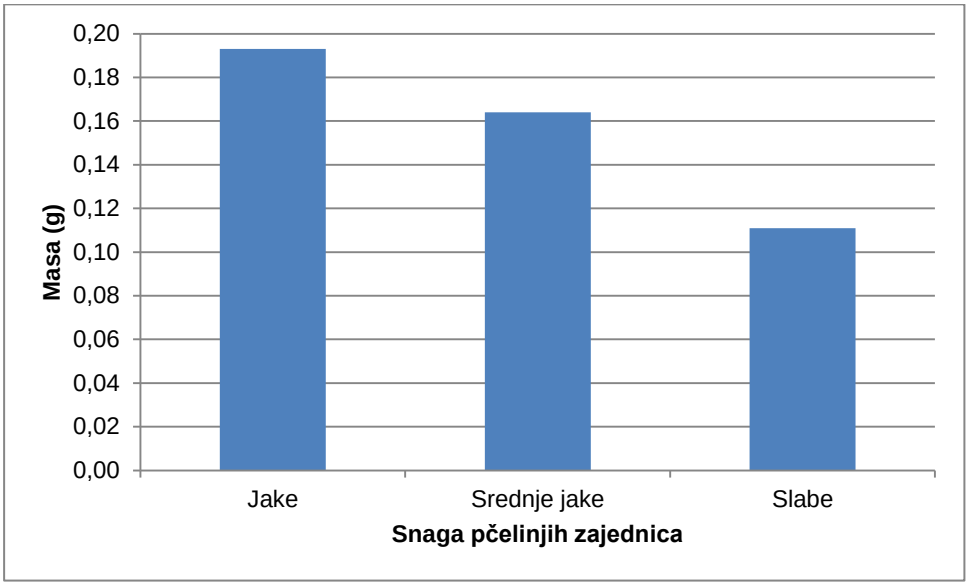
e_{ij}= neprotumačeni ostatak.

U analizi varijance korišten je Bonferroni post hoc test.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Masa pčelinjeg otrova s obzirom na snagu pčelinje zajednice

Tijekom istraživanja ukupno su bila prikupljena 162 uzorka pčelinjeg otrova, od čega su po svakoj pokusnoj skupini pčelinjih zajednica skupljena njih 54. Uspoređujući prosječne mase skupljenog pčelinjeg otrova između ispitivanih skupina pčelinjih zajednica (grafikon 1) utvrđena je statistički značajna razlika s obzirom na njihovu snagu ($F= 59,79$; $p<0,001$).



Grafikon 1. Prosječna masa pčelinjeg otrova s obzirom na snagu pčelinjih zajednica

Statistički značajna razlika utvrđena je kod skupine jakih (0,193 g) u odnosu na skupinu srednje jakih (0,164 g) i slabih (0,111 g), kao i između skupine srednje jakih i slabih pčelinjih zajednica. Nešto niže prosječne vrijednosti zabilježene su u istraživanju Rybak (2008) koji navodi prosječnu masu pčelinjeg otrova od 0,112 g s rasponom od 0,063 g kod slabih do 0,159 g kod jakih pčelinjih zajednica. U navedenom se istraživanju skupljanje pčelinjeg otrova provodilo u tri navrata i to 15. i 30. lipnja te 15. srpnja u pčelinjim zajednicama različitih jakosti u trajanju od jedan sat. Uređaj koji je bio korišten za skupljanje pčelinjeg otrova radio je na principu stvaranja električnih impulsa i bio postavljen unutar košnice, a osim električnih impulsa bio je korišten i uređaj koji je stvarao zvučne impulse. Također, se navodi da

se prosječna masa pčelinjeg otrova skupljena iz jedne pčelinje zajednice nije značajno razlikovala u narednim godinama istraživanja.

4.2. Masa pčelinjeg otrova s obzirom na položaj skupljača

Postupak skupljanja pčelinjeg otrova provodio se elektrostimulatorima postavljenim na ulazu u košnicu (leto) i na onim postavljenim unutar košnice (na satonošama okvira).



