

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **241380**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **433702**

(22) Data zgłoszenia: **27.04.2020**

(51) Int.Cl.
A01N 65/34 (2009.01)
A01P 3/00 (2006.01)
A61K 36/73 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

(54) **Wodny ekstrakt z roślin z rodzaju *Cannabis* do zastosowania w preparatach zabezpieczających pszczoły przed szkodliwym działaniem insektycydów z grupy neonikotynoidów i zwalczających nosemozę**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
02.11.2021 BUP 31/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
19.09.2022 WUP 38/22

(73) Uprawniony z patentu:

**BEEMMUNITY UNLIMITED
SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ,
Rzeszów, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANETA PTASZYŃSKA, Świdnik, PL
DANIEL ZAŁUSKI, Warszawa, PL
RAFAŁ KUŹNIEWSKI, Bydgoszcz, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Aleksandra Twardowska-Czerwińska

PL 241380 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest ekstrakt sporządzony przy pomocy gorącej wody przed wrzeniem, z korzeni, łodyg czy liści roślin należących do rodzaju *Cannabis*, takich jak np. *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis*, uodparniający pszczoły miodne przed szkodliwym działaniem insektycydów z grupy neonikotynoidów, najczęściej stosowanych – imidaclopridem oraz acetamipridem, a także wykazujący aktywność w zwalczaniu nosemozy wywołanej zakażeniem zarodnikami grzyba *Nosema* spp.

Dotychczas, w leczeniu nosemozy u pszczoł 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 pszczoł, 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 pszczoł. 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.

Z opisu patentowego PL 232685, znany jest preparat podnoszący odporność pszczoł, jednak nie wykazano jego działania dotyczącego zwiększenia przeżywalności pszczoł poddanych działaniu neonikotynoidów.

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 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* spp.) i używane w walce z warrozą. 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* spp., 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* spp., a zatem niezbędne są dalsze badania w tym zakresie.

Ważnym powodem corocznego giniecia znacznej liczby rodzin pszczelich, jest nie tylko nosemoza czy warroza powodowana nadmiernym namnażaniem się pasożyta *V. destructor*, równie duży niepokój wyrażają upadki rodzin pszczelich poza ulem. Udowodniono, że za masowym wymieraniem

pszczoł stoją środki używane do zwalczania szkodników w uprawach rolnych i lasach, owadobójcze – neonikotynoidy – neuroaktywne substancje z grupy pestycydów znacząco zaburzające orientację pszczoł i ich komunikację, mogące być powodem masowego wymierania całych rodzin. Spryskiwanie nasion nikotynoidami powoduje przenikanie takich związków do całej rośliny, w tym do kwiatów i pyłku. Pszczoły, zbierając pyłek i zanosząc go do ula, w zasadzie transportują truciznę, która wpływa nie tylko na pszczoły pracujące poza ulem, ale także na te, które go nie opuszczają, w tym na królową. Dotychczas, w zabezpieczaniu pszczoł przed niekorzystnym działaniem insektycydów z grupy neonikotynoidów nie są znane żadne preparaty, toteż podjęto badania w kierunku opracowania takich preparatów naturalnego pochodzenia. Jak podają Krause i in. oraz Siudem i in. w artykułach zamieszczonych w czasopiśmie *Farmacja Współczesna* nr 9 z 2016 oraz nr 8 z 2015 r., konopie z rodzaju *Cannabis* zawierają około 500 różnych związków, z czego ponad 80 stanowią kannabinoidy. To właśnie dzięki nim konopie znajdują zastosowanie w lecznictwie, zarówno jako substancje powodujące odurzenia narkotyczne jak Δ^9 -tetrahydrokannabinol Δ^9 – THC, jak i substancje niepowodujące odurzenia narkotycznego, takie jak, kannabinol CBN, kannabidiol CBD i inne.

Celem wynalazku było opracowanie skutecznego, o szerokim spektrum działania i niepowodującego skutków ubocznych, preparatu roślinnego skutecznie zabezpieczającego pszczoły przed niekorzystnym działaniem insektycydów jak i zwalczającego mikrosporydiozy.

