

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **241494**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432228**

(51) Int.Cl.
A61K 35/64 (2015.01)
A61P 33/00 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **16.12.2019**

(54) **Wodny ekstrakt z gniazd mrówek *Lasius fuliginosus* do zastosowania
w zwalczaniu nosekozy pszczoły miodnej**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
28.06.2021 BUP 13/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
10.10.2022 WUP 41/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MARII CURIE-
-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

BERNARD STANIEC, Lublin, PL
GRZEGORZ K. WAGNER, Lublin, PL
ANETA PTASZYŃSKA, Świdnik, PL
MAGDALENA KUNAT, Tywonia, PL
MAGDALENA JASZEK, Piotrawin, PL
DAWID STEFANIUK, Lublin, PL
ANNA MATUSZEWSKA, Kalinówka, PL

PL 241494 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest wodny ekstrakt wyizolowany z materiału budulcowego gniazd mrówek z gatunku kartonówka zwyczajna *Lasius fuliginosus*, znajdujący zastosowanie do zwalczania nosemozy, choroby atakującej pszczoły miodne.

Lasius fuliginosus to pospolicie występujący w Europie i w Azji gatunek mrówki, budującej gniazda w starych drzewach lub pniach starych drzew, z rozdrobnionego próchna wymieszanego z własną śliną i spadzią mszyc. Powstały materiał budulcowy przypomina strukturę papieru lub kartonu, prześwieconego strzępkami symbiotycznych grzybów, którego mikrostrukturę uwidoczniono na rysunku w postaci zdjęcia spod mikroskopu skaningowego jako fig. 1.

Znane są wyniki badań aktywności przeciwrzybiczej preparatów dla pszczół zawierających materiał mikrobiologiczny pochodzący od mrówek. Jak opisują Lan Ye i in., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, nr 67, 2017, (1529–1534), z głów mrówek z gatunku *Lasius fuliginosus* wyizolowano szczep bakterii promieniowej *Streptomyces lasiicapitis*, produkujący kanchanomycynę – substancję o aktywności przeciwrzybiczej. Podobnie, aktywność przeciwrzybiczą wykazały szczepy bakterii *Pseudonocardia* oraz *Amycolatopsis*, wyizolowane z ciał innego rodzaju mrówek – żniwiarek *Attini*, co opisali Sen i inni w czasopiśmie PNAS October 20, vol. 106, nr. 42, 2009. Pozyskiwanie materiału mikrobiologicznego tych substancji ma wysoce inwazyjny charakter, gdyż wiąże się z uśmiercaniem samych owadów.

Do tej pory jedynym, znanym ze zgłoszenia patentowego P.430603, przykładem użycia materiału biologicznego wyizolowanego z gniazd mrówki *Lasius fuliginosus*, było jego zastosowanie do zwalczania komórek nowotworowych czerniaka wyizolowanych z nabłonka skóry ludzkiej. Zbadano, że ekstrakt ten wykazuje zarówno działanie cytotoksyczne, jak i antyproliferacyjne wobec komórek nowotworowych. Jednocześnie nie wykazuje on negatywnego oddziaływania na komórki prawidłowe.

W znanym stanie techniki brak jest doniesień opisujących wyniki badań w kierunku wykorzystania materiału budulcowego gniazd mrówek z gatunku kartonówka zwyczajna *Lasius fuliginosus*, jako substancji zwalczającej nosemozę, chorobę atakującą pszczoły miodne.

Dotychczas, w leczeniu nosemozy u pszczół, stosuje się powszechnie leki na bazie fumagiliny. Jest to substancja wyizolowana z grzyba *Aspergillus fumigatus*, której działanie polega jedynie na hamowaniu aktywności enzymu aminopeptydazy metioninowej MetAP-2, bez niszczenia zarodników *Nosema* spp., co w konsekwencji prowadzi do stopniowego rozwoju oporności grzyba na ten antybiotyk. Ponadto, fumagilina dodana do syropu cukrowego, który podaje się pszczołom, trudno rozpuszcza się w wodzie. Konieczne jest więc stosowanie różnych dodatków chemicznych zwiększających rozpuszczalność antybiotyku w roztworach wodnych. Niestety, takie postępowanie grozi możliwością przenikania do miodu samej fumagiliny lub produktów jej metabolizmu.

