

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235771**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422063**

(51) Int.Cl.
A01N 65/08 (2009.01)
A61K 36/49 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **29.06.2017**

(54)

Kompozycja do leczenia zgnilca złośliwego pszczół

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

02.01.2019 BUP 01/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

19.10.2020 WUP 16/20

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, Białystok, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

SŁAWOMIR BAKIER, Grabówka, PL
WALERIJ ISIDOROW, Hajnówka, PL

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Paweł Miniuk

PL 235771 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja do leczenia zgnilca złośliwego pszczół, wywołanego przez przetrwalnikujące bakterie *Paenibacillus larvae*.

Zgnilec złośliwy amerykański, AFB jest chorobą wywołaną przez bakterie Gram-dodatnie *Paenibacillus larvae*, które wytwarzają stosunkowo trwałe przetrwalniki w postaci endospor. Należą one do grupy bakterii tlenowych (aerobowych) zdolnych do rozwoju także w warunkach beztlenowych (względnie beztlenowce). *Paenibacillus larvae* porażają i zabijają wyłącznie larwy, natomiast dorosłe pszczoły nie chorują na zgnilec. Pełnią natomiast rolę przenośników endospor. Zakażenie larwy następuje drogą żywieniową w wyniku zużycia pokarmu zanieczyszczonego sporami. Rozwój choroby i śmierć może być spowodowany wniknięciem w organizm larwy już tylko 35 zarodników bakterii, a do zakażenia najmłodszych larw wystarczy zaledwie 10 sporów. Oznacza to, że zgnilec amerykański jest jedną z najbardziej zakaźnych (inwazyjnych) chorób zakaźnych znanych człowiekowi. Inną szczególną cechą jest unikalna żywotność endospor: w warunkach otoczenia mogą pozostać aktywne przez ponad 35 lat, a temperatura 100°C, zabija je dopiero po 5 dniach. Siedliskiem infekcji są szczątki zmarłych z zgnilca larw, z których każda zawiera wiele milionów endospor. Pszczoły robotnice zajmujące się czyszczeniem komórek plastra z resztek zamartej larwy nieuchronnie zarażają się endosporami, roznosząc je w ulu i zanieczyszczając zapasy miodu oraz pierzgi. Dlatego też, w badaniach laboratoryjnego diagnozowania możliwości rozwoju infekcji w rodzinie pszczelej określa się liczby spor *P. larvae* w 1 gramie miodu (liczba ta jest czasem bardzo duża – aż do 15 tysięcy).

W Polsce AFB jest chorobą podlegającą obowiązkowi zwalczania z urzędu. O skali potencjalnego zagrożenia świadczą wyniki względnie niedawno przeprowadzonych na terenie całego kraju 5-letnich badań epidemiologicznych (Skubida i in., 2014). Stwierdzono znaczne rozprzestrzenienie bakterii *P. larvae*, które zostały wykryte w 38% spośród 4090 przebadanych pasiek. Najgorszą sytuację stwierdzono w województwach małopolskim i warmińsko-mazurskim: odpowiednio 71 i 58% zakażonych pasiek, gdyż w pozostałych województwach ten wskaźnik wynosił od 25 do 48%.

Z powodu wyjątkowo silnej ekspansji epidemiologicznej zgnilca złośliwego, w wielu krajach obowiązuje zasada niszczenia zakażonych rodzin pszczelich poprzez wysiarkowanie i spalanie zabitych pszczół wraz z zawartością ula i towarzyszącym sprzętem, lub po zabiciu i spaleniu pszczół konieczne jest termiczne odkażenie uli i sprzętu za pomocą płomienia (Buczek, 2011). W Polsce podejście do problemu nie jest tak radykalne i oprócz zniszczenia chorych rodzin zezwala się na ich leczenie, które powinien nadzorować lekarz weterynarii. W zasadzie do leczenia może być zastosowany tylko jeden zabieg hodowlano-sanitarny: przesiedlanie (pojedyncze, podwójne lub uproszczone według prof. Lipińskiego) chorych rodzin pszczelich. Obowiązkowe jest również zniszczenie wszystkich starych plastrów i zainfekowanych urządzeń (współczesne podejście patrz „Pszczelarstwo”, Nr. 5, 2011). Ta metoda daje wynik pozytywny w leczeniu zakażonych rodzin pszczelich, ale nie gwarantuje całkowitego wyleczenia w fazie klinicznej choroby.

