

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 441003 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **441003**

(22) Data zgłoszenia: **2022.04.22**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.10.23 BUP 43/2023**

(51) MKP:

A01N 63/30 (2020.01)

A61K 35/64 (2015.01)

A01P 3/00 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A23K 50/90 (2016.01)

(71) Zgłaszający:

**UNIwersytet
MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(-y):

**ANETA PTASZYŃSKA, Świdnik, PL
IWONA KOMANIECKA, Lublin, PL
MAGDALENA KUNAT, Tywonia, PL**

(54) Tytuł:

**Preparat białkowy do zastosowania w zwalczaniu nosemozy u pszczoły miodnej
oraz sposób otrzymywania tego preparatu**

(57) Skrót opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest preparat białkowy wyizolowany z materiału biologicznego zakażonego chorobotwórczymi zarodnikami *Nosema* spp., takiego, jak martwe pszczoły padłe z powodu takiego zakażenia, znajdujący zastosowanie do zwalczania nosemozy u pszczoły miodnej, groźnej choroby prowadzącej do masowego umierania całych rodzin pszczelich. Przedmiotem zgłoszenia jest też sposób otrzymywania tego preparatu.

Preparat białkowy do zastosowania w zwalczaniu nosemozy u pszczoły miodnej oraz
sposób otrzymywania tego preparatu

Przedmiotem wynalazku jest preparat białkowy wyizolowany z materiału biologicznego zakażonego chorobotwórczymi zarodnikami *Nosema apis* i *Nosema ceranae*, takiego jak np., martwe pszczoły padłe z powodu takiego zakażenia, znajdujący zastosowanie do zwalczania nosemozy u pszczoły miodnej (*Apis mellifera*), groźnej choroby prowadzącej do masowego umierania całych rodzin pszczelich oraz sposób otrzymywania tego preparatu.

Wynalazek rozwiązuje problem techniczny w postaci uzyskania naturalnego preparatu białkowego, hamującego cykl rozwojowy zarodników *Nosema* spp. w jelitach pszczół, wskutek inicjacji przeciwciał odpornościowych skierowanych przeciwko temu grzybowi, co obok zabiegów sanitarno-hodowlanych, stanowi podstawę w zapobieganiu i zwalczaniu nosemozy, a także wzmocnieniu rodzin pszczelich.

Znane z opisów patentowych EP 3504969 oraz US 20200113920 preparaty, znajdujące zastosowanie w zwalczaniu nosemozy, nie zabezpieczają pszczół przed ich zakażeniem. W patencie US 20160287684 ujawniono metody zapobiegania różnym chorobom, czy poprawie zdrowia rodzin pszczelich, jednakże kompozycje takie nie są nakierowane na zapobieganie nosemozy. Z kolei opis patentowy WO 2017017313 dotyczy kompozycji znajdującej zastosowanie jako szczepionka w zapobieganiu chorobie drobnoustrojowej lub infekcji owadów, ale jego skuteczność w zapobieganiu nosemozy u pszczół jest niska. Inny wynalazek ujawniony w opisie patentowym US 20150328253 dotyczy preparatu opartego na otrzymany z glonów polisacharydzie siarczynowym, dedykowany jest zwalczaniu mikrosporydioz u ludzi lub zwierząt. Preparat ten wykazuje zwiększenie odporności u kręgowców, jednakże ze względu na odmienną budowę układu odpornościowego u owadów, nie jest skuteczny do zapobiegania nosemozy u pszczół.

Istnieje kilka doniesień patentowych, jak np., US OO8822426, CN 1505504, CN 101139607, EP 1416049 czy WO 153553 na temat preparatów do zastosowania w zwalczaniu i zapobieganiu nosemozy za pomocą technologii interferencji RNA. Znane z ww. opisów sposoby zapobiegania i zwalczania nosemozy u pszczoł, polegają na wyciszaniu wybranych genów *Nosema* spp. za pomocą konstruktów genetycznych lub cząsteczek kwasów nukleinowych (np. siRNAs, miRNAs and shRNAs), które są funkcjonalnie związane z białkami penetrującymi komórkę. Metody takie wiążą się z koniecznością użycia specyficznych technik otrzymywania i oczyszczania genów, a sama idea aplikowania pszczołom preparatów na bazie modyfikowanych genetycznie związków jest dyskusyjna, z uwagi na jej wpływ na jakość produktów pszczelich przeznaczonych dla ludzi i trudna do powszechnej akceptacji.