Grafikon 2. Prosječna masa pčelinjeg otrova s obzirom na položaj skupljača pčelinjeg otrova

Uspoređujući prosječnu masu pčelinjeg otrova skupljenog na satonošama okvira i na letu košnice utvrđena je statistički značajna razlika ($F= 4,56$; $p<0,03$). Iz grafikona 2. je razvidno da je utvrđena prosječno veća masa pčelinjeg otrova kod skupljača postavljenih na satonošama okvira (0,165 g) u odnosu na one koji su bili na letu košnice (0,148 g).

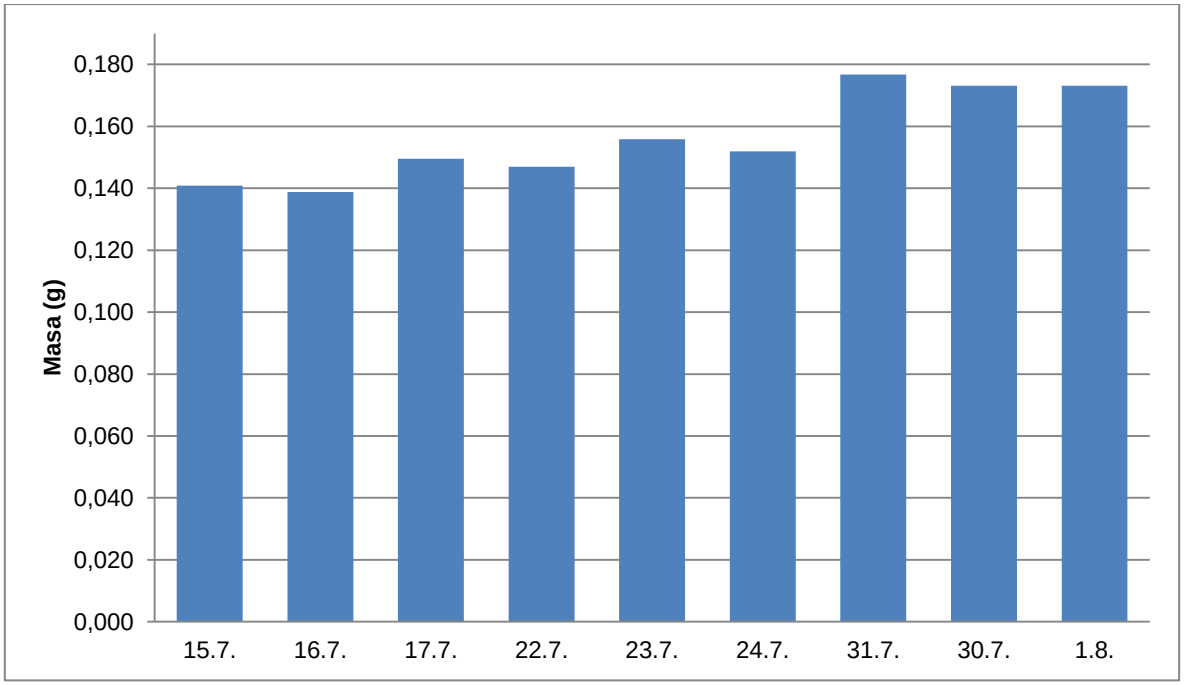
Prema istraživanju koje je provedeno u Poljskoj, Nenchev i Stoichev su utvrdili da su radilice ispuštale od 60,85 do 65,57% otrova na staklo skupljača postavljen na leto košnice (Sanad i sur., 2013). Navode kako povećano trajanje elektrostimulacije od 60 minuta na 90 minuta nije rezultiralo više prikupljenog pčelinjeg otrova.