Alternatywę dla antybiotyków na bazie fumagiliny, w leczeniu nosemozy pszczoły karłowatej (*Apis florea*), zaproponował Suwannapong i in. w publikacji zamieszczonej w *Journal of Asia-Pacific Entomology*, nr 21, 2018 r. 437–444, używając ekstraktów etanolowych, przygotowanych na bazie propolisu.

Inny, znany z opisu patentowego MX 2011011839, sposób zapobiegania i zwalczania nosemozy u pszczół, polega na wyciszaniu wybranych genów *Nosema* spp. W tym celu stosuje się odpowiednie konstrukty genetyczne lub cząsteczki kwasów nukleinowych (np. siRNAs, miRNAs and shRNAs), które są funkcjonalnie związane z białkami penetrującymi komórkę. Niestety, metoda ta również nie gwarantuje dostatecznej skuteczności zwalczania nosemozy u pszczół. Dodatkowo, wiąże się ona z koniecznością użycia drogich technik otrzymywania i oczyszczania genów, a sama idea aplikowania pszczołom preparatów na bazie modyfikowanych genetycznie związków jest dyskusyjna i trudno ją powszechnie zaakceptować.

Ze zgłoszenia patentowego P.408774 znany jest również preparat do zwalczania mikrosporydioz, a zwłaszcza nosemozy u pszczół, zawierający jedną z rozprowadzonych homogenicznie, amidowych pochodnych protoporfiryny.

Z uwagi na fakt, iż miód oraz inne produkty pszczele wykorzystywane są jako pokarm, suplementy diety itp., preparaty przeznaczone dla pszczół powinny bazować na dobrze poznanych, najlepiej naturalnych substancjach, bezpiecznych zarówno dla pszczół jak i dla ludzi, łatwo degradowalnych i niepowodujących zmian genetycznych w organizmach tych pożytecznych owadów.

W literaturze istnieją doniesienia o stosowaniu produktów leczniczych w pszczelarstwie, zawierających ekstrakty z substancji naturalnego pochodzenia. Jednym z takich jest tymol i resweratrol, substancje wyekstrahowane z ziela tymianku (*Thymus* sp.) i używane w walce z warozą. 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, 2017 r., 141–147, w badaniach *in vivo* wykazali zarówno aktywność ekstraktu uzyskanego z liści *Cryptocarya alba* wobec mikrosporydiów *Nosema* sp., którymi zakażono pszczoły, jak i brak jego toksyczności w pierwszych 8 dniach badania, a więc w stosunkowo krótkim czasie, co 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. Wszystkie produkty lecznicze stosowane dotychczas w walce z groźną chorobą pszczoł jaką jest nosemoza, wykazują w różnym stopniu działania jedynie ograniczające infekcję spowodowaną *Nosema* sp., zatem niezbędne są dalsze badania w tym zakresie.

Nieoczekiwanie okazało się, że ekstrakt wodny otrzymany z powszechnie dostępnego materiału, jakim są kartonowe gniazda mrówki *Lasius fuliginosus*, wykazuje spadek ilości zarodników chorobotwórczych grzyba *Nosema* spp, co znacznie ogranicza rozwój nosemozy u pszczoły miodnej.

Istotą wynalazku jest więc ekstrakt wodny, wyizolowany z gniazd mrówek z gatunku kartonówka zwyczajna *Lasius fuliginosus*, znajdujący zastosowanie w zwalczaniu zakażeń pszczoły miodnej grzybem z rodzaju *Nosema* spp., powodującym nosemozę.

Wynalazek przedstawiony w poniższych przykładach, nie wyczerpuje z pewnością innych jego potencjalnych możliwości zastosowania.

P r z y k ł a d 1. Otrzymywanie ekstraktu według wynalazku

Z materiału pobranego z gniazda mrówek *Lasius fuliginosus*, zbudowanego w dziupli brzozy brodawkowatej *Betula pendula*, po jego uprzednim oczyszczeniu z zanieczyszczeń oraz zamrożeniu, sporządzono ekstrakt wodny w proporcji 1 g na 10 ml wody MQ, poddano wstępnej obróbce mechanicznej przy pomocy homogenizatora ostrzewego, a następnie procesowi sonifikacji w cyklach 4 min. przy amplitudzie 80% i impulsie 30 s, z przerwą na schłodzenie w lodzie. Po przefiltrowaniu przez filtr typu Miracloth i odwirowaniu otrzymano supernatant, który po liofilizacji wykorzystywano do dalszych badań.