Z kolei w opisie patentowym US 20120157512 ujawniono rozwiązania oparte o metody i kompozycje transformowania roślin z wykorzystaniem polinukleotydów zdolnych do wyciszania ekspresji genów w patogenach. Takie sposoby wykorzystywania roślin transgenicznych do zmniejszania infekcji i zwiększania odporności pszczoł na nosemozę są kontrowersyjne, ze względu na możliwość przedostawania się organizmów modyfikowanych genetycznie do środowiska i produktów pszczelich przeznaczonych dla ludzi. Ponadto, na terenie Unii Europejskiej, zabronione jest stosowanie takich transformantów, a także niektórych chemioterapeutyków, znanych na przykład z opisu patentowego US 20090209499, których składnikiem aktywnym jest kwas 2-hydroksybenzoesowy, acetylosalicylowy, czy też ich sole.

Z opisu patentowego PL 231692 znany jest również preparat do zwalczania mikrosporydioz, a zwłaszcza nosemozy u pszczoł, zawierający jedną z rozproszonych homogenicznie, amidowych pochodnych protoporfiryny. Z uwagi na fakt, iż miód oraz inne produkty pszczele wykorzystywane są jako pokarm, suplementy diety, itp., preparaty przeznaczone dla pszczoł powinny bazować na dobrze poznanych, najlepiej naturalnych substancjach, bezpiecznych zarówno dla pszczoł jak i dla ludzi, łatwo degradowalnych i niepowodujących zmian genetycznych w organizmach tych owadów.

W literaturze istnieją doniesienia o stosowaniu w pszczelarstwie produktów leczniczych zawierających ekstrakty wyizolowane z substancji naturalnego pochodzenia. Do takich należą tymol i resweratrol, substancje wyekstrahowane z ziela tymianku (*Thymus* sp.), używane w walce z inną chorobą pszczoł, jaką jest

waroza. Jednakże, jak wynika z eksperymentu przeprowadzonego przez Maistrello i in., opublikowanego w czasopiśmie *Apidologie*, nr 41, 2008, 141–150; tymol i resweratrol, będące naturalnymi związkami fenolowymi, w wyższych stężeniach, wykazują toksyczność wobec organizmów pszczoł. Z kolei Bravo i in. w artykule opublikowanym na łamach *Journal of Invertebrate Pathology*, nr 149, 2017r., wykazali w badaniach *in vivo*, aktywność ekstraktu uzyskanego z liści *Cryptocarya alba* wobec mikrosporydiów *Nosema* spp., którymi zakażono pszczoły w pierwszych 8 dniach badania. Taki stosunkowo krótki czas badania nie daje pewności braku toksycznego działania ekstraktu w dłuższym czasie jego podawania pszczołom.

Znane ze stanu techniki, naturalne substancje do zwalczania chorób grzybowych, występujących w pszczelarstwie, wymagają użycia stosunkowo dużych dawek, co niekiedy wywołuje skutki uboczne dla samych pszczoł czy też wytwarzanych przez nie produktów.

Dotychczas w leczeniu nosemozy u pszczoł, stosowano antybiotyki na bazie fumagiliny. Nie niszczyły one całkowicie zarodników *Nosema* spp., co prowadziło do rozwijania się oporności grzyba na ten antybiotyk. Dodatkowo, czysta fumagilina trudno rozpuszcza się w wodzie, będącej podstawą syropów cukrowych, przez co konieczne jest stosowanie różnych dodatków chemicznych zwiększających rozpuszczalność antybiotyku. Taka praktyka grozi możliwością przenikania samej fumagiliny lub produktów jej metabolizmu do miodu. Ponadto fumagilina jest toksyczna dla pszczoł i zwiększa ich śmiertelność, a u ludzi może wywoływać neutropenię i trombocytopenię. Z tych powodów, od kilku lat w Unii Europejskiej, obowiązuje całkowity zakaz jej stosowania.

Zatem, niezbędne są dalsze badania w zakresie opracowania skutecznych i bezpiecznych preparatów zapobiegających zakażeniu pszczoł chorobami grzybowymi.

Celem wynalazku było pozyskanie naturalnego preparatu chroniącego pszczoły miodne przed groźną infekcją wywoływaną przez zarodniki *Nosema* spp., a zarazem w pełni bezpiecznego zarówno dla pszczoł jak i konsumentów produktów pszczelich.