Nieoczekiwanie okazało się, że wyekstrahowane gorącą wodą ekstrakty z korzeni, liści lub łodyg roślin należących do rodzaju *Cannabis* zarówno przedłużają życie pszczoł narażonych na pestycydy z grupy najczęściej występujących nikotynoidów, takich jak, imidacloprid oraz acetamiprid, jak i powodują spadek ilości zarodników chorobotwórczych grzyba *Nosema* spp., co znacznie ogranicza rozwój nosemozy u pszczoły miodnej.

Istotą wynalazku jest więc ekstrakt z korzeni, liści lub łodyg roślin należących do rodzaju *Cannabis*, takich jak, *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis*, sporządzony przy pomocy gorącej wody o temperaturze utrzymującej się w zakresie od 98 do 99°C, przez co najmniej 10 minut, przydatny do zastosowania w preparatach zabezpieczających pszczoły przed szkodliwym działaniem insektycydów z grupy neonikotynoidów i zwalczających nosemozę.

Wynalazek i jego skuteczność działania przedstawiono w poniższych przykładach wykonania.

Przykład 1

Poszczególne części roślin jak, korzenie, liście i łodygi roślin *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis* przechowywane w suchym, zacienionym miejscu, zmielono, przesiano przez sita (5,6 mm), po czym odważono po 50 g, umieszczono w kolbach miarowych i zalewano 500 ml wody o temperaturze utrzymującej się w granicach od 98 do 99°C przez co najmniej 10 minut. Po kilkunastu minutach ekstrakty przesączało, zamrażano i poddawano liofilizacji.

Przykład 2. Działanie ekstraktów według wynalazku na przedłużanie życia pszczoł poddanych działaniu insektycydów.

Liofilizaty z poszczególnych części roślin *Cannabis*, otrzymanych jak opisano w przykładzie 1, dodawano do pokarmów pszczelich sporządzając mieszanki w postaci:

- Po 500 mg liofilizatu z korzeni *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis*, zmieszano z 250 g hydrolizatu skrobiowego rozpuszczonego w 250 mg przegotowanej wody.
- Po 100 g liofilizatu z liści *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis* rozpuszczono w 1 litrze ddH₂O, po czym 100 ml tego roztworu dodano do 500 g cukru spożywczego rozpuszczonego w 500 g wody.
- Po 500 mg liofilizatu z łodyg *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis*, równomiernie wymieszano z 1,0 kg cukru pudru i 0,25 kg miodu ogrzanego do temp. 50°C.

Tak przygotowane pokarmy używano w temperaturze pokojowej do karmienia pszczoł umieszczonych po 40 osobników w 30 standardowych klatkach, w czasie 8-dniowego eksperymentu.

Grupy badawcze to:

1. Imid – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez cały czas eksperymentu tylko czystym pokarmem, skażonymi 7. dnia imidaclopridem dodanym do pokarmu w ilości 2,5 mg na 100 ml.
2. Acet – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez cały czas eksperymentu tylko czystym pokarmem, skażonymi acetamipridem dodanym do pokarmu 7. dnia w ilości 2,5 mg na 100 ml.
3. ImidEx1 – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez 6 dni pokarmem z ekstraktem z korzeni *Cannabis sativa* L., w 7. dniu skażone imidaclopridem w dawce jak wyżej i przez dalsze dwa dni karmione pokarmem z ekstraktem z korzeni *Cannabis sativa* L.

4. ImidEx2 – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez 6 dni pokarmem z ekstraktem z korzeni *Cannabis indica*, w 7. dniu skażone imidaclopridem w dawce jak wyżej i przez dalsze dwa dni karmione pokarmem z ekstraktem z korzeni *Cannabis indica*.

5. ImidEx3 – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez 6 dni pokarmem z ekstraktem z korzeni *Cannabis ruderalis*, w 7. dniu skażone imidaclopridem w dawce jak wyżej i przez dalsze dwa dni karmione pokarmem z ekstraktem z korzeni *Cannabis ruderalis*.

6. AcetEx4 – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez 6 dni pokarmem z ekstraktem z liści *Cannabis ruderalis*, w 7. dniu skażone acetamipridem w dawce jak wyżej i przez dwa dni karmione pokarmem z ekstraktem z liści *Cannabis ruderalis*.

