

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242259 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433993**

(22) Data zgłoszenia: **2020.05.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.11.22 BUP 34/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.02.06 WUP 06/2023**

(51) MKP:

A61K 36/07 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, Białystok, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

SŁAWOMIR BAKIER, Grabówka, PL

KRYSTYNA POHORECKA, Puławy, PL

IZABELA ŚWIĘCICKA, Dzikie Kolonia, PL

MAREK WOŁKOWYCKI, Sacharewo, PL

ANNA WOŁKOWYCKA-DRUŻBA, Hajnówka, PL

WALERIJ ISIDOROW, Białystok, PL

MARCIN STOCKI, Michałowo, PL

EWA ZAPORA, Sobolewo, PL

(74) Pełnomocnik:

Magdalena Rutkowska-Sowa, Białystok, PL

(54) Tytuł:

**Kompozycja oraz sposób otrzymywania kompozycji do zastosowania w leczeniu zgnilca
złośliwego pszczoł**

PL 242259 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja oraz sposób otrzymywania kompozycji zawierającej suchy ekstrakt metanolowy w postaci proszku z owocników grzyba poliporoidalnego złotoporka niemiłego *Tyromyces fissilis* do zastosowania w leczeniu zgnilca złośliwego pszczoł, choroby czerwia pszczoły miodnej *Apis mellifera*.

Zgnilec złośliwy (American Foulbrood AFB) jest jedną z najgroźniejszych chorób pszczoł na świecie. Wywołują go bakterie Gram dodatnie *Paenibacillus larvae*, które wytwarzają przetrwalniki w postaci endospor o wyjątkowej odporności. Należą one do grupy bakterii tlenowych (aerobowych), niemniej są również w stanie rozwijać się w warunkach beztlenowych (względne beztlenowce). *Paenibacillus larvae* zarażają i zabijają larwy i poczwarki (czerw pszczeli), natomiast dorosłe pszczoły są na nie odporne. Pszczoły pełnią rolę przenośników endospor, które podają wraz z pokarmem larwom. Rozwój choroby i śmierć może być spowodowany wniknięciem w organizm larwy już tylko trzydziestu pięciu zarodników bakterii, a do zakażenia najmłodszych larw wystarczy zaledwie dziesięć spor. W efekcie tego zgnilec złośliwy jest zaliczany do jednej z najbardziej zakaźnych chorób znanych człowiekowi. Endospory bakterii *P. larvae* wykazują wręcz unikalną żywotność. W warunkach otoczenia pozostają aktywne przez ponad 35 lat, a temperatura 100°C, zabija je dopiero po 5 dobach. Siedliskiem infekcji są szczątki zmarłych na zgnilec larw, z których każda zawiera wiele milionów endospor. Pszczoły robotnice zajmujące się czyszczeniem komórek plastra z resztek zmarłych larw roznoszą endospory po ulu i zanieczyszczają nimi pokarm – miód i pierzgę. Do diagnozowania możliwości wystąpienia zgnilca w rodzinie pszczelej stosowany jest laboratoryjny pomiar ilości spor *P. larvae* w 1 g miodu. Liczba ta może być stosunkowo wysoka i wynosić nawet 15000 spor w 1 g. Przetrwalniki stanowią potencjalne źródło zakażenia, które ujawnia się szczególnie w niesprzyjających warunkach bytowania pszczoł, kiedy osłabione larwy zaczynają zamierać. Nasilenie wystąpienia choroby występuje w okresie letnim, zwykle w drugiej połowie lata.

W Polsce zgnilec złośliwy pszczoł jest chorobą zwalczaną z urzędu. O skali potencjalnego zagrożenia świadczą wyniki 5-letnich badań epidemiologicznych (Skubida i in., 2014), w których stwierdzono znaczne rozprzestrzenienie bakterii *P. larvae*, w 38% pasiek spośród 4090 przebadanych. Najgorszą sytuację stwierdzono w województwach małopolskim i warmińsko-mazurskim: odpowiednio 71 i 58% zakażonych pasiek, w pozostałych województwach ten wskaźnik wynosił od 25 do 48%. Powyższe wyniki badań potwierdzają dane Głównego Inspektora Weterynarii <https://www.wetgiw.gov.pl/publikacje/biuletyn-stan-chorob-zakaznych-zwierzat>. Z roku na rok daje się zauważyć systematyczny wzrost stwierdzonych ognisk zgnilca. I tak w roku 2017 było ich 137, w roku 2018–170, a w 2019 już 260 (GIW). Znamienne jest, że w roku 2020 pierwsze cztery ogniska zgnilca stwierdzono już w marcu (GIW). Oznacza to, że bakterie *P. larvae* były obecne w pokarmie zimowym w dużej ilości, a wyjątkowo niesprzyjające warunki pogodowe na przedwiośniu 2020 roku doprowadziły do wystąpienia klinicznych objawów choroby.