Osim načina skupljanja, na količinu pčelinjeg otrova utječe i pasmina pčela. Naime, utvrđeno je da otrov zapadne pčele (*Apis mellifera* L) i indijske divovske pčele (*Apis dorsata* Fabricius) imaju sličnu toksičnost, međutim otrov indijske divovske pčele sadrži mnogo više alarmnih feromona (Bogdanov, 2016). Također, afrikanizirane pčele posjeduju manje otrova u otrovnom mjehuru od europskih

križanaca, odnosno talijanske i sive pčele. Naime, Funari i sur.(2001) su u Brazilu proveli istraživanje na tri skupine od po pet pčelinjih zajednica. Prvu skupinu činile su afrikanizirane pčele, drugu talijanske pčele (*A. mellifera ligustica*), a treću pčelinje zajednice sive pčele (*A. mellifera carnica*). Količina otrova u mjehuru otrovne žlijezde radilica prve skupine prosječno je iznosila 0,117 mg, druge skupine 0,139 mg te treće 0,147 mg.

4.3. Masa pčelinjeg otrova prema danima skupljanja

U ovom je istraživanju praćena i masa pčelinjeg otrova prema danima skupljanja. Stoga je na osnovu prosječnih vrijednosti mase pčelinjeg otrova u prvom razdoblju, od 15. do 17. srpnja, utvrđena najniža masa pčelinjeg otrova i ona se kretala od 0,139 g (16. srpnja) do 0,150 g (17. srpnja). Zatim se u sljedećem razdoblju, od 22. do 24. srpnja, utvrđena masa pčelinjeg otrova povećala i kretala se od 0,147 g (22. srpnja) do 0,156 g (23. srpnja), dok su u posljednjem razdoblju od 30. srpnja do 1. kolovoza utvrđene ujedno i najviše vrijednosti mase pčelinjeg otrova te su se kretale od 0,173 g, (31. srpnja i 1. kolovoza) do 0,177 g (30. srpnja). Međutim, uspoređujući prosječne vrijednosti mase pčelinjeg otrova utvrđeno je da nije bilo statistički značajne razlike (F= 1,41; p>0,19) s obzirom na dane skupljanja (grafikon 3).



Grafikon 3. Prosječna masa pčelinjeg otrova prema danima skupljanja

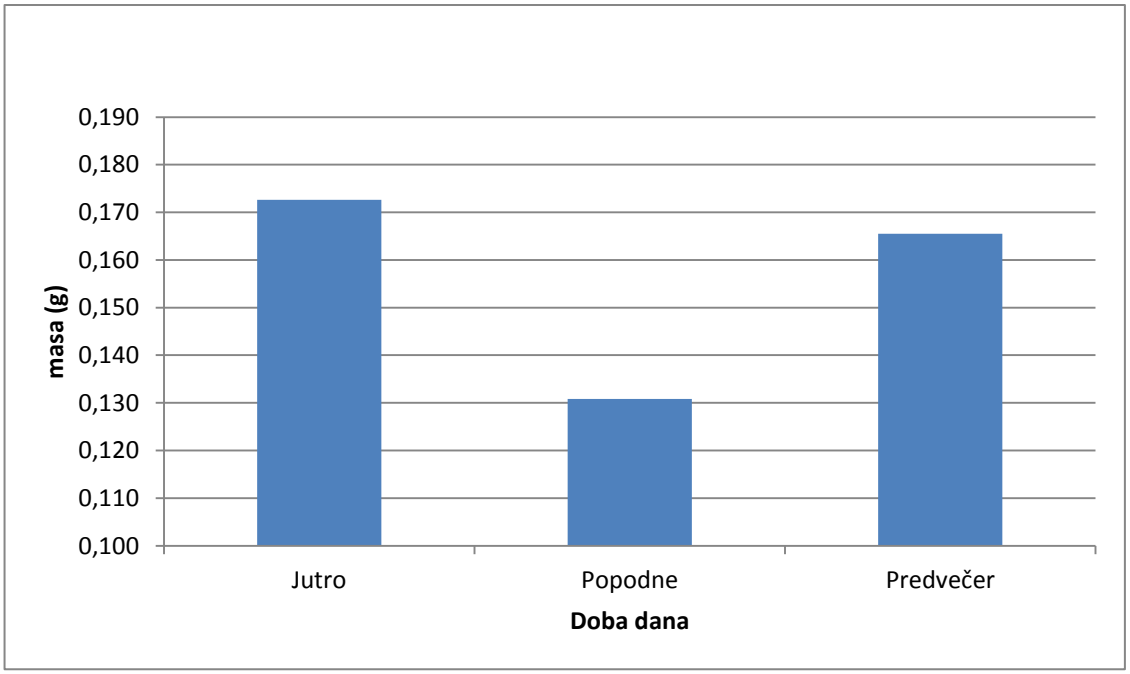
U istraživanju Omara (2017) najviša prosječna masa pčelinjeg otrova skupljena je u kolovozu, kada je utvrđeno 0,44 mg pčelinjeg otrova po pčelinjoj zajednici, zatim u srpnju 0,42 mg, a najniža prosječna masa od 0,30 mg ustanovljena je tijekom veljače. Također, Hegazi i sur. (2017) su ustanovili da iako nije bilo statistički značajne razlike u masi pčelinjeg otrova po pčelinjoj zajednici kojeg su skupljali tijekom lipnja u dvije uzastopne godine (2014. i 2015.), najveća je masa pčelinjeg otrova bila utvrđena u trećem tjednu u obje godine. Promatrajući po pčelinjoj zajednici, masa se pčelinjeg otrova kretala od 48,9±0,03 mg do 72,4 mg. Za potrebe istraživanja koristili su uređaj za skupljanje pčelinjeg otrova koji radi na principu isprekidanog impulsa električne struje pod naponom od 12V te je bio postavljen na leto košnice. Eksperiment su izvodili 10 dana svaki mjesec po tri sata dnevno. Pčelinje zajednice koje su koristili u svom istraživanju hranjene su šećernim sirupom (1:1) i peludno zamjenicom 2 tjedna prije početka pokusa.