Przez długi okres czasu w celu leczenia chorych rodzin pszczelich na zgnilec amerykański były powszechnie stosowane antybiotyki (tetracyklina, wirginiamycyna, flawomycyna, erytromycyna i inne) lub sulfonamidy. Jednakże poważnym problemem związanym z długotrwałym stosowaniem tych preparatów jest powstanie szczepów bakterii opornych na stosowane antybiotyki. Poza tym, antybiotyki zabijają mikroflorę endogenną pszczół, co niekorzystnie wpływa na ich witalność. Dodatkowym problemem jest skażenie produktów pszczelich pozostałościami leków a to przyczynia się do pogorszenia jakości wyrobów przeznaczonych do spożycia przez ludzi. W związku z tym w krajach Unii Europejskiej stosowanie antybiotyków i sulfonamidów do leczenia pszczół zostało zakazane (Rozporządzenie EEC 2377/90 i późniejszymi poprawkami).

Aktualnie nie istnieją środki farmakologiczne dopuszczone do leczenia chorych na zgnilec amerykański rodzin pszczelich, które mogłyby zastąpić zakazane do użycia antybiotyki i polisulfamidy. Tymczasem badania epidemiologiczne pokazują, że rozprzestrzenienie się bakterii *Paenibacillus larvae* występuje na terenie całej Polski i wzrasta zagrożenie wystąpienia choroby w postaci klinicznej a wręcz wystąpienia epizootii na znacznym terenie kraju. Każdego roku odnotowuje się nowe ogniska tej choroby w Polsce. Problem ma charakter globalny i dotyczy wszystkich krajów, w których hodowane są pszczoły.

Rozwiązanie tego problemu wymaga zastosowania nowych strategii do zwalczania *Paenibacillus larvae* w rodzinie pszczelej. Nowe podejścia zakładają: hodowlę linii pszczoł opornych na zgnilec, metody biologiczne (antagonistycznych bakterii lub bakteriofagów) oraz wykorzystanie naturalnych substancji antibakteryjnych.

Obecnie spośród substancji pochodzenia naturalnego przebadano olejki eteryczne z różnych roślin oraz propolis. Niestety, zastosowanie olejków eterycznych nie doprowadziło do sukcesu. Większość z nich wykazuje relatywnie słabe działanie (MIC, wartość stężeń hamujących rozwój bakterii *P. larvae* na poziomie 250–400 µg/mL), gdyż bardziej aktywne olejki (o wartości MIC mniej niż 100 µg/mL), w skład których wchodzi tymol wykazują toksyczność wobec pszczoł. Propolis jest znacznie skuteczniejszy w odniesieniu do różnego rodzaju drobnoustrojów i w wielu badaniach udokumentowano jego silne działanie na *Paenibacillus larvae* (Bilikova i in., 2013; Isidorov i in., 2017). Jednak propolis należy do drogich i bardzo poszukiwanych produktów pszczelich, na który popyt ciągle rośnie. Aktywność antybiotyczna propolisu jest związana z wysoką zawartością w nim flawonoidów i innych związków fenolowych.

Powszechnie wiadomym jest, że prekursorem roślinnym propolisu europejskiego są smoliste wydzieliny z powierzchni pączków takich drzew jak: topola czarna (*Populus nigra*), topola osika (*Populus tremula*) i brzoza omszona (*Betula pubescens*). Dlatego też w badaniach zwróciliśmy uwagę na te propolisodajne rośliny, jako surowce do otrzymania substancji przeciw *Paenibacillus larvae*. W badaniach wykorzystano ekstrakty z pączków i cienkich, młodych gałązek czterech pospolitych gatunków drzew występujących na terenie Polski: topola czarna, brzoza omszona i brzoza brodawkowata oraz topola osika. Przy czym analizowano ekstrakty uzyskiwane za pomocą rozpuszczalników o różnej polarności takich jak: heksan, eter, metanol.

