

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **233794**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423363**

(22) Data zgłoszenia: **06.11.2017**

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61K 35/64 (2015.01)

(54) **Szczepy bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Fructobacillus* wyizolowane z przewodu pokarmowego pszczół miodnych do zastosowania w zwalczaniu i zapobieganiu chorób pszczół oraz preparaty probiotyczne na bazie takich szczepów bakterii**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

20.05.2019 BUP 11/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

29.11.2019 WUP 11/19

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet

Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, PL

Biowet Puławy Spółka z ograniczoną odpowiedzialnością, Puławy, PL

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Lublin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

Aneta Ptasińska, Świdnik, PL

Wanda Małek, Lublin, PL

Mirosław Grzęda, Puławy, PL

Magdalena Wicha, Puławy, PL

Artur Pachla, Hrubieszów, PL

Grzegorz Borsuk, Prawiedniki, PL

PL 233794 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus kunkeei*, takie jak: *L. kunkeei* CH1, *L. kunkeei* CH2, *L. kunkeei* CH3, *L. kunkeei* Z1, *L. kunkeei* Z3, *L. kunkeei* Z5, *L. kunkeei* III1, *L. kunkeei* VI1, *L. kunkeei* VI3, *L. kunkeei* VI4, *L. kunkeei* VI6, *L. kunkeei* VII4 oraz z gatunku *Fructobacillus fructosus*, takie jak: *F. fructosus* V5 i *F. fructosus* VIII1, wyizolowane z przewodu pokarmowego pszczoł, zidentyfikowane, oznaczone i zdeponowane w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, pod numerami: *L. kunkeei* CH1 – B/00125; *L. kunkeei* – CH2 B/00126; *L. kunkeei* CH3 – B/00127; *L. kunkeei* Z1 – B/00128; *L. kunkeei* Z3 – B/00129; *L. kunkeei* Z5 – B/00130; *L. kunkeei* III1 – B/00131; *L. kunkeei* VI1 – B/00132; *L. kunkeei* VI3 – B/00133; *L. kunkeei* VI4 – B/00134; *L. kunkeei* VI6 – B/00135; *L. kunkeei* VII4 – B/00136; *F. fructosus* VIII1 – B/00137 oraz *F. fructosus* V5 – B/00138, znajdujące zastosowanie w zwalczaniu i zapobieganiu chorób pszczoł miodnych, a także poprawiające odporność pszczoł i wydłużające okres ich życia.

Przedmiotem wynalazku są również preparaty probiotyczne na bazie tych wyżej wymienionych, szczepów bakterii, dodawane do pokarmów pszczelich, korzystnie w postaci liofilizatów z dodatkiem substancji utrwalających, i osłaniaczy zwiększających trwałość preparatu.

Dotychczas, w leczeniu zakażeń grzybowych pszczoł, takich jak nosemoza, stosuje się leki na bazie fumagiliny, substancji wyizolowanej z grzyba *Aspergillus fumigatus*, której działanie polega, jak ujawniono w opisie patentowym KR20140017291, jedynie na hamowaniu aktywności enzymu aminopeptydazy mationinowej MetAP-2, bez niszczenia zarodników *Nosema* spp., co w konsekwencji prowadzi do rozwijania się oporności grzyba na ten antybiotyk. Innym preparatem, stosowanym do leczenia mikrosporydioz, a zwłaszcza nosemozy, znanym ze zgłoszenia patentowego P.408774, jest preparat zawierający jedną z rozproszonych homogenicznie, amidowych pochodnych protoporfiryny. Z uwagi na fakt, iż miód i inne produkty pszczele wykorzystywane są przez człowieka jako produkty żywnościowe, lecznicze czy suplementy diety, leczenie pszczoł powinno opierać się na dobrze poznanych, bezpiecznych preparatach, łatwo degradowalnych, które nie powodują zmian genetycznych w organizmach pszczoł. W zwalczaniu nosemozy i poprawy odporności pszczoł stosowane są również mieszanki ziołowe, jak np. wyciąg z kory dębu, czy też preparaty roślinne jak np. preparat opisany w zgłoszeniu patentowym P.415155. Jednakże, jak wykazuje praktyka, nadal odczuwalny jest brak preparatów naturalnych o szerokim spektrum działania, które będą pomocne jednocześnie w zapobieganiu oraz zwalczaniu mikrosporydioz i chorób bakteryjnych u pszczoł. Inny sposób zapobiegania i zwalczania nosemozy, znany z opisu patentowego MX2011011839, polega na wyciszaniu wybranych genów *Nosema* spp., metodą przebiegającą z zastosowaniem konstruktywów genetycznych lub cząsteczek kwasów nukleinowych – dsRNAs, np. siRNAs, miRNAs i shRNAs funkcjonalnie związanych z białkami penetrującymi komórkę. Tego typu kontrowersyjne praktyki są metodami nie zawsze akceptowanymi wśród pszczelarzy.