W większości krajów walka ze zgnilcem złośliwym polega na niszczeniu zakażonych rodzin pszczelich poprzez zasiarkowanie i spalenie pszczoł wraz z zawartością ula oraz towarzyszącym sprzętem. Możliwe jest termiczne odkażenie uli i sprzętu za pomocą płomienia (Buczek, 2011). W Polsce dopuszcza się leczenie chorych rodzin poprzez przesiedlenie do odkażonego ula pod nadzorem lekarza weterynarii. Obowiązkowe jest przy tym niszczenie wszystkich starych plastrów z czerwem i wyposażenia ula (patrz "Pszczelarstwo", Nr. 5, 2011). 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 skutki uboczne szczególnie długotrwałego stosowania antybiotyków i polisulfamidów dla pszczoł oraz ludzi (skażone produkty pszczele) doprowadziły do zakazu ich wykorzystania w krajach Unii Europejskiej (Rozporządzenie EEC 2377/90 z 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. Próby hodowli linii pszczoł odpornych na zgnilec również nie dały zadawalających wyników. Tymczasem przytoczone powyżej dane GIW jednoznacznie pokazują, że zagrożenie tą chorobą pszczoł stale narasta. Związane jest to z nakładaniem się szeregu niekorzystnych czynników. Można tu wymienić problemy z warrozą, chorobami wirusowymi, nową odmianą nosemozy – nosema ceranae, czy zaburzenia rodziny

pszczelej spowodowane masowym stosowaniem substancji chemicznych, takich jak np. neonikotynoidy. Problem związany z zagrożeniem rodzin pszczelich zgnilcem złośliwym ma charakter globalny i dotyczy wszystkich krajów, w których hodowane są pszczoły.

W leczeniu zgnilca złośliwego pszczoł poszukiwane są substancje pochodzenia naturalnego. Badano olejki eteryczne z różnych roślin oraz propolis. Większość tych substancji wykazuje relatywnie słabe działanie względem *P. larvae*. Wartość minimalnego stężenia hamującego rozwój bakterii *P. larvae* (MIC) i wynosi dla nich od 250 do 400 µg/mL) niemniej już przy tych stężeniach wykazują toksyczność względem pszczoł np. tymol. Część autorów tego wniosku jest również twórcami zgłoszenia patentowego oznaczonego numerem P.422063 z 29.06.2017 roku, w którym wykorzystano niepolarny ekstrakt (heksanowy lub uzyskiwany w wyniku ekstrakcji nadkrytycznym ditlenkiem węgla) z cienkich gałązek brzozy do leczenia zgnilca złośliwego pszczoł. Badania własne pozwoliły zoptymalizować skład kompozycji otrzymywanej na bazie niepolarnego ekstraktu z cienkich gałązek brzozy i określić jej minimalne stężenie hamujące MIC na poziomie 1,562 mg/ml. Weryfikacja skuteczności powyższej kompozycji bezpośrednio w rodzinach pszczelich pozwoliła stwierdzić, że jest dobrze tolerowana przez pszczoły dorosłe i może być wykorzystywana szczególnie do profilaktyki lub leczenia wspomagającego po przesiedleniu rodzin pszczelich. Niestety badania przeprowadzone w Państwowym Instytucie Weterynarii w Pracowni Chorób Pszczoł wykazały, że przy dawkach leczniczych (powyżej MIC) kompozycja przygotowywana na bazie ekstraktów z cienkich gałązek brzozy jest toksyczna dla larw pszczelich.

Przedmiotem wynalazku jest kompozycja oraz sposób otrzymywania kompozycji zawierającej suchy ekstrakt metanolowy w postaci proszku z owocników grzyba poliporoidalnego złotoporka niemilego *Tyromyces fissilis* do zastosowania w leczeniu zgnilca złośliwego pszczoł, choroby czerwia pszczoły miodnej *Apis mellifera*.

Istotą wynalazku jest kompozycja do zastosowania w leczeniu zgnilca złośliwego pszczoł, choroby czerwia pszczoły miodnej *Apis mellifera* wywołanej przez przetrwalnikujące bakterie *Paenibacillus larvae*. Zawiera suchy ekstrakt metanolowy w postaci proszku uzyskiwany z owocników grzyba poliporoidalnego złotoporka niemilego *Tyromyces fissilis*, zmieszany z wodą w proporcji 1:20.