Testy mikrobiologiczne przeprowadzono z zastosowaniem czterech „dzikich” i jednego referencyjnego szczepu *P. larvae*. Szczepy „dzikie” były wydzielone z obumarłych larw i próbek miodu pobranych z rodzin z objawami klinicznymi zgnilca amerykańskiego na terenie dwóch województw: lubelskiego i podkarpackiego. Skuteczności mikrobiologiczne były poprzedzane dokładną analizą składu chemicznego stosowanych ekstraktów. W wyniku wstępnej selekcji wykazano, że szczególnie aktywne są ekstrakty uzyskiwane z brzozy brodawkowatej i omszonej.

W tabeli 1 przedstawiono stężenie hamujące – MIC, uzyskanych ekstraktów w stosunku do wykorzystanych szczepów bakteryjnych.

Tab. 1. Minimalne stężenie hamujące (MIC, µg/mL) propolisu, ekstraktów roślinnych w odniesieniu do 4 „dzikich” szczepów (KB25, KB35, KB41, KB55) i jednego referencyjnego (LMG 09820) szczepu *P. larvae*

Material/ekstrakt	Szczep <i>P. larvae</i>					Publikacja danych
	KB25	KB35	KB41	KB55	LMG 09820	
Ekstrakty z młodych gałązek drzew/ Stężenie ekstraktu µg/mL						
Brzoza omszona, ekstrakt heksanowy	3,9	3,9	<1,0	<1,0	7,8	Tak
Brzoza omszona, ekstrakt eterowy	15,6	15,6	31,8	31,8	7,8	Tak
Brzoza omszona, ekstrakt metanolowy	62,5	62,5	125	125	62,5	Tak
Brzoza brodawkowata, ekstrakt heksanowy	<1,0	<1,0	<1,0	3,9	<1,0	Tak
Brzoza brodawkowata, ekstrakt eterowy	31,8	31,8	31,8	15,6	7,8	Tak
Brzoza brodawkowata, ekstrakt metanolowy	31,8	31,8	62,5	62,5	62,5	Tak
Brzoza brodawkowata ekstrakt za pomocą nadkrytycznego CO ₂	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	Nie
Brzoza omszona ekstrakt za pomocą nadkrytycznego CO ₂	<1,0	<2,5	<2,5	<3,9	<1,0	Nie

Wyniki badań pokazują, że aktywność antibakteryjna badanych ekstraktów jest najwyższa dla preparatów uzyskanych za pomocą heksanu i nadkrytycznego CO₂, który ekstrahuje związki niepolarne.

Analiza składu chemicznego wykazała, że głównymi składnikami ekstraktów heksanowych z gałązek brzozy są substancje triterpenowe, których udział wynosi od 50% do 80%. Otrzymywanie ekstraktów heksanowych jest stosunkowo kłopotliwe i dodatkowo traci się znaczne ilości rozpuszczalnika ze względu na brak możliwości oddzielenia od nasiąkniętego surowca. Co ma niebagatelny wpływ na koszty ekstrakcji oraz zanieczyszczenie środowiska. Dlatego też postanowiono ekstrakcję heksanem zastąpić ekstrakcją w nadkrytycznym ditlenku węgla.

Zastosowano parametry ekstrakcji $p = 30 \text{ MPa}$, $T = 40^\circ\text{C}$. Metoda okazała się bardzo efektywna, a skład uzyskanych ekstraktów zbliżony do ekstraktów heksanowych. Uzyskane ekstrakty wykazywały również porównywalną aktywność biologiczną (tab. 1) względem szczepów *Paenibacillus larvae*, dotyczy to zarówno ekstraktów uzyskanych za pomocą nadkrytycznego CO_2 z gałązek brzozy brodawkowatej oraz omszonej.

Istotą wynalazku jest kompozycja do zastosowania w leczeniu zgnilca złośliwego u pszczół, która zawiera ekstrakt z cienkich gałązek brzozy uzyskany za pomocą ekstrakcji w nadkrytycznym ditlenku węgla (CO_2) składający się głównie z: triterpenoidów $45 \pm 5\%$, alkanów i alkenów $17 \pm 2\%$, aldehydów alifatycznych $11 \pm 2\%$, estrów kwasów alifatycznych $8 \pm 2\%$, alkoholi alifatycznych $7 \pm 2\%$ i seskwiterpenoidów $4 \pm 2\%$; który jest zmieszany z wodą i lecytyną w proporcji masowej 10% ekstraktu i 89% wody oraz lecytyny 1%.