Istotą wynalazku jest preparat białkowy znajdujący zastosowanie do zwalczania nosemozy, groźnej choroby pszczoły miodnej, wyizolowany z materiału biologicznego zakażonego mikrosporydiami *Nosema* spp, takimi jak, *Nosema apis* czy *Nosema ceranae*, korzystnie z rozcieru martwych pszczoł padłych z powodu takiego zakażenia.

Istotą wynalazku jest również sposób otrzymywania takiego preparatu białkowego.

Sposób według wynalazku polegający na wyizolowaniu białka z materiału biologicznego skażonego mikrosporydiami *Nosema* spp., charakteryzuje się tym, że zawiesinę zarodników, pozyskaną korzystnie z martwych pszczoł, tzw. osypu, zakażonych tym grzybem, wyjalawia się w autoklawie przez 15 minut w temperaturze od 121 do 126°C, w obecności 0,2 M chlorku sodowego, a następnie, po schłodzeniu do temperatury w granicach 4-6°C, odwirowuje, korzystnie przy obrotach 11000 – 13000 rpm, w ciągu 15 minut, po czym do supernatantu dodaje 0,05% wodnego roztworu azydku sodowego, w celu zapobieżenia rozwojowi niepożądanych drobnoustrojów i dializuje w workach o średnicy porów 1-2 kDa, korzystnie przez 7 dni, ciągle mieszając i zmieniając w ciągu doby wodę destylowaną, korzystnie 2-krotnie. Z tak otrzymanego dializatu wytrąca się białko przy użyciu siarczanu amonowego, korzystnie mieszając i dodając ten odczynnik stopniowo, aż do jego wysycenia na poziomie 65%, ponownie schładza do temperatury w granicach 4-6°C, kondycjonuje przez 1 dobę, odwirowuje, korzystnie przy obrotach 14000 - 16000 rpm, a zebrany osad zawiesza w jałowym, 0,1M buforze fosforanowym o pH=7, ekstrahuje przez dodanie równej objętości *n*-butanolu, intensywnie mieszając, potem odwirowuje, korzystnie przy zmniejszonych obrotach od 4000 do 5000 rpm, odparowuje, a suchą pozostałość w postaci oczyszczonego preparatu białkowego, rozpuszcza się w jałowej wodzie i zamraża w temperaturze -20°C do późniejszego wykorzystania.

Wynalazek i skuteczność jego działania przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

Przykład 1. Sposób przygotowania preparatu białkowego według wynalazku.

Przygotowano zawiesinę z martwych pszczoł zakażonych mieszkanką zarodników *Nosema apis* i *Nosema ceranae*, przez roztarcie 50 osobników w 100 ml wody destylowanej. Po dodaniu chlorku sodowego do stężenia końcowego 0,2M, zawiesinę poddano jednokrotnemu autoklawowaniu przez 15 min., w temperaturze 126°C, a następnie schłodzono w łaźni lodowej utrzymującej temperaturę w granicach 4 - 6°C i po odwirowaniu stałych pozostałości z prędkością 13000 rpm, w ciągu 15 min. do uzyskanego supernatantu dodano 0,05% wodny roztwór azydku sodowego. Następnie roztwór dializowano w workach o średnicy porów 1-2 kDa,

ciągle mieszając. W trakcie 7 dniowej dializy zmieniano wodę destylowaną 2-krotnie w ciągu doby. Z tak uzyskanego dializatu wytrącano białko przy użyciu siarczanu amonowego, dodając ten odczynnik stopniowo porcjami, przy ciągłym mieszaniu, aż do wysycenia na poziomie 65%. Mieszaninę pozostawiono na 1 dobę w łaźni utrzymującej temp. w granicach 4 - 6°C, na mieszadle magnetycznym. Wytrącone białka odwirowywano z prędkością obrotów od 14000 do 16000 rpm, w ciągu 20 min.. Osad zawierający białka zebrano i zawieszono w jałowym, 0,1M buforze PBS (Sigma) o pH=7, a następnie ekstrahowano dodając równą objętość *n*-butanolu, intensywnie mieszając przez ok. 1h. Po odwirowaniu, przy obrotach 5000, górną fazę zawierającą głównie *n*-butanol wraz z rozpuszczonymi w nim składnikami lipofilnymi odrzucono, natomiast fazę dolną odparowano, pozbywając się pozostałości rozpuszczalników. Suchą pozostałość zawierającą oczyszczony preparat białkowy, rozpuszczono w jałowej wodzie destylowanej i zamrożono w temp. -20°C, do późniejszego wykorzystania według wynalazku.