Uspoređujući podatke Omara (2017) i podatke prikupljene u ovom istraživanju može se zamijetiti da je masa prikupljenog pčelinjeg otrova u porastu tijekom ljetnog razdoblja, što potvrđuje i Sanad (2012) u svom istraživanju.

Naime, u istraživanju Sanada (2012) je utvrđeno da su najveće količine pčelinjeg otrova zabilježene u mjesecu kolovozu (0,185 g/dan), a najmanje zabilježen je u mjesecu ožujku (0,031 g/dan). Zaključio je i da postoje značajne razlike između tri sezone, odnosno ljetna sezona polučila je prvo mjesto dajući najveću količinu pčelinjeg otrova (0,161 g/dan), nakon čega je u jesen skupljeno 0,116 g/dan, a u proljeće je skupljena najmanja masa pčelinjeg otrova i to 0,040 g/dan.

4.4. Masa pčelinjeg otrova tijekom dana

Promatrajući masu skupljenog pčelinjeg otrova tijekom dana utvrđena je statistički značajna razlika ($F= 11,14$; $p<0,001$). Prema utvrđenim prosječnim vrijednostima u jutarnjim satima (0,173 g) masa se pčelinjeg otrova statistički značajno razlikovala od mase skupljene u popodnevnim satima (0,131 g). Također, statistički značajna razlika u masi pčelinjeg otrova utvrđena je i između predvečernjih (0,166 g) i popodnevnih sati, dok između jutarnjih i predvečernjih nije bilo statistički značajne razlike (grafikon 4).