7. ImidEx5 – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez 6 dni pokarmem z ekstraktem z liści *Cannabis indica*, w 7. dniu skażone imidaclopridem w dawce jak wyżej i przez dwa dni dalej karmione pokarmem z ekstraktem z liści *Cannabis indica*.

8. AcetEx6 – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez 6 dni pokarmem z ekstraktem z łodyg *Cannabis indica*, w 7. dniu skażone acetamipridem w dawce jak wyżej i przez dwa dni dalej karmione pokarmem z ekstraktem z łodyg *Cannabis indica*.

9. AcetEx7 – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez 6 dni pokarmem z ekstraktem z łodyg *Cannabis sativa* L., w 7. dniu skażone acetamipridem w dawce jak wyżej i przez dwa dni dalej karmione pokarmem z ekstraktem z łodyg *Cannabis sativa* L.

10. AcetEx8 – 3 klatki ze zdrowymi pszczołami dokarmianymi przez 6 dni pokarmem z ekstraktem z liści *Cannabis sativa* L., w 7. dniu skażone acetamipridem w dawce jak wyżej i przez dwa dni dalej karmione pokarmem z ekstraktem z liści *Cannabis sativa* L.

Przeżywalność pszczół w poszczególnych klatkach w porównaniu do kontroli, przedstawiono w postaci tabeli 1. Najwięcej martwych pszczół notowano z grup Imid i Acet. Średnie arytmetyczne wyliczone z trzech klatek na koniec doświadczenia, wynosiły odpowiednio 4 oraz 8 żywych pszczół, natomiast najmniej martwych pszczół zanotowano dla grupy AcetEx8, gdzie liczba żywych pszczół na koniec doświadczenia wynosiła 16.

Mając na względzie naturalną umieralność pszczół, należy stwierdzić, iż ekstrakty według wynalazku to substancje przedłużające życie pszczół poddanych działaniu nikotynoidów w postaci acetamipridu i imidaclopridu.

P r z y k ł a d 3. Działanie preparatów według wynalazku na zwalczanie nosemozy.

Otrzymane w przykładzie 2, płynne i stałe pokarmy zawierające wyekstrahowane wyciągi z różnych części roślin z rodzaju *Cannabis*, używano w temperaturze pokojowej do karmienia pszczół sztucznie zakażonych *Nosema* spp. W 30 standardowych klatkach umieszczono po 40 pszczół sztucznie zakażonych *Nosema* spp., które dokarmiano przez okres 6 dni tworząc następujące grupy badawcze:

Zakażone – kontrola – 3 klatki pszczoły zakażone zarodnikami *Nosema* spp., karmione czystym syropem cukrowym.

Ex1 – 3 klatki pszczoły zakażone zarodnikami *Nosema* spp., karmione syropem cukrowym z dodatkiem ekstraktu z korzeni *Cannabis sativa* L. w dawce 1×10 j.w. ekstraktu w 1000 j.w. pokarmu.

Ex2 – 3 klatki pszczoły zakażone zarodnikami *Nosema* spp., karmione syropem cukrowym z dodatkiem ekstraktu z liści *Cannabis sativa* L. w dawce 4×10 j.w. ekstraktu w 1000 j.w. pokarmu.

Ex3 – 3 klatki pszczoły zakażone zarodnikami *Nosema* spp., karmione syropem cukrowym z dodatkiem ekstraktu z łodyg *Cannabis sativa* L. w dawce 6×10 j.w. ekstraktu w 1000 j.w. pokarmu.

Ex4 – 3 klatki pszczoły zakażone zarodnikami *Nosema* spp., karmione ciastem cukrowym z dodatkiem ekstraktu z łodyg *Cannabis ruderalis* w dawce 3×10 j.w. ekstraktu w 1000 j.w. pokarmu.

Ex5 – 3 klatki pszczoły zakażone zarodnikami *Nosema* spp., karmione ciastem cukrowym z dodatkiem ekstraktu z liści *Cannabis ruderalis* w dawce 5×10^{-1} j.w. ekstraktu na 1000 j.w. pokarmu.