Prawodawstwo Unii Europejskiej zakazuje stosowania antybiotyków do leczenia chorób pszczoł z powodu możliwości rozwinięcia się oporności na używane środki chemioterapeutyczne, nawrotów choroby i szkodliwego działania pozostałości antybiotyków lub ich metabolitów w produktach pszczelich. Czynniki te wpłynęły na konieczność stosowania w profilaktyce i leczeniu chorób pszczelich preparatów probiotycznych zawierających mikroorganizmy, wśród których dominującą rolę spełniają bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, bezpieczne i powszechnie stosowane dla ludzi i zwierząt.

Tego typu preparaty zawierające ogólnodostępne mikroorganizmy znane są z szeregu opisów patentowych, jak np. RU2166322 i RU2008100115, ale nie gwarantują one dostatecznej skuteczności zwalczania nosemozy u pszczoł, podobnie jak preparaty ujawnione w opisie patentowym WO2016135655, zawierające bakterie *Lactobacillus buchneri* oraz inne mikroorganizmy należące do co najmniej jednego gatunku wybranego z grupy *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* czy *Lactobacillus plantarum*. Z kolei w opisie patentowym EP2914754 ujawniono preparat używany do produkcji pyłku pszczelego zawierający bakterie *Lactobacillus delbrueckii* izolowane z pyłku. Preparat ten jednak nie wpływa bezpośrednio na zdrowotność rodzin pszczelich. Z opisu patentowego KR20130101370 znany jest preparat zawierający szczepy bakterii *Lactobacillus plantarum* YML001, *Lactobacillus plantarum* YML004 i *Leuconostoc citreum* KM20W oraz pyłki, sacharydy, drożdże, odtłuszczone mleko w proszku i kazeinę jako ciasto pyłkowe, mający na celu dostarczenie składników odżywczych dla pszczoł i zwiększenie ich odporności na pasożytnicze owady. Preparat ten nie wpływa na grzyby pasożytnicze porażające pszczoły.

Z kolejnych opisów patentowych takich jak, KR20130005052, KR20100125747, KR830001681 czy KR830001681, znane są preparaty zawierające bakterie *Lactobacillus* spp., takie jak: *L. leuteri*,

L. buchneri, *L. bifidobacterium*, *L. buchneri* lub *L. plantarum*, *L. acidophilus*, mające na celu zapobieganie i leczenie chorób grzybicy otorbielakowej oraz zgnilca złośliwego i zwiększenie masy pszczoły miodnej. Jednakże, nie udowodniono, aby preparaty te poprawiały kondycję pszczół ani wpływały bójczo na grzyby pasożytnicze z rodzaju *Nosema* czy też bakterie z rodzaju *Paenibacillus* porażające pszczoły.

Z opisu patentowego CN102670664 znany jest preparat zawierający tzw. korzystne mikroorganizmy jednego gatunku bakterii lub będące kombinacją następujących gatunków: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus plantarum*, mający na celu zapobieganie i kontrolę chorób grzybowych pszczół oraz jedwabników.

Z opisu patentowego BG108067, znany jest preparat zawierający różne rodzaje mąki oraz bakterie *Lactobacillus bulgaricus thermophilus*. Inne opisy jak np., WO2010146405, DE4215534 podają składy preparatów z udziałem bakterii kwasu mlekowego. Wymienione preparaty nie wpływają na grzyby pasożytnicze z rodzaju *Nosema* porażające pszczoły, zawierają ogólnodostępne mikroorganizmy, jak szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, które nie są charakterystyczne dla pszczół, ani nie zostały wyizolowane z pszczół. Taki stan rzeczy, może niekiedy zaburzać funkcjonowanie organizmu pszczół, powodować przyspieszenie rozwoju nosemozy i w konsekwencji zwiększać ich śmiertelność, co wykazano w publikacjach Whitten i Coates, *Re-evaluation of insect melanogenesis research: Views from the dark side*, Pigment Cell Melanoma Res., 2017, (1–16) oraz Ptaszyńska i in., *Parasitology Research*, 115(1), 2016, (397–406). Znane preparaty rynkowe, stosowane do wzmocnienia systemu immunologicznego pszczół i stosowane dotychczas przez pszczelarzy, sporządzane są na bazie żywych kultur bakterii kwasu mlekowego, drożdży, promieniowców czy wyciągów roślinnych.

Jeden z takich preparatów, zawiera oprócz mikroelementów, wyciągów ziołowych i melasy z trzciny cukrowej, szczepy *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* i *Saccharomyces cerevisiae*, wytwarzające enzymy wpływające skutecznie na trwałości miodu i pierzgi, a zawarte w nim związki bakteriobójcze służą do bioasekuracji pasiek, poprawiając warunki sanitarne w ulu oraz w całej pasiece.