Grafikon 4. Masa skupljenog pčelinjeg otrova tijekom dana

U istraživanju Sanad i Mohanny (2013) najviša je prosječna masa otrova ustanovljena u razdoblju od 16:00 do 18:00 i iznosila je 0,160 g, dok je najniža prosječna masa također ustanovljena u razdoblju od 13:00 do 15:00 i iznosila je 0,080 g. Nowar (2016) također navodi najveću prosječnu masu otrova skupljenu u popodnevnim, odnosno večernjim satima između 19:00 i 21:00 u količini od 0,158 g, a najnižu masu u vremenu između 15:00 i 17:00 u količini od 0,110 g. To potvrđuje i Sanad (2012) koji navodi da je najbolje razdoblje za skupljanje pčelinjeg otrova u ljeti od 16:00 do 18:00, kada je i zabilježena najveća prosječna masa pčelinjeg otrova od 0,0185 g/danu. Isto tako, gledajući učinkovitost skupljanja pčelinjeg otrova Mohannyjevim modificiranim uređajem, u svom istraživanju Sanad (2012) je zaključio da je najbolje razdoblje za skupljanje pčelinjeg otrova bilo od 16 do 18 sati u kolovozu. Nadalje, moglo bi se zaključiti da je najsigurnije vrijeme za skupljanje pčelinjeg otrova između 13:00 i 15:00 sati kada je najmanji broj uginulih radilica, kao nuspojava skupljanja pčelinjeg otrova (Sanad, 2012). Različite metode skupljanja pčelinjeg otrova uspoređene su prema količini prikupljenih otrova, njihov utjecaj na pčelinje zajednice i njihovo zimovanje, kao i na njihovu opću produktivnost (med, pelud, pčelinji vosak). Utvrđeno je da skupljanje pčelinjeg otrova nema štetnih učinaka na snagu zajednice, leglo i produktivnost. Međutim, prikupljanje otrova može nepovoljno utjecati na prezimljavanje zajednice. Taj se negativni učinak odnosi na korištenu tehniku prikupljanja (Skubida i sur., 1995).

5. Zaključak

U prvoj je radnoj hipotezi istraživanja navedeno da će se količina skupljenog otrova razlikovati s obzirom na snagu pčelinje zajednice i na vrijeme skupljanja tijekom dana. Navedena je hipoteza potvrđena jer je utvrđena statistički značajna razlika u količini skupljenog pčelinjeg otrova kod skupine jakih (0,193 g) u odnosu na skupinu srednje jakih (0,164 g) i slabih (0,111 g), kao i između skupine srednje jakih i slabih pčelinjih zajednica. Također, statistički značajna razlika je utvrđena u količini skupljenog otrova u jutarnjim (0,173 g) u odnosu na količinu skupljenu u popodnevnim satima (0,131 g), kao i u količini pčelinjeg otrova i između predvečernjih (0,166 g) i popodnevnih sati, dok između jutarnjih i predvečernjih nije bilo statistički značajne razlike.

Na osnovu provedenih analiza utvrđene su statistički značajne razlike u količini pčelinjeg otrova kod skupljača postavljenih na satonošama (0,165 g) u odnosu na leto košnice (0,148 g) te se time odbacila druga radna hipoteza, jer se pretpostavilo da se neće razlikovati količina pčelinjeg otrova skupljenog na ulazu (leto) i unutar košnice (satonošama).

6. Popis literature

Albericio F., Granier C., Labbe-Jullie C., Seagar M., Couraud F., Van Rietschotene J. (1984). Solid phase synthesis and hplc purification of the protected I-12 sequence of apamin for rapid synthesis of apamin analogues differing in the c-terminal region. Laboratoire de Biochimie, France, 40 (21): 4313-4326.

Belčić J., Katalinić J., Loc, D.,Lončarević S., Peradin S., Sulimanović. Đ., Šimić F., Tomašec I. (1985). Pčelarstvo, Zagreb

Benton A. W., Morse R. A., Stewart J. D. (1963). Venom Collection from Honey Bees. Science, 142: 228-30.

Bogdanov S. (2016). Bee Venom: Production Composition Quality. Bee Product Science.

Bovi S. T., Onari P., Santos A. A. S., Justulin A. L., Orsi O. R. (2017). Apitoxin harvest impairs hypopharyngeal gland structure in Apis mellifera honey bees. Apidologie, 48: 755–760.

Brodschneider R., Crailsheim K. (2010). Nutrition and health in honey bees. Apidologie, 41: 278-294.

El-Saeady A. A., Diab A., Shehata I. A. A., Nafea E. A., Metwaly A. A. A. (2016). Effect of bee venom collecting on the behavior of honeybee colonies. J. Plant Prot. and Path, 7 (6): 347– 351.

Erler S., Moritiz R. F. A. (2016). Pharmacophagy and pharmacophory: mechanisms of self-medication and disease prevention in the honeybee colony (*Apis mellifera*). Apidologie, 47: 389–411.