P r z y k ł a d 2. Badanie działania ekstraktu według wynalazku na pszczoły zakażone *Nosema* spp.

Otrzymany w przykładzie 1. ekstrakt wodny dodano do syropu cukrowego w ilości 1000 µl ekstraktu na 100 ml syropu i podawano w temperaturze pokojowej pszczołom sztucznie zakażonym średnią ilością zarodników *Nosema* spp., rzędu 98333,(3) na pszczołę, oznaczając umownie eksperyment z podawaniem syropu zawierającego ekstrakt jako Z5, zaś badanie kontrolne gdzie pszczołom zakażonym podawano syrop cukrowy bez dodatku ekstraktu jako KZ. Syropy podawano grupie 40 pszczoł umieszczonych w klatkach przez 6 kolejnych dni począwszy od 7 dnia ich nasiedlenia. Każdy wariant wykonano w 5 powtórzeniach, wybierając z nich średnią. Dla sprawdzenia skuteczności preparatu, w 12 dniu doświadczenia, wykonywano rozciery z martwych pszczoł i liczone liczbę zarodników *Nosema* spp. w grupie pszczoł Z5 karmionej ekstraktem według wynalazku i grupie pszczoł KZ zakażonych, stanowiących kontrolę. Na wykresie, jako fig. 2 przedstawiono liczby zarodników *Nosema* spp. na pszczołę w poszczególnych grupach badawczych. Wyniki wskazują, iż w grupie pszczoł zakażonych, którym podawano ekstrakt, liczba zarodników skutecznie zmalała w stosunku do liczby zarodników *Nosema* spp. w grupie kontrolnej.

W następnym etapie badań, przedłużono okres dokarmiania do 17 dni (fig. 3) określonej liczbowo grupie pszczoł Z5 – karmionych ekstraktem według wynalazku i grupie pszczoł KZ zakażonych i dokarmianych czystym pokarmem, badając stopień ich przeżywalności w trakcie choroby spowodowanej przez *Nosema* spp. W poszczególnych dniach eksperymentu liczone i usuwane martwe pszczoły z klatek dokarmianych pokarmem zawierającym określoną ilość ekstraktu i klatek kontrolnych, gdzie zakażone pszczoły dokarmiano czystym pokarmem. Każdy wariant wykonano w 5 powtórzeniach. Liczbę martwych pszczoł, w grupach badawczych Z5 i KZ przedstawiono na rysunku w postaci wykresu jako

fig. 3. Stwierdzono, że przeżywalność pszczoł zakażonych, którym podawano syrop cukrowy z dodatkiem ekstraktu nie odbiega w sposób istotny od normy, jaką przedstawia próba kontrolna, czyli pszczoły karmione czystym syropem cukrowym.

P r z y k ł a d 3. Wykazanie braku toksyczności ekstraktu według wynalazku na organizmy pszczele.

Otrzymany w przykładzie 1 ekstrakt wodny dodano do porcji syropu cukrowego w ilości 1000 μ l ekstraktu na 100 ml syropu i podawano w temperaturze pokojowej pszczołom zdrowym, oznaczając umownie eksperyment z podawaniem syropu zawierającego ekstrakt jako K5, zaś badanie kontrolne gdzie pszczołom zdrowym podawano syrop cukrowy bez dodatku ekstraktu jako KK. Syropy podawano grupie 40 pszczoł umieszczonych w klatkach przez 6 kolejnych dni począwszy od 7 dnia ich nasiedlenia. Każdy wariant wykonano w 5 powtórzeniach wybierając z nich średnią. Następnym etapem badania było dokarmianie syropem cukrowym bez dodatku ekstraktu do 17 dni określonej liczbowo grupie zdrowych pszczoł K5 – karmionych początkowo ekstraktem według wynalazku i grupie zdrowych pszczoł KK dokarmianych czystym pokarmem, badając stopień ich przeżywalności. Wobec faktu, iż umieralność pszczoł następuje w sposób naturalny, w poszczególnych dniach eksperymentu liczono i usuwano martwe pszczoły z klatek dokarmianych pokarmem zawierającym określoną ilość ekstraktu i klatek kontrolnych, gdzie pszczoły dokarmiano czystym pokarmem. Każdy wariant wykonano w 5 powtórzeniach. Liczbę martwych pszczoł, w poszczególnych grupach badawczych przedstawiono na rysunku w postaci wykresu jako fig. 4, który udowadnia, że przeżywalność pszczoł zdrowych, którym podawano syrop cukrowy z dodatkiem ekstraktu jest wyraźnie wyższa w stosunku do ilości pszczoł martwych z próby kontrolnej, karmionych jedynie czystym syropem cukrowym.