Kompozycja jest stosowana w leczeniu zgnilca złośliwego pszczoł, choroby czerwia pszczoły miodnej *Apis mellifera* wywołanej przez przetrwalnikujące bakterie *Paenibacillus larvae* po wymieszaniu z syropem cukrowym w proporcjach 1:10, zaś w profilaktyce zgnilca złośliwego pszczoł po wymieszaniu z syropem cukrowym w proporcjach 1:20.

Zgodnie z kolejnymi etapami otrzymywania kompozycji: owocniki złotoporka niemilego *Tyromyces fissilis* są rozdrabniane, zalewane metanolem, macerowane i mieszane, następnie filtrowane w celu wydzielenia ekstraktu z maceratu, po czym odparowywane z metanolu w wyparce próżniowej w temperaturze poniżej 50°C i ciśnieniu $p \leq 20$ kPa (200 mbar), a tak uzyskany suchy ekstrakt miesza się z wodą.

Badania zapoczątkowane w 2017 roku a związane z poszukiwaniem substancji pochodzenia naturalnego skierowały uwagę zespołu na grzyby poliporoidalne (nadrzewne). Wówczas to dosyć przypadkowo przeprowadzone badania wykazały, że niektóre ekstrakty grzybowe wykazują znacznie silniejsze działanie bakteriobójcze niż ekstrakty z gałązek brzozy. W roku 2019 przeprowadzono szerokie badania właściwości antybakteryjnych ekstraktów uzyskanych z grzybów nadrzewnych składający się z trzech etapów.

Etap pierwszy polegał na weryfikacji jakościowej aktywności antybakteryjnej preparatów (kompozycji) grzybowych względem bakterii *Paenibacillus larvae* reprezentujących dwa genotypy, tj. Eric I i Eric II (dwa szczepy referencyjne i cztery szczepy dzikie) przy różnych stężeniach ekstraktów. Były to typowe badania skryningowe (przesiewowe) 125 ekstraktów uzyskanych z grzybów poliporoidalnych zgromadzonych w Zamiejscowym Wydziale Leśnym w Hajnówce. Ekstrakty te stanowiły suche proszki otrzymane po odparowaniu metanolu z maceratów grzybowych w suszarce próżniowej. Wykazano we wstępnej fazie badań, że najwyższą aktywność wykazują preparaty w roztworach wodnych przy stężeniu od 5%. Przy wyższych stężeniach ekstraktu nie występował wyraźny wzrost promienia inaktywacji bakterii. Dlatego też we wszystkich badaniach zastosowano 5% stężenie suchego preparatu w roztworach wodnych. Odczyt jakościowy aktywności antybakteryjnej względem *P. larvae* prowadzono analogicznie jak przy odczycie antybiogramów. Za pomocą miarki w milimetrach mierzono średnice uzyskanych okręgów zahamowanego wzrostu bakterii *P. larvae*. Pomiar odbywał się w trzech powtórzeniach, z których wyciągano wartość średnią, o ile różnica nie wynosiła więcej niż 2 mm. W przypadku, gdy pomiary różniły się o więcej niż 2 mm

powtórzono badanie w celu weryfikacji wyniku. Rezultatem realizacji tego etapu badań było wskazanie gatunków grzybów, których ekstrakty wykazują działanie bakteriobójcze względem *P. larvae*. Spośród 125 ekstraktów grzybowych wybrano 6, które wykazały szczególnie silne działanie bakteriobójcze względem *P. larvae*. W tabeli 1 przedstawiono wyniki opisanych powyżej badań dla 6 wyselekcjonowanych gatunków grzybów poliporoidalnych.

Tabela 1. Aktywność antybakteryjna wyselekcjonowanych 6 preparatów grzybowych o najwyższej aktywności względem szczepów *P. larvae* (test jakościowy).

W Lp	Nr kompozycji i gatunek grzyba z nazwą potoczną i łacińską	Strefa zahamowania wzrostu dla różnych szczepów bakterii <i>P. larvae</i> [mm]					
		ERIC I			ERIC II		
		<i>P. larvae</i> LMG 9820	<i>P. larvae</i> DZIKI 1	<i>P. larvae</i> DZIKI 5	<i>P. larvae</i> CCUG 48973	<i>P. larvae</i> DZIKI 3	<i>P. larvae</i> DZIKI 7
1.	G11 Korzeniowiec sosnowy <i>Heterobasidion annosum</i>	20	21	19	22	23	21
2.	G36 Złotoporek niemiliły <i>Tyromyces fissilis</i>	20	18	19	21	21	20
3.	G40 Drobnoporek łzawiący <i>Oligoporus guttulatus</i>	20	20	19	21	20	20
4.	G52 Siedziun sosnowy <i>Sparassis crispa</i>	13	13	16	14	14	15
5.	G73 Złamoskórnik purpurowy <i>Chondrostereum purpureum</i>	10	10	<10	14	13	15
6.	G124 modrzewnik lekarski <i>Fomitopsis officinalis</i>	15	<10	12	17	17	16