Przykład 2. Charakterystyka preparatu białkowego według wynalazku.

Przy użyciu aparatu Nano-drop wykazano, że preparat białkowy wg wynalazku zawierał od 10 do 150 mg białka w 1 ml.

Preparat białkowy otrzymany jak opisano w przykładzie 1., poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu wykonując dwukierunkową elektroforezę białek 2D PAGE. W tym celu próbkę preparatu zawieszono w buforze do rehydratacji (8,8 mol/L mocznika, 2%, W/V CHAPS; 70 mmol/L DTT; 0,2%, W/V, Bio-Lytes) i nałożono na 70 mm paski IPG (Bio-Rad). Po rozdzieleniu białek, w pierwszym wymiarze, paski były dwukrotnie równoważone, przez 15 min, w buforze o pH=8,8 i składzie: 6 mol/L mocznika; 20%, V/V, glicerol; 2%, W/V, SDS; 375 mmol/L Tris-HCl. Pierwszy etap wykonano w buforze równoważącym z 130 mmol/L DTT; drugi etap równoważenia zawierał 135 mmol/l jodoacetamidu (pierwszy kierunek elektroforezy). Po wykonaniu elektroforezy trycynowej białek (drugi kierunek elektroforezy), stwierdzono, że białka zawarte w preparacie według wynalazku mają charakter obojętny i zasadowy oraz masę w granicach od 5 do 16 kD, co przedstawia widmo tej analizy, zamieszczone na rysunku jako fig.1.

Z kolei wykonane techniką FT-IR ATR widmo w podczerwieni w zakresie 400 cm⁻¹ to 4000 cm⁻¹, przedstawione jako fig.2, potwierdza, że w preparacie zdecydowanie przeważają sygnały pochodzące od białek. Intensywny, szeroki sygnał w zakresie 3000 – 3500 cm⁻¹ to absorpcja wywołana drganiami rozciągającymi grup N-H (amid B) i O-H pochodzącymi głównie od zaadsorbowanej wody, zaś sygnały

2950 cm^{-1} i 2830 cm^{-1} to drgania rozciągające charakterystyczne dla grup C-H, pochodzących odpowiednio od CH_3 i CH_2 . Pasma przynależące do drgań zginających amidu I oraz amidu II, pochodzące od aminokwasów, zostały zaobserwowane odpowiednio przy 1650 cm^{-1} i 1540 cm^{-1} , co odpowiada zarazem białkom i zaadsorbowanej wodzie (grupy absorbujące w tym zakresie to: C=O, C-N, N-H, H-O-H). Pasma absorpcji pochodzące od jonu karboksylanowego (-C(=O)-O-) jest obserwowane przy ok. 1400 cm^{-1} , natomiast szerokie pasmo absorpcji w zakresie 950 – 1200 cm^{-1} , z maksimum przy około 1100 cm^{-1} , pochodzi od drgań rozciągających grup C-O-C w cukrach oraz od drgań zginających grup C-O-H, obecnych zarówno w aminokwasach jak i w cukrach. Brak wyraźnych sygnałów absorpcji w zakresie 820 – 930 cm^{-1} , charakterystycznych dla cukrów, wskazuje, że w preparacie mogą znajdować się jedynie niewielkie ilości sacharydów. Pozostałe dwa pasma absorpcji przy ok. 614 cm^{-1} i 536 cm^{-1} odpowiadają pasmom amidu V i amidu VI.

Z kolei, przy użyciu techniki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS), analizowano obecność składników cukrowych i lipidowych w preparacie według standardowych procedur. Analiza widm masowych i porównanie czasów retencji poszczególnych związków z wzorcami, pozwoliła na identyfikację trzech pentoz: rybozy, arabinozy i ksylozy; dwóch 6-deoksyheksoz: ramnozy i fukozy; trzech heksoz: mannozy, glukozy i galaktozy; dwóch heksozamin: glukozaminy i galaktozaminy oraz jednej heptozy. Każdy z tych związków występował w ilości mniejszej niż 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ preparatu. Ponadto, stwierdzono śladowe ilości kwasu palmitynowego i oleinowego. Zidentyfikowane składniki preparatu według wynalazku przedstawiono w tabeli I.

Przykład 4. Działanie preparatu białkowego według wynalazku na zwalczanie nosemozy.