Ex6 – 3 klatki pszczoły zakażone zarodnikami *Nosema* spp., karmione ciastem cukrowym z dodatkiem ekstraktu z korzenia *Cannabis ruderalis* w dawce 5×10^{-1} j.w. ekstraktu na 1000 j.w. pokarmu.

Ex7 – 3 klatki pszczoły zakażone zarodnikami *Nosema* spp., karmione syropem cukrowym z dodatkiem ekstraktu z łodyg *Cannabis indica* w dawce 3×10 j.w. ekstraktu w 1000 j.w. pokarmu.

Ex8 – 3 klatki pszczoły zakażone zarodnikami *Nosema* spp., karmione syropem cukrowym z dodatkiem ekstraktu z liści *Cannabis indica* w dawce 2×10 j.w. ekstraktu w 1000 j.w. pokarmu.

Ex9 – 3 klatki pszczoły zakażone zarodnikami *Nosema* spp., karmione ciastem cukrowym z dodatkiem ekstraktu z korzeni *Cannabis indica* w dawce 5×10 j.w. ekstraktu w 1000 j.w. pokarmu.

W końcowej fazie, z pszczoł poddawanych eksperymentom, wykonywano standardowe rozciery do sporządzenia preparatów mikroskopowych. Zarodniki liczone w komorze Bürkera obserwowanej w mikroskopie optycznym Olympus BX61 i porównywano z preparatem sporządzonym z rozciery z pszczoł zakażonych, nieleczonych ekstraktami według wynalazku.

W obrazach mikroskopowych zaobserwowano zmniejszoną ilość zarodników *Nosema* spp. wśród pszczoł leczonych ekstraktami według wynalazku w stosunku do kontroli. Podczas gdy w grupie pszczoł kontrolnych, nieleczonych, zakażenie rozwinęło się do poziomu 750 000 zarodników *Nosema* spp./pszczołę, to w grupie pszczoł, którym podawano pokarm z ekstraktami z roślin z rodzaju *Cannabis*, liczba zarodników zmalała do granic do 59 000 zarodników/pszczołę.

Wyniki eksperymentu przedstawiono na wykresie jako fig. 1 oraz w tabeli 2.

Wyniki jednoznacznie wskazują na dużą skuteczność ekstraktu według wynalazku.

P r z y k ł a d 4. Badanie toksyczności ekstraktów według wynalazku na organizmy pszczoł.

W 10 klatkach umieszczono po 40 zdrowych pszczoł i karmiono je pokarmami zawierającymi ekstrakty według wynalazku, odpowiednio:

Ex1 – syrop cukrowy z dodatkiem ekstraktu z korzeni *Cannabis sativa* L.

Ex2 – syrop cukrowy z dodatkiem ekstraktu z liści *Cannabis sativa* L.

Ex3 – ciasto cukrowe z dodatkiem ekstraktu z łodyg *Cannabis sativa* L.

Ex4 – syrop cukrowy z dodatkiem ekstraktu z liści *Cannabis ruderalis*

Ex5 – ciasto z dodatkiem ekstraktu z łodyg *Cannabis ruderalis*

Ex6 – ciasto z dodatkiem ekstraktu z korzeni *Cannabis ruderalis*

Ex7 – syrop cukrowy z dodatkiem ekstraktu z łodyg *Cannabis indica*

Ex8 – syrop cukrowy z dodatkiem ekstraktu z liści *Cannabis indica*

Ex9 – ciasto z dodatkiem ekstraktu z korzeni *Cannabis indica*

Dla porównania analogiczną liczbę pszczoł umieszczono w jednej klatce jako kontrolę i karmiono czystym pokarmem. Po 15. dniach porównano liczbę żywych pszczoł w poszczególnych klatkach z kontrolą. Liczba pszczoł w grupach badawczych wynosiła od 12 do 18 sztuk, natomiast liczba żywych pszczoł w kontroli wynosiła 11 sztuk.

Przeżywalność pszczoł w poszczególnych klatkach w porównaniu do kontroli, przedstawiono w tabeli 3.

Jak wykazano w przykładach, mając na względzie naturalną umieralność pszczoł, ekstrakt według wynalazku, to substancja nietoksyczna, przedłużająca życie pszczoł narażonych na insektycydy oraz wykazująca wysoki poziom terapeutyczny zakażeń pszczoł miodnych grzybami *Nosema* spp.