E

W etapie drugim wyznaczano minimalne stężenia hamujące (MIC, ang. minimum inhibitory concentration) i minimalne stężenia bakteriobójcze (MBC, ang. minimum bactericidal concentration), ekstraktów z sześciu wyselekcjonowanych gatunków grzybów, które przedstawiono w tabeli 2. Wyniki badań MIC jak i MBC pokazują, że wartości stężeń znacząco różnią się między sobą tak dla różnych gatunków grzybów, jak i różnych szczepów *P. larvae*. Najbardziej odporne względem badanych kompozycji okazały się szczepy referencyjne *P. larvae* LMG 9820 (Eric I) i CCUG 48973 (Eric II). Najsilniejsze działanie bakteriobójcze wykazywała kompozycja przygotowana na bazie ekstraktu oznaczonego symbolem G36 a otrzymanego z owocników złotoporka niemilego *Tyromyces fissilis* i ona została wytypowana do trzeciego etapu badań. Powyżej opisane badania zrealizowano w Laboratorium Mikrobiologii Stosowanej Uniwersytetu w Białymstoku.

Tabela 2. Wyniki jakościowe aktywności antybakteryjnej wyselekcjonowanych sześć preparatów grzybowych względem szczepów *P. larvae*

B Lp	Nr kompozycji i gatunek grzyba z nazwą potoczną i łacińską	Rodzaj stężenia	Wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) i minimalne stężenia bakteriobójczego (MBC) względem <i>P. larvae</i> (µg/ml)					
			ERIC I			ERIC II		
			P. larvae LMG 9820	P. larvae DZIKI 1	P. larvae DZIKI 5	P. larvae CCUG 48973	P. larvae DZIKI 3	P. larvae DZIKI 7
1.	G11 Korzeniowiec sosnowy <i>Heterobasidion annosum</i>	MIC	4882,81	76,29	76,29	4,77	1,19	1,19
		MBC	19531,25	305,17	305,17	19,07	4,769	4,769
2.	G36 Złotoporek niemiliły <i>Tyromyces fissilis</i>	MIC	305,18	1,19	0,30	4,77	1,19	0,30
		MBC	1220,7	4,77	1,192	19,07	4,77	1,19
3.	G40 Drobnoporek lżawiący <i>Oligoporus guttulatus</i>	MIC	19531,25	4882,81	4882,81	305,18	19,07	0,30
		MBC	78125,0	19531,25	19531,25	1220,7	76,29	1,19
4.	G52 Siedzuń sosnowy <i>Sparassis crispa</i>	MIC	nie działa	4882,81	4882,81	19531,25	19531,25	4882,81
		MBC	nie działa	19531,25	19531,25	78125,0	78125,0	19531,25
5.	G73 Ziamoskórnik purpurowy <i>Chondrostereum purpureum</i>	MIC	nie działa	78125	78125	78125	78125	78125
		MBC	nie działa	312500,0	312500,0	312500,0	312500,0	312500,0
6.	G124 modrzewnik lekar. <i>Fomitopsis officinalis</i>	MIC	nie działa	5000	5000	5000	5000	5000
		MBC	nie działa	nie działa	nie działa	nie działa	nie działa	nie działa

B

Badania związane z etapem III przeprowadzono w Zakładzie Chorób Pszczół Państwowego Instytutu Weterynarii w Puławach. Polegał on na weryfikacji *in vivo* wpływu wyselekcjonowanego preparatu – kompozycji przygotowanej na bazie ekstraktu metanolowego ze złotoporka niemilego *Tyromyces fissilis* (5% roztwór wodny suchego ekstraktu metanolowego) na zakażone larwy pszczele przetrwalnikami *P. larvae* genotypu Eric I i Eric II. Zasadniczym celem badań była ocena właściwości bakteriobójczych preparatu przygotowanego na bazie ekstraktu grzybowego w warunkach *in vivo* tj. po podaniu larwom pszczelim zakażonym bakteriami *Paenibacillus larvae*.