Z uwagi na fakt, iż do zarażenia nosemozą dochodzi w trakcie pobierania przez pszczoły pokarmu, nektaru, pyłku, wody czy też zapasów miodu i pierzgi, preparat otrzymany według wynalazku, podawano z pokarmem. Pszczoły umieszczone po 40 osobników w 18 standardowych klatkach, poddawano obserwacji w ciągu 15 dni. Rozmrożony do temperatury otoczenia preparat, podawano w początkowej fazie pszczolom zdrowym, a następnie sztucznie zakażonym *Nosema apis* i *Nosema ceranae*. Pszczoły dokarmiano tworząc następujące grupy badawcze:

1. Kontrola - 3 klatki z zakażonymi pszczołami, dokarmianymi przez cały czas eksperymentu tylko czystym pokarmem;
 2. Grupa 1a - 3 klatki, w których zdrowe pszczoły dokarmiano przez 6 dni pokarmem z dodatkiem 1 ml preparatu według wynalazku, zawierającym białko w ilości 150 mg/ml, dodanym do 99 ml syropu cukrowo-wodnego otrzymanego przez wymieszanie 50 g cukru i 50 ml przegotowanej wody. Następnie pszczoły zakażano zarodnikami *Nosema* spp. i do końca eksperymentu dokarmiano syropem cukrowo-wodnym z preparatem jak wyżej.
 3. Grupa 1b - 3 klatki, w których zdrowe pszczoły dokarmiano przez 6 dni pokarmem z dodatkiem 10ml preparatu według wynalazku, zawierającym białko w ilości 100 mg/ml, dodanym do 90 ml syropu cukrowo-wodnego otrzymanego przez wymieszanie 45 g cukru i 45 ml przegotowanej wody. Następnie pszczoły zakażano zarodnikami *Nosema* spp. i do końca eksperymentu dokarmiano syropem cukrowo-wodnym z preparatem jak wyżej.
 4. Grupa 1c - 3 klatki, w których zdrowe pszczoły dokarmiano przez 6 dni pokarmem z dodatkiem 30 ml preparatu według wynalazku, zawierającym białko w ilości 50 mg/ml, dodanym do 70 ml syropu cukru inwertowanego. Następnie pszczoły zakażano zarodnikami *Nosema* spp. i do końca eksperymentu dokarmiano syropu cukru inwertowanego z preparatem jak wyżej.
 5. Grupa 1d - 3 klatki, w których zdrowe pszczoły dokarmiano przez 6 dni pokarmem z dodatkiem 50 ml preparatu według wynalazku, zawierającym białko w ilości 20 mg/ml, dodanym do 50 mg ciasta dla pszczół. Następnie pszczoły zakażano zarodnikami *Nosema* spp. i do końca eksperymentu dokarmiano ciastem dla pszczół z preparatem jak wyżej.
 6. Grupa 1e - 3 klatki, w których zdrowe pszczoły dokarmiano przez 6 dni pokarmem z dodatkiem 70ml preparatu według wynalazku, zawierającym białko w ilości 10 mg/ml, dodanym do 50 mg ciasta. Następnie pszczoły zakażano zarodnikami *Nosema* spp. i do końca eksperymentu dokarmiano ciastem z preparatem jak wyżej.
- W końcowej fazie, z każdej grupy pszczół poddawanych eksperymentom, wykonywano standardowe rozciery do sporządzenia preparatów mikroskopowych.

Obecne w preparatach zarodniki *Nosema* sp. liczono w komorze Bürkera obserwowanej w mikroskopie optycznym Olympus BX61 i porównywano z preparatem sporządzonym z rozciuru z pszczoł zakażonych z grupy kontrolnej.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów, przedstawione na rysunku jako fig. 3 oraz w tabeli 2, wskazują znacznie zmniejszoną ilość zarodników *Nosema* spp. pozostałych w organizmach zakażonych pszczoł, którym na wstępie podawano preparat według wynalazku, najpierw jako szczepionkę, a potem już jako lek pszczołom sztucznie zakażanym. Podczas gdy w grupie pszczoł kontrolnych, zakażenie rozwinęło się do poziomu 1230000 zarodników *Nosema* spp./pszczołę, to w grupie pszczoł którym podawano preparat, liczba zarodników zmalała do granic do 100500 zarodników/pszczołę. Wyniki jednoznacznie wskazują na dużą skuteczność preparatu według wynalazku. Wykazano, że otrzymany sposobem według wynalazku, innowacyjny preparat białkowy, w sposób znaczący zabezpiecza pszczoły miodne przed zakażeniem mikrosporydiami *Nosema* spp, co dowiedziono zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i w warunkach naturalnych, na rodzinach pszczelich w pasiece.