Fakhimzadeh K. (1998). Improved device for venom extraction. Bee World, 79: 52-56

Ferreira R. S., Almeida Jr. R. A. M. B., Barraviera S. R. C. S., Barraviera B. (2012). Historical perspective and human consequences of africanized bee stings in the Americas. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 15: 97–108.

Funari S. R. C., Zeidler P. R., Rocho H. C., Sforcin J. M. (2001). Venom Production by Africanized honeybees (*Apis mellifera*) and Africanized, European hybrids. Journal of venomous Animals and Toxins, 7 (2): 190-198.

Gajski G. (2012). Učinci pčelinjeg otrova i melitina na stanični odgovor tumorskih i ne-tumorskih stanica *in vitro*.Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet, biološki odsjek.

Han S., Lee K., Park K., Pak S. (2013). Antimicrobial activity of honey bee venom against select infectious fish pathogens. N. Am. J. Aquacult, 75: 445–448.

Hegazi G .A., Abd Allah F. M., Saleh A. A., Abdou A. M., Fouad E. A. (2017). Antibacterial activity of Italian (*Apis mellifera*) bees venom. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences ISSN:0974-2115 Vol.10 Issue 3

Jašić M., Šubarić D., Glavaš Dadov M., Mutapčić L., Horvat G., Anđelković S.(2017). Kemijski sastav, prikupljanje i primjena pčelinjeg otrova. XXXV. savetovanje pčelara 2017. Zbornik radova / Anđelković, Stojan - Novi Sad : Savez pčelarskih organizacija Vojvodine, 2017, 15-34.

Jelli R. (1990). Dobivanje i korištenje pčelinjeg otrova. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

Johnson B. R. (2003). Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. Proc. R. Soc. 270: 147–152.

Kezić N., Bubalo D., Dražić M., Barišić D., Grgić Z., Jakopović I., Krakar D., Palčić – Jakopović K., Ševar M., Tretinjak V. (2014). Konvencionalno i ekološko pčelarenje. Interna skripta. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

Koburova K. L., Michailova S. G., Shkenderov S. V. (1985). Further investigation on the antiinflammatory properties of adolapin--bee venom polypeptide. Acta Physiol Pharmacol Bulg., 11(2): 50-55.

Nowar E. E. (2016). Venom glands parameters, venom production and composition of honeybee *Apis mellifera L*. affected by substitute feeding. Middle East Journal of Agriculture Research, 5 (4): 596-603.

Omar R. E. M (2017) Effect of bee venom collection on the measurement of brood rearing activity of honey bee colony *Apis mellifera L.* Middle East Journal of Agriculture Research, 6 (2): 409-414.

Rybak M. (2008). Effect of venom collection using the method of coupled electrical and sound stimulation on honey yield in bee colonies. Journal of apicultural science, 52 (2): 91-94.

Saeed W. S. E., Khalil E. A. G. (2017). Toxic Effects and Safety of Bee Venom Protein Melittin in Mice: Search for Natural Vaccine Adjuvants. Journal of Natural Products and Resources, 3 (1): 111–114.

Sanad R. E., Mohanny K. M. (2013). The efficacy of a new modified apparatus for collecting bee venom in relation to some biological aspects of honeybee colonies. Journal of American Science, 9 (10): 177-182.

SAS Inst. Inc. 2012. The SAS System for Windows. Version 9.4. Cary. NC. SAS Institute

Shkenderov S. (1973). A protease inhibitor in bee venom. Identification, Partial Purification and some Properties. Institute for State Control of Drugs, Sofia, Bulgaria. Vol. 33, No. 3

Skubida P., Muszynska J., Rybak M., Marcinkowski J. (1995). Bee venom collection and its effect on the general output of the apiary and wintering. Research Institute of Polmology and Floriculture, Pulawy (Poland). Bee Devision

Popis korištenih poveznica:

<http://www.chm.bris.ac.u> 18.03.2018.

<http://up-zrinski.hr/proizvodi/pcel_otrov/> pristupljeno 22.03.2018.