Badania wykonano w oparciu o wytyczne The COLOSS BEEBOOK, tom I "Standard methods for Apis mellifera research", rozdziały: "Standard methods for artificial rearing of Apis mellifera larvae"; "Standard methods for toxicology research in Apis mellifera"; tom II, "Standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research", rozdział "Standard methods for American foulbrood research" oraz procedury badawcze Zakładu Chorób Pszczół PIWet-PIB. Do badań laboratoryjnych użyto jednodniowych larw pszczoł rasy *Apis mellifera carnica*, pochodzących ze zdrowych klinicznie rodzin pszczelich, stacjonujących w pasiece PIWet-PIB w Puławach. Dla pozyskania jednodniowych larw, cztery dni przed rozpoczęciem każdej serii badań laboratoryjnych, w wybranej rodzinie pszczelej, matkę umieszczono na pustym plastrze w izolatorze jednoramkowym. Po zaczerwieniu plastra przez matkę i upływie trzydniowego okresu stadium jaja, plastry z jednodniowymi larwami przenoszono do laboratorium celem rozpoczęcia wychowu w warunkach laboratoryjnych.

Ocenę przeciwbakteryjnego działania preparatu grzybowego przeprowadzono na larwach pszczelich zakażonych, występującymi w krajowych pasiekach, terenowymi szczepami bakterii *P. larvae* genotypu ERIC I oraz ERIC II. Dla ustalenia dawki bakterii *P. larvae*, którymi zakażano larwy, przygotowano serię dziesięciokrotnych rozcieńczeń wyjściowej zawiesiny bakterii ERIC I oraz ERIC II (od 10^{-1} do 10^{-7}), które posiano na stałe podłoża wzrostowe. Na podstawie liczby kolonii bakteryjnych uzyskanych na płytkach Petriego wyliczono miano bakterii *P. larvae* genotypu ERIC I oraz ERIC II w zawiesinach wyjściowych. Zastosowany do zakażenia larw inokulat bakterii ERIC I zawierał $3,0 \times 10^5$ spor/ml, a inokulat bakterii ERIC II zawierał $9,0 \times 10^5$ spor/ml. Jednodniowe larwy pszczele zostały zakażone jednorazową dawką inokulatu dodaną do pierwszej porcji mleczka. Larwy pszczele zakażane

bakteriami genotypu ERIC I pobrały wraz z pokarmem po $1,0 \times 10^3$ spor/larwę, natomiast larwy pszczele zakażane bakteriami genotypu ERIC II spożyły po $2,0 \times 10^3$ spor/larwę.

Dla zrealizowania celu badania utworzono grupy doświadczalne liczące po 30 larw pszczelich. Badanie wykonano w 3 powtórzeniach:

- grupa A1 – larwy pszczele zakażone bakteriami *P. larvae*, genotyp ERIC I, karmione mleczkiem bez dodatku kompozycji grzybowej (nieleczone);
- grupa A2 – larwy pszczele zakażone *P. larvae*, genotyp ERIC I karmione z dodatkiem 0,025% kompozycji grzybowej;
- grupa A3 – larwy pszczele zakażone *P. larvae*, genotyp ERIC I karmione 0,05% z dodatkiem kompozycji grzybowej;
- grupa B1 – larwy pszczele zakażone bakteriami *P. larvae*, genotyp ERIC II, karmione mleczkiem bez dodatku kompozycji grzybowej (nieleczone);
- grupa B2 – larwy pszczele zakażone *P. larvae*, genotyp ERIC II, karmione z dodatkiem 0,025% kompozycji grzybowej;
- grupa B3 – larwy pszczele zakażone *P. larvae*, genotyp ERIC II, karmione z dodatkiem 0,05% kompozycji grzybowej;
- grupa K1 – larwy pszczele niezakażone *P. larvae*, karmione mleczkiem bez dodatku kompozycji grzybowej;
- grupa K2 – larwy pszczele niezakażone *P. larvae*, karmione z dodatkiem 0,025% kompozycji grzybowej;
- grupa K3 – larwy pszczele niezakażone *P. larvae*, karmione z dodatkiem 0,05% kompozycji grzybowej.

Obserwacje larw (rozwój zakażenia, śmiertelność) prowadzono codziennie przez cały okres trwania każdej serii badań (11 dni). Stan każdej larwy oceniano indywidualnie przy zastosowaniu mikroskopu stereoskopowego.

Wyniki wpływu działania ekstraktu grzybowego na rozwój zakażenia *P. larvae* i przeżywalność larw pszczelich uzyskane w trakcie badań (trzy powtórzenia łącznie) zamieszczono w tabeli 3. Tabela zawiera wyniki wrazone odsetkiem (%) martwych larw obserwowanych w kolejnych 11 dniach trwania badania, w stosunku do liczby larw poddanych badaniu ($n=90$).

Tabela 3. Wyniki badań wpływu kompozycji grzybowej w warunkach *in-vivo* w postaci odsetka śmiertelności larw zarażonych przetrwalnikami *P. larvae* genotypu Eric I i Eric II.