Przykład 4. Badanie toksyczności preparatu białkowego według wynalazku na organizmy pszczoł.

Preparat białkowy, rozmrożony do temperatury otoczenia, podawano zdrowym pszczołom, umieszczonym po 40 osobników w 18 standardowych klatkach i poddano obserwacji w ciągu 15 dni. Grupy badawcze to:

1. Kontrola - 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez cały czas eksperymentu tylko czystym pokarmem;
2. Grupa 2a – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez cały czas eksperymentu pokarmem z dodatkiem 1 ml preparatu według wynalazku, zawierającym białko w ilości 150 mg/ml, dodanego do 99 ml cukrowo-wodnego otrzymanego przez wymieszanie 50 g cukru i 50 ml przegotowanej wody.
3. Grupa 2b – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez cały czas eksperymentu pokarmem z dodatkiem 10 ml preparatu przygotowanego wg. wynalazku, zawierającym białko w ilości 100 mg/ml, dodanego do 90 ml cukrowo-wodnego otrzymanego przez wymieszanie 45 g cukru i 45 ml przegotowanej wody.

4. Grupa 2c – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez cały czas eksperymentu pokarmem z dodatkiem 30 ml preparatu przygotowanego wg. wynalazku, zawierającym białko w ilości 50 mg/ml, dodanego do 70 ml pokarmu dla pszczół – inwertowanego syropu.
5. Grupa 3d – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez cały czas eksperymentu pokarmem z dodatkiem 50 ml preparatu przygotowanego wg. wynalazku, zawierającym białko w ilości 20 mg/ml, dodanego do 50 mg ciasta dla pszczół.
6. Grupa 4e – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez cały czas eksperymentu pokarmem z dodatkiem 70 ml preparatu przygotowanych wg. wynalazku, zawierający białko w ilości 10 mg/ml, dodanego do 30 ml syropu cukrowo-wodnego otrzymanego przez wymieszanie 30 g cukru i 20 ml przegotowanej wody.

Po 15 dniach porównano liczbę żywych pszczół w poszczególnych klatkach z kontrolą. Liczba żywych pszczół w grupach badawczych dokarmianych preparatem według wynalazku, była porównywalna z liczbą żywych pszczół z grupy kontrolnej, co przedstawiono w tabeli 3.

Mając na względzie naturalną umieralność pszczół, należy stwierdzić, iż preparat białkowy według wynalazku to substancja nietoksyczna i w pełni bezpieczna jako dodatek do pszczelich pokarmów.

Zastrzeżenia patentowe

1. Preparat białkowy wyizolowany z materiału biologicznego, zakażonego mikrosporydiami *Nosema* spp, do zastosowania w zwalczania nosemozy pszczoły miodnej.
2. Preparat według zastrz. 1, znamienny tym, że wyizolowany jest z rozcier martwych pszczoł, padłych z powodu zakażenia *Nosema* spp., takimi jak np., *Nosema apis* i *Nosema ceranae*.
3. Sposób polegający na wyizolowaniu białka z materiału biologicznego skażonego mikrosporydiami *Nosema* sp. znamienny tym, że zawiesinę zarodników *Nosema* spp. wyjławia się w autoklawie przez 15 min w obecności 0,2 M chlorku sodowego, a następnie, po schłodzeniu do temperatury w granicach 4-6°C, odwirowuje, po czym do supernatantu, dodaje się 0,05% wodnego roztworu azydku sodowego, dializuje w workach o średnicy porów 1-2 kDa, a następnie, z tak otrzymanego dializatu, wytrąca się białko przy użyciu siarczanu amonowego, ciągle mieszając, aż do jego wysycenia, ponownie schładza do temperatury w granicach 4-6°C i kondycjonuje przez 1 dobę, po czym odwirowuje, a zebrany osad zawiesza w jałowym, 0,1 M buforze fosforanowym o pH=7 i ekstrahuje przez dodanie równej objętości *n*-butanolu, intensywnie mieszając, potem odwirowuje i odparowuje, zaś suchą pozostałość, w postaci oczyszczonego preparatu białkowego, rozpuszcza się w jałowej wodzie i zamraża w temperaturze -20°C do późniejszego wykorzystania.
4. Sposób według zastrzeżenia 3 znamienny tym, że jako materiał biologiczny zakażony mikrosporydiami *Nosema* spp. stosuje się rozcier z martwych pszczoł tzw. osypu, zakażonych tym grzybem.
5. Sposób według zastrzeżenia 3 znamienny tym, że zawiesinę zarodników pozyskanych z materiału biologicznego, skażonego mikrosporydiami *Nosema* spp., wyjławia się w granicach temperatur autoklawu od 121 do 126°C.