Do leczenia zgnilca złośliwego pszczół zastosowano kompozycję po wymieszaniu z syropem cukrowym w proporcjach 1:10 lub profilaktycznie w proporcjach 1:20.

Etapem do uzyskania leku dla pszczół było przygotowanie na bazie uzyskanych ekstraktów za pomocą nadkrytycznego ditlenku węgla z gałązek brzozy (głównie brodawkowatej) preparatu wodnego, który może być wykorzystany, jako dodatek do syropu cukrowego i w tym syropie się rozpuszcza. Ze względu na fakt, że ekstrakty uzyskane z brzozy bardzo źle się rozpuszczają w wodzie zastosowano emulgator w postaci lecytyny. Dodatkowo stosując silne mieszanie uzyskano preparat w postaci emulsji wodnej ekstraktów brzozowych, które mogą być podawane profilaktycznie i/lub do leczenia zgnilca złośliwego pszczół.

Tab. 2. Skład chemiczny ekstraktów metodą SFE (CO_2 , bez modyfikatora) z młodych gałęzi dwóch gatunków brzozy brodawkowatej i brzozy omszonej

Skład grupowy ekstraktu	Brzoza omszona (<i>B. pubescens</i>)	Brzoza brodawkowata (<i>B. pendula</i>)
Seskwiterpenoidy	37,6	2,8
Fenylopropenoidy alkoholi seskwiterpenowych	3,9	-
Triterpenoidy	15,4	45,5
Flawonoidy	19,3	0,4
Aldehydy alifatyczne	3,3	11,2
Alkohole alifatyczne	2,4	7,2
Estry kwasów alifatycznych	1,8	8,3
Substancje aromatyczne	2,6	0,4
Alkany & alkeny	7,6	17,1
Inne związki	6,1	7,0
Ogółem	100,0	100,0

Tab. 3. Skład preparatu uzyskiwanego na bazie ekstraktu z brzozy

Składnik Paenipendula	Udział masowy [%]
Ekstrakt uzyskany za pomocą nadkrytycznego CO_2 z cienkich gałązek brzozy	10
Lecytyna	1
Woda	89
Ogółem	100,0

Preparat zawiera w przybliżeniu 10-cio procentowy roztwór wodny ekstraktu uzyskiwanego za pomocą nadkrytycznego dwutlenku węgla z dodatkiem lecytyny jako emulgatora. Roztwór ten może być podawany pszczołom wraz z syropem w rozcieńczeniu 1:10. Należy zaznaczyć, że preparat rozcieńczony w stężeniu 1:10 z syropem cukrowym (przygotowanym w stężeniu wody do cukru w proporcji 1:1) jest chętnie pobierany przez pszczoły i nie szkodzi produktom pszczelich. Albowiem te same substancje znajdują się w propolisie, który pszczoły wykorzystują do zabezpieczania rodziny pszczelej przed mikrobami

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja do zastosowania w leczeniu zgnilca złośliwego u pszczoł **znamienna tym**, że zawiera ekstrakt z cienkich gałązek brzozy uzyskany za pomocą ekstrakcji w nadkrytycznym ditlenku węgla (CO₂) składający się głównie z: triterpenoidów $45 \pm 5\%$, alkanów i alkenów $17 \pm 2\%$, aldehydów alifatycznych $11 \pm 2\%$, estrów kwasów alifatycznych $8 \pm 2\%$, alkoholi alifatycznych $7 \pm 2\%$ i seskwiterpenoidów $4 \pm 2\%$; który jest zmieszany z wodą i lecytyną w proporcji masowej 10% ekstraktu i 89% wody oraz lecytyny 1%.
2. Kompozycja według zastrz. 1 do zastosowania w leczeniu zgnilca złośliwego u pszczoł **znamienna tym**, że stosowana jest po wymieszaniu z syropem cukrowym w proporcjach 1:10 lub profilaktycznie w proporcjach 1:20.