Dzień doświadczenia	A1 zakażone ERIC I, nieleczone	A2 zakażone ERIC I, leczone 0.025% ekstraktem	A3 zakażone ERIC I, leczone 0.05% ekstraktem	B1 zakażone ERIC II, nieleczone	B2 zakażone ERIC II, leczone 0.025% ekstraktem	B3 zakażone ERIC II, leczone 0.05% ekstraktem	K1 niezakażone, karmione mleczkiem bez ekstraktu	K2 niezakażone, karmione 0.025% ekstraktem	K3 niezakażone karmione 0.05% ekstraktem
Podawanie pokarmu	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	5
	3	0	0	7	0	13	13	0	7
	4	10	30	43	35	33	19	5	7
	5	42	80	65	97	67	33	5	15
	6	42	80	80	100	67	50	5	15
7	58	80	90	100	67	50	10	25	16
8	61	90	100	100	67	50	10	27	16
9	74	90	100	100	67	50	10	27	18
10	100	93	100	100	67	50	10	28	18
11	100	97	100	100	67	50	10	28	18

Najniższą śmiertelność larw pszczelich stwierdzono w grupie kontrolnej (K1) larw niezakażonych bakteriami *P. larvae*, karmionych mleczkiem pszczelim bez dodatku preparatu grzybowego, w której stadium poczwarki osiągnęło 90% larw. W grupach larw niezakażonych, karmionych mleczkiem z dodatkiem ekstraktu grzybowego (K2, K3), śmiertelność była nieznacznie wyższa, a stadium poczwarki osiągnęło 72% larw karmionych pokarmem zawierającym 0,025% ekstraktu i 82% larw karmionych pokarmem zawierającym 0,05% ekstraktu. Pomimo, iż w grupach larw otrzymujących dodatek preparatu grzybowego stwierdzono niższą przeżywalność larw, trudno jednoznacznie stwierdzić, że była ona wynikiem toksycznego oddziaływania preparatu na larwy. Wątpliwości te nasuwa wyższa przeżywalność larw w grupie larw karmionej mleczkiem z wyższym stężeniem ekstraktu grzybowego.

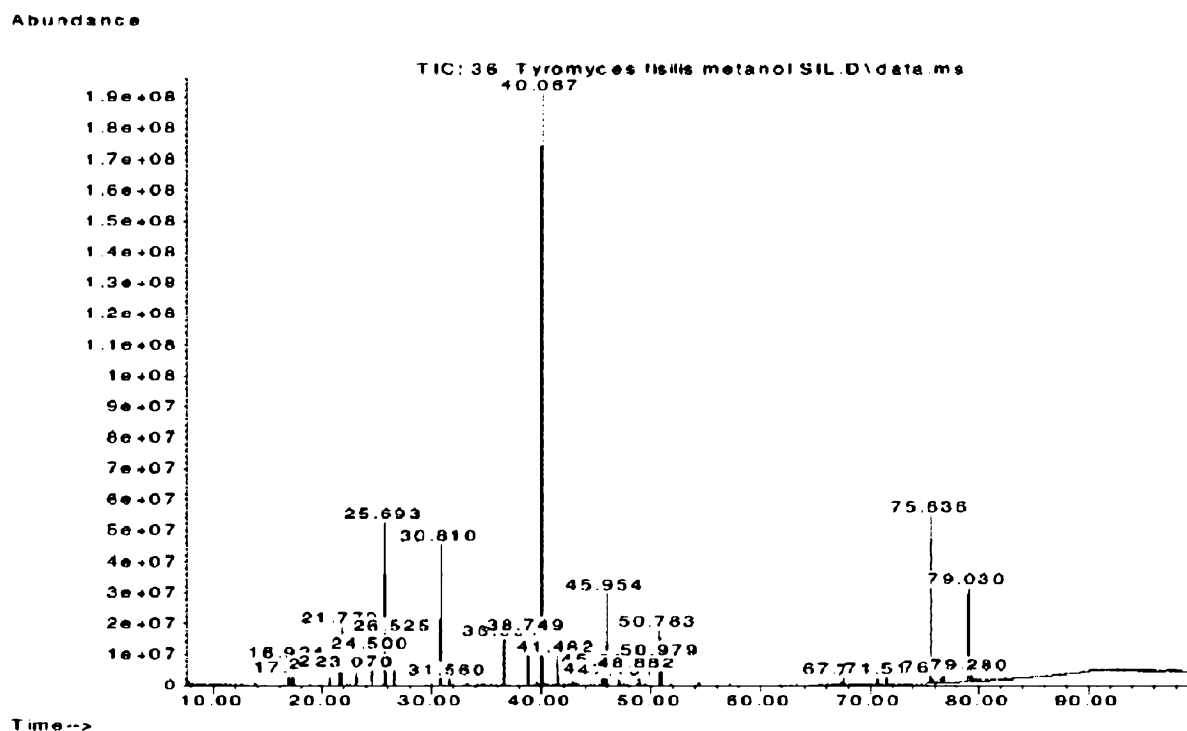
Rozwój przebiegu zakażenia *P. larvae* oceniany na podstawie obserwacji larw zakażonych ERIC I i ERIC, ale nieleczonych ekstraktem grzybowym (grupa A1, B1), przebiegał zgodnie z rozwojem zgnilca amerykańskiego opisanym przez Światową Organizację Zdrowia Zwierząt (OIE). W przypadku grupy zakażonej szczepem ERIC I większość larw zamarła przed osiągnięciem stadium przedpoczwarki (61%), a pozostałe przed przeobrażeniem się w poczwarki. W przypadku larw zakażonych szczepem ERIC II, charakteryzującym się większą zjadliwością, wszystkie larwy zamarły w czwartej i piątej dobie od zakażenia, czyli w czasie trwania w warunkach *in vivo*, fazy czerwii niezasklepionego.