6. Sposób według zastrzeżenia 3 znamienny tym, że odwirowanie preparatu przed dializą odbywa się przy obrotach od 11000 do 13000 rpm, w ciągu 15 minut.
7. Sposób według zastrzeżenia 3 znamienny tym, że supernatant dializuje się przez 7 dni, ciągle mieszając i zmieniając 2-krotnie w ciągu doby wodę destylowaną.
8. Sposób według zastrzeżenia 3 znamienny tym, że wytrącanie białka z dializatu następuje w trakcie mieszania, przy stopniowym dodawaniu siarczanu amonowego, aż do jego wysycenia na poziomie 65%.
9. Sposób według zastrzeżenia 3 znamienny tym, że wytrącone białko, po schłodzeniu i kondycjonowaniu, wiruje się przy obrotach od 14000 do 16000 rpm., a preparat po ekstrakcji, przy obrotach zmniejszonych do 5000 rpm.

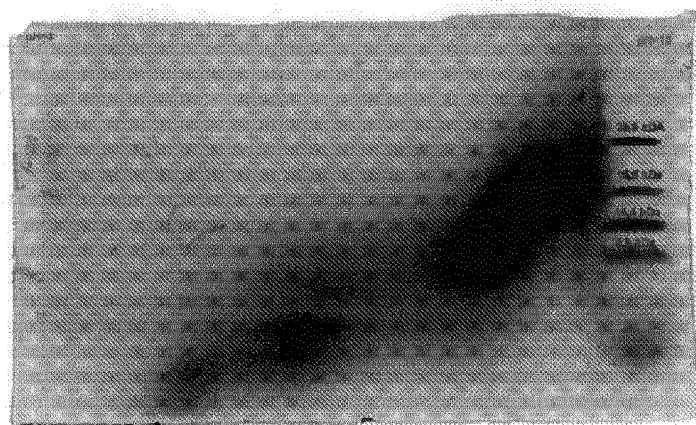


Fig. 1.

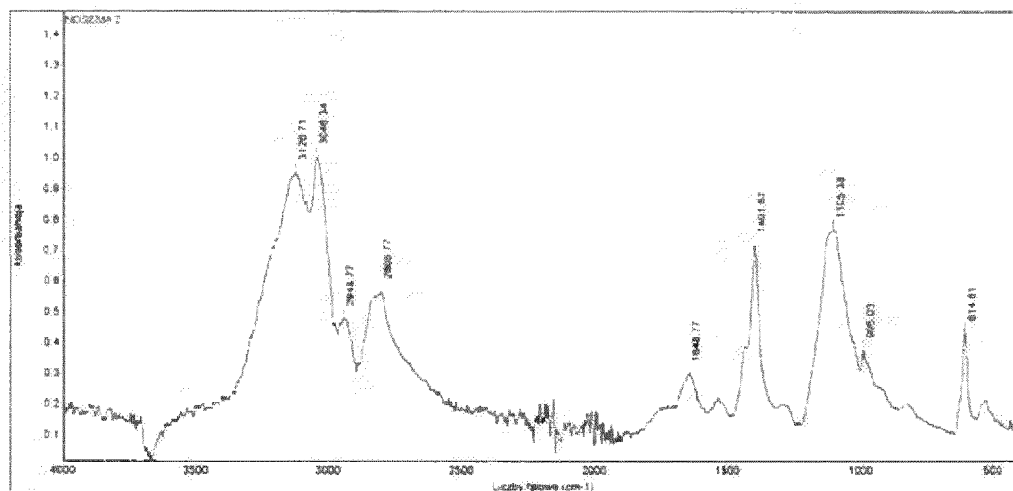


Fig. 2.