Zastrzeżenia patentowe

1. Wodny ekstrakt z roślin z rodzaju *Cannabis*, takich jak, *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* czy też *Cannabis ruderalis* do zastosowania w preparatach zabezpieczających pszczoły przed szkodliwym działaniem insektycydów z grupy neonikotynoidów i zwalczających nosemozę.
2. Wodny ekstrakt według zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że sporządzany jest z korzeni, łodyg czy też liści roślin należących do rodzaju *Cannabis*.
3. Wodny ekstrakt według zastrzeżenia 1 i 2, **znamienny tym**, że sporządzany jest przy pomocy wody o temperaturze utrzymującej się w zakresie od 98 do 99°C, przez co najmniej 10 minut.

Rysunki

Tabela 1.

Grupa badawcza określona w przykł. 2.	Liczba pszczół (średnia z 3 klatek)	
	Na początku eksperymentu	Żywych po zakończeniu podawania pokarmu z ekstraktem
Imid - kontrola	40	4
Acet - kontrola	40	8
ImidEx1	40	9
ImidEx2	40	9
AcetEx3	40	10
AcetEx4	40	12
ImidEx5	40	9
AcetEx6	40	13
AcetEx7	40	14
AcetEx8	40	16

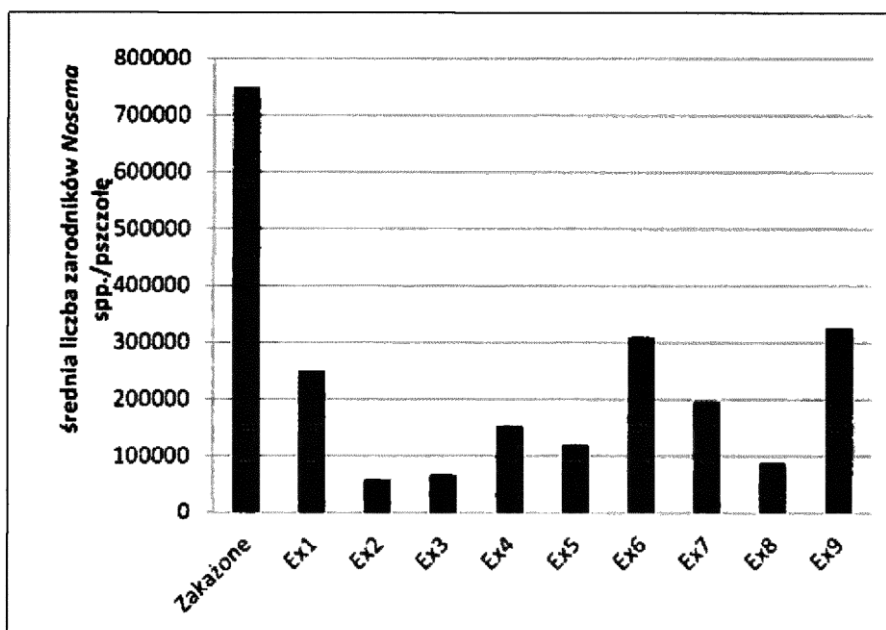


Fig.1

Tabela 2.

Grupa badawcza pszczół zakażonych <i>Nosema spp.</i> określona w przykł. 3.	Liczba pszczół (średnia z 3 klatek)	
	Na początku eksperymentu	Żywych po zakończeniu podawania pokarmu z określonym ekstraktem
zakażone - karmione czystym pokarmem	40	15
zakEx1	40	17
zakEx2	40	29
zakEx3	40	23
zakEx4	40	27
zakEx5	40	25
zakEx6	40	20
zakEx7	40	23
zakEx8	40	26
zakEx9	40	19

Tabela 3.

Grupa badawcza pszczół zdrowych określona w przykł. 4.	Liczba pszczół	
	Na początku eksperymentu	Żywych po zakończ. podawania pokarmu z ekstraktem
Kontrola (czysty pokarm)	40	11
Ex1	40	12
Ex2	40	18
Ex3	40	13
Ex4	40	15
Ex5	40	14
Ex6	40	12
Ex7	40	14
Ex8	40	16
Ex9	40	12