Wyniki powyższych eksperymentów dowodzą, iż ekstrakt według wynalazku nie tylko nie wykazuje działania toksycznego na organizm pszczoły miodnej ale działa odżywczo i protekcyjnie na te owady, wyraźnie wpływając na większą przeżywalność pszczoł zdrowych, co powoduje mniejszą śmiertelność zdrowych osobników. W związku z tym, ekstrakt może być bezpiecznie podawany rodzinom pszczelim do zwalczania nosemozy, nie szkodząc przy tym osobnikom zdrowym.

Zastrzeżenie patentowe

1. Wodny ekstrakt z gniazd mrówek *Lasius fuliginosus* do zastosowania w zwalczaniu nosemozy pszczoły miodnej.

Rysunki

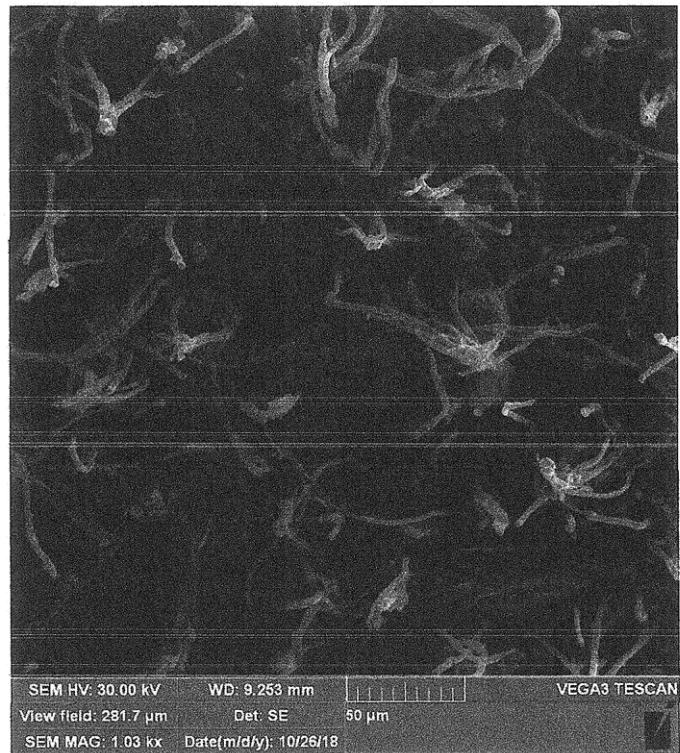


Fig.1

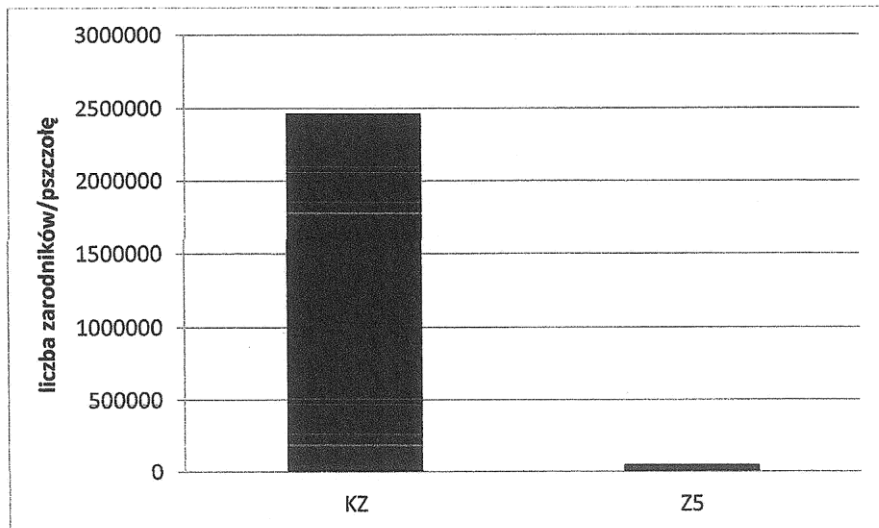


Fig.2

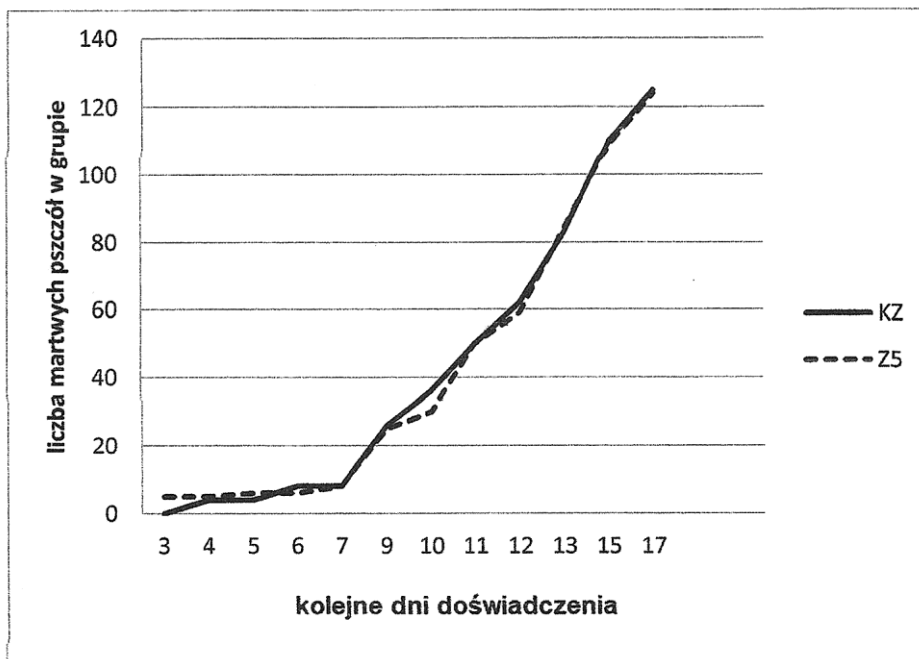


Fig. 3

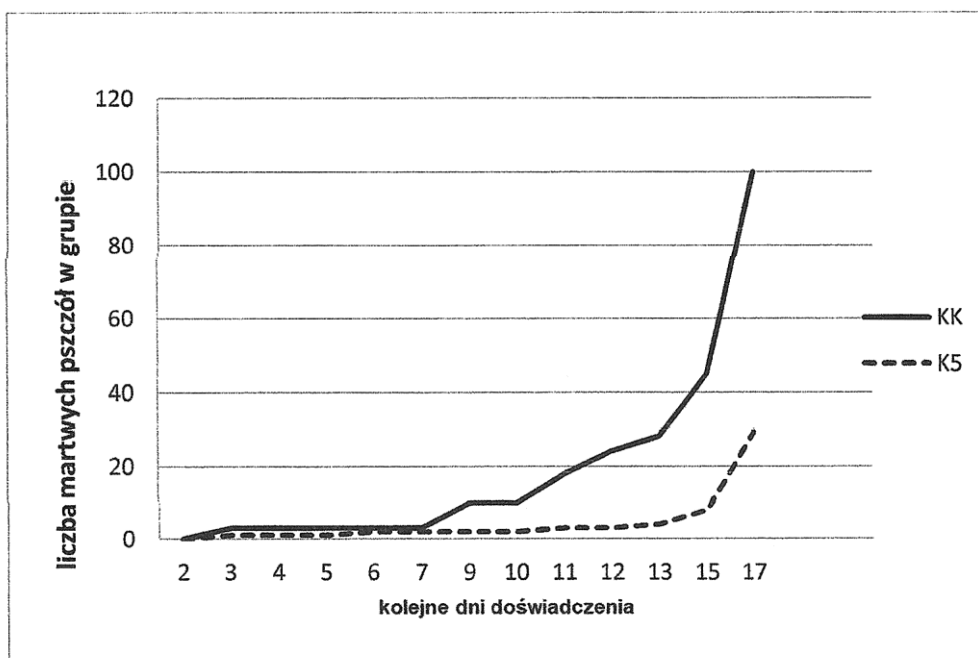


Fig. 4