Tabela 1.

czas retencji [min.]	zidentyfikowany składnik	% udziału w preparacie wg wynalazku	ilość składnika w µg/mg
13.991	ramnoza	2,3	0,07
14.069	ryboza	1,8	0,06
14.176	fukoza	2,1	0,07
14.277	arabinoza	4,5	0,14
14.553	ksyloza	8	0,26
18.818	mannoza	12,2	0,39
18.986	glukoza	8,5	0,28
19.126	galaktoza	13,1	0,42
21.745	glukozamina	14,1	0,46
22.163	galaktozamina	18,6	0,60
22.886	heptoza	4,5	0,14
15.067	kwas palmitynowy (16:0)	ślady	ślady
18.445	kwas oleinowy (18:1)	10,3	0,25

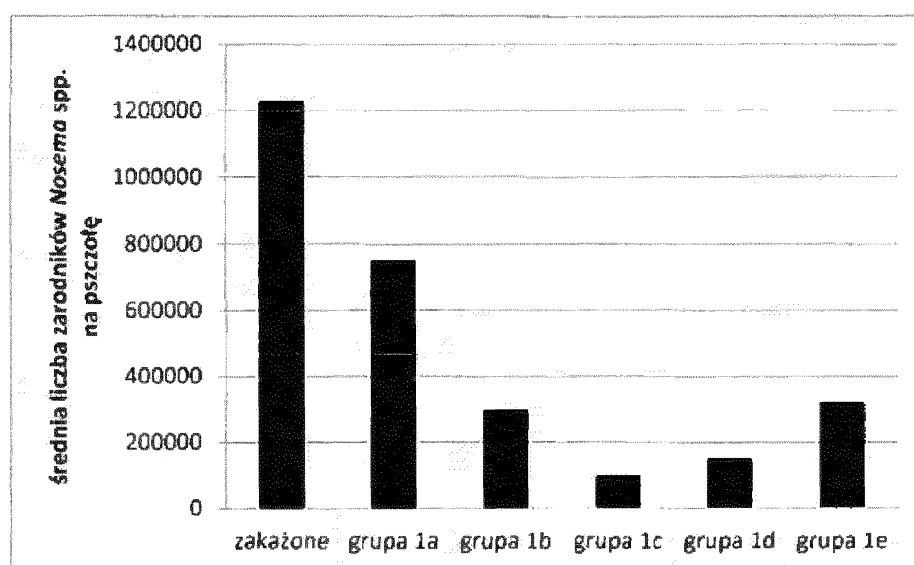


Fig.3

Tabela 2.

Grupa badawcza pszczoł zakażonych <i>Nosema</i> spp. określona w przykl. 3.	Liczba pszczoł	
	Na początku eksperymentu	Żywych po zakończeniu podawania pokarmu z preparatem białkowym
zakażone - karmione czystym pokarmem	120	38
grupa 1a	120	43
grupa 1b	120	67
grupa 1c	120	82
grupa 1d	120	98
grupa 1e	120	41

Tabela 3.

Grupa badawcza pszczoł zdrowych określona w przykl. 4.	Liczba pszczoł	
	Na początku eksperymentu	Żywych po zakończ. podawania pokarmu z preparatem białkowym
Kontrola (czysty pokarm)	120	96
grupa 2a	120	98
grupa 2b	120	96
grupa 2c	120	107
grupa 2d	120	112
grupa 2e	120	97



SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR **P.441003**

Klasyfikacja zgłoszenia: A01N 63/30, A61K 35/64, A01P 3/00, A61P 31/10, A23K 50/90

Podklasy w których prowadzono poszukiwania: A01N A61K A01P A61P A23K

Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: EPODOC WPI ESPACENET STN bazy UPRP

Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	WO2010128465 A1 (BEEOLOGICS LLC, PALDI NITZAN, GLICK EITAN [US]) 2010-11-11 skrót, przykłady, zastrzeżenia	1-9
A	US2020113920 A1 (BARNARD COLLEGE [US]) 2020-04-16 skrót, przykłady, zastrzeżenia	1-9
A	WO2016135655 A1 (TROVO Stefano [IT]) 2016-09-01 skrót, przykłady, zastrzeżenia	1-9
A	Burnham AJ, Scientific Advances in Controlling Nosema ceranae (Microsporidia) Infections in Honey Bees (Apis mellifera), Front Vet Sci. 2019 Mar 15;6:79.	1-9

☐ Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie

A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie,
E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia,
L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu,
O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób,
P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa,
T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku,
X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie,
Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy,
& – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.

Sprawozdanie wykonał/-a:

Magdalena Stepaniuk
Ekspert

Data:

23.01.2023

Podpis:

/podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o zastrz. z dnia 22.04.2022r.