Podanie larwom zakażonym ERIC I (grupa A2, A3) preparatu grzybowego w stężeniu 0,025% jak i 0,05% nie zahamowało zamierania larw będącego następstwem rozwoju zakażenia. Zamieranie larw następowało nawet znacznie szybciej w porównaniu do larw zakażonych ale nieleczonych (A1). Co prawda w grupie larw leczonych ekstraktem grzybowym w stężeniu 0,025% nie doszło do rozwoju zakażenia w 3% larw, które osiągnęły stadium poczwarki, ale w grupie leczonej 0,05% ekstraktem, śmiertelność larw wyniosła 100%, podobnie jak w grupie larw nieleczonych. Niemniej 3% zarażonych larw dawką śmiertelną *P. larvae* przeżyło zakażenie genotypem Eric I. Można wyciągnąć wniosek, że podana dawka kompozycji była za niska. Potwierdzają to wyniki badań MIC i MBC przedstawione w tabeli 2.

Działanie bakteriobójcze ekstraktu grzybowego zostało jednoznacznie stwierdzone w grupach larw zakażonych szczepem bakterii Eric II (grupa B2, B3). Rozwój zakażenia został zahamowany u 33% larw, którym podawano wyciąg o stężeniu 0,025%, natomiast w grupie larw karmionej 0,05% ekstraktem, stadium poczwarki osiągnęło 50% zakażonych larw. W grupie zakażonej Eric II, ale nie leczonej (B1) na skutek rozwoju zakażenia zamarło 100% larw. Znamienne jest przy tym, że krytyczny okres rozwoju larw wstępuje pomiędzy 3 a 5 dniem życia. Należy zwrócić uwagę, że szczepy bakterii Eric II powszechnie są uważane jako „bardziej zjadliwe”.

Przedstawione powyżej wyniki badań pozwalają wnioskować o bakteriobójczym działaniu kompozycji grzybowej przygotowanej na bazie ekstraktu ze złotoporka niemiłego *Tyromyces fissilis* na bakterie *P. larvae*, a co najmniej na jej selektywne działanie na genotypy Eric II.

Skład chemiczny suchego ekstraktu metanolowego ze złotoporka niemiłego *Tyromyces fissilis* (po odparowaniu alkoholu) określono techniką GC-MS po wcześniejszej sililacji próbek. Identyfikację składu prowadzono na podstawie baz danych: Wiley Registry: Mass Spectral Library, 11th Edition; NIST 11 i na podstawie publikacji: Isidorow W. „GC-MS of Biologically and Environmentally Significant Organic Compounds: TMS Derivatives, 2020, John Wiley & Sons, ISBN 978-1-119-61134-9”. Na rysunku 1 przedstawiono otrzymany chromatogram z analizy GC-MS a w tabeli 4 skład chemiczny ekstraktu. Badania przeprowadzono w pracowni chemicznej Instytutu Nauk Leśnych Wydziału Budownictwa i Nauk o Środowisku.



Rysunek 1. Chromatogram z analizy GC-MS metanolowego ekstraktu z *Tyromyces fissilis*

Analiza składu chemicznego pozwala stwierdzić, że zidentyfikowanymi substancjami odpowiedzialnymi za bakteriobójcze działanie ekstraktu jest grupa hydroksykwasów i kwasów dikarboksylowych, których zawartość można oszacować na poziomie około 9%. Niestety nie udało się zidentyfikować aż 28,95% substancji, które zaobserwowano na chromatogramach pomimo uaktualnionej bazy. Jest to dosyć charakterystyczny problem występujący w identyfikacji metabolitów wtórnych w gatunkach grzybów, które są stosunkowo mało znane.

Tabela 4. Skład chemiczny metanolowego ekstraktu z *Tyromyces fissilis* oznaczony przy użyciu GC-MS, po uprzedniej sililacji próbek.

Grupa związków chemicznych	Numer CAS	t _{ret.} (min.)	Zawartość (%)
Hydroksykwas i kwasy dikarboksylowe, w tym:			9,06
Kwas mlekowy, di-TMS	17596-96-2	12,052	0,06
2-Hydroksybursztynian dimetylu, TMS	55590-73-3	20,652	0,56
Kwas bursztynowy, di-TMS	40309-57-7	23,070	0,61
Kwas fumarowy, di-TMS	17962-03-7	24,500	1,38
Kwas jabłkowy, tri-TMS	107241-82-7	30,810	6,26
Kwas cytrynowy, tetra-TMS	14330-97-3	43,183	0,18
Węglowodany, m. in.:			52,35
Ramnoza, tetra-TMS	19127-15-2	36,531	2,10
Ksylitol, penta-TMS	14199-72-5	39,594	0,23
Ribitol, penta-TMS	32381-53-6	40,067	39,28
α -Glucopiranozyd metylu, tetra-TMS	2641-79-4	45,302	0,07
α -D-Glukopiranoza, penta-TMS	3327-61-5	45,954	4,34
Mannitol, hexa-TMS	14317-07-8	47,101	0,34
Galaktitol, hexa-TMS	18919-39-6	47,597	0,13
β -Glukopiranoza, penta-TMS	2775-90-3	48,882	0,65
mio-Inozitol, hexa-TMS	2582-79-8	51,826	0,13
Kwasy tłuszczowe i estry kwasów tłuszczowych, w tym:			5,07
Palmitynian metylu	112-39-0	45,582	0,81
Kwas palmitynowy, TMS	55520-89-3	49,498	0,10
Linolan metylu	112-63-0	50,783	2,62
Oleinian metylu	112-62-9	50,979	1,29
Kwas linolowy, TMS	56259-07-5	54,328	0,17
Kwas oleinowy, TMS	21556-26-3	54,495	0,10
Aminokwasy, w tym:			0,62
Alanina, N,O-di-TMS	2899-44-7	13,811	0,12
Valina, N,O-di-TMS	7364-44-5	18,846	0,07
Seryna, N,O,O-tri-TMS	64625-17-8	25,459	0,07
Kwas pirolutaminowy, N,O-di-TMS	30274-77-2	31,560	0,37
Inne związki chemiczne, w tym:			3,94
Fosforan metylu, di-TMS	18291-81-1	17,190	0,33
1-Oktanol, TMS	14246-16-3	17,421	0,37
Kwas fosforowy, tri-TMS	10497-05-9	21,575	0,64
Glicerol, tri-TMS	6787-10-6	21,779	2,60
Niezidentyfikowane związki chemiczne			28,95

Złotoporek niemiły *Tyromyces fissilis* nie jest gatunkiem występującym w Polsce pospolicie. Dlatego też w Instytucie Nauk Leśnych Politechniki Białostockiej przy współpracy z Uniwersytetem Jagiellońskim podjęto próby hodowli tego grzyba, na podłożu stałym i w hodowli hydroponicznej. Wyniki badań hodowli Złotoporek niemiłego *Tyromyces fissilis* są bardzo obiecujące. Hodowla pozwoli uzyskać nieograniczony zasób surowca w postaci owocników lub micelium (hodowla hydroponiczna) do wykorzystania przy produkcji leku weterynaryjnego do leczenia zgnilca złośliwego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja zawierająca suchy ekstrakt metanolowy w postaci proszku z owocników grzyba poliporoidalnego złotoporka niemiłego *Tyromyces fissilis*, zmieszany z wodą w proporcji 1:20 do zastosowania w leczeniu zgnilca złośliwego pszczoł, choroby czerwia pszczoły miodnej *Apis mellifera* wywoływanej przez przetrwalnikujące bakterie *Paenibacillus larvae*.
2. Kompozycja do zastosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że jest mieszana z syropem cukrowym w proporcjach 1:10.
3. Kompozycja do zastosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że jest mieszana z syropem cukrowym w proporcjach 1:20.
4. Sposób otrzymywania kompozycji określonej w zastrz. 1, **znamienny tym**, że owocniki złotoporka niemiłego *Tyromyces fissilis* są rozdrabniane, zalewane metanolem, macerowane i mieszane, następnie filtrowane w celu wydzielenia ekstraktu z maceratu, po czym odparowywane z metanolu w wyparce próżniowej w temperaturze poniżej 50°C i ciśnieniu $p \leq 20$ kPa (200 mbar), a tak uzyskany suchy ekstrakt miesza się z wodą.