Inne znane na rynku preparaty probiotyczne, zawierają w swoim składzie *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus casei* i *Lactobacillus plantarum*, czy też preparat odżywczo witaminowy zawierający w składzie *Lactobacillus acidophilus* i *Streptococcus faecium*. Są to specyfiki zawierające ogólnodostępne bakterie, które nie zostały wyizolowane z pszczół, toteż w niedostatecznym stopniu ograniczają rozprzestrzenianie się takich groźnych chorób jak nosemoza czy warroza, a jako żywe organizmy, wykazują dużą wrażliwość na wodę chlorowaną, chemiczne środki ochrony roślin, nawozy sztuczne, detergenty, środki dezynfekcyjne czy też silne nasłonecznienie.

Z opisu patentowego z US2016081309 znany jest preparat dla pszczół zawierający bakterie z rodzaju *Fructobacillus*. Bakterie te to mutanty wyizolowane z kwiatów i owoców, odporne na niektóre antybiotyki np. tetracyklinę, co powinno wykluczać ich wykorzystywanie w leczeniu pszczół.

W znanym stanie techniki nie są znane żadne preparaty otrzymywane z bakterii probiotycznych wyizolowanych z przewodu pokarmowego pszczół miodnych i dedykowane dla pszczół.

Jak dotychczas walka pszczelarzy i naukowców z chorobami pszczół spowodowanymi najczęściej grzybami z rodzaju *Nosema* oraz bakteriami *Paenibacillus larvae* wywołującymi zgnilec złośliwy, nie dała spodziewanych rezultatów.

Celem wynalazku było opracowanie preparatu skutecznie zwalczającego najczęściej występujące choroby u pszczół miodnych, spowodowane grzybami pasożytniczymi zwłaszcza z rodzaju *Nosema* czy bójczymi bakteriami jak np., *Paenibacillus larvae* wywołującymi zgnilec złośliwy, poprawiającego kondycję pszczół, bezpiecznego i łatwo degradowalnego, nie powodującego skutków ubocznych u pszczół miodnych jak i ich produktów.

Nieoczekiwanie okazało się, że z przewodu pokarmowego pszczół wyizolowano grupę nowych szczepów bakterii z rodzajów *Lactobacillus* i *Fructobacillus*, dedykowanych w szczególności pszczołom i znajdujących zastosowanie do skutecznego zapobiegania i zwalczania najczęściej spotykanych chorób pszczół miodnych oraz wzmacniania ich kondycji zdrowotnej, a w konsekwencji zwiększające długość ich życia.

Istotą wynalazku są nowe szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus kunkeei* oraz z gatunku *Fructobacillus fructosus*, wyizolowane z przewodu pokarmowego pszczół miodnych, takie jak: *Lactobacillus kunkeei* CH1, *Lactobacillus kunkeei* CH2, *Lactobacillus kunkeei* CH3, *Lactobacillus kunkeei* Z1, *Lactobacillus kunkeei* Z3, *Lactobacillus kunkeei* Z5, *Lactobacillus kunkeei* III1, *Lactobacillus kunkeei* VI1, *Lactobacillus kunkeei* VI3, *Lactobacillus kunkeei* VI4, *Lactobacillus kunkeei* VI6, *Lactobacillus kunkeei*

VII4 oraz *Fructobacillus fructosus* V5 i *Fructobacillus fructosus* VIII1, zdeponowane w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, pod numerami: *Lactobacillus kunkeei* CH1 – B/00125; *Lactobacillus kunkeei* – CH2 B/00126; *Lactobacillus kunkeei* CH3 – B/00127; *Lactobacillus kunkeei* Z1 – B/00128; *Lactobacillus kunkeei* Z3 – B/00129; *Lactobacillus kunkeei* Z5 – B/00130; *Lactobacillus kunkeei* III1 – B/00131; *Lactobacillus kunkeei* VI1 – B/00132; *Lactobacillus kunkeei* VI3 – B/00133; *Lactobacillus kunkeei* VI4 – B/00134; *Lactobacillus kunkeei* VI6- B/00135; *Lactobacillus kunkeei* VII4 – B/00136; *Fructobacillus fructosus* VIII1 – B/00137 oraz *Fructobacillus fructosus* V5 – B/00138.

Istotą wynalazku są wymienione wyżej szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus kunkeei* oraz z gatunku *Fructobacillus fructosus*, do zastosowania w zwalczaniu i zapobieganiu chorób pszczoł miodnych, spowodowanych grzybami pasożytniczymi i bójczymi bakteriami, a także we wzmocnieniu odporności i kondycji zdrowotnej pszczoł miodnych.

Istotą wynalazku są również preparaty na bazie tych nowo wyizolowanych szczepów bakterii probiotycznych, dodawanych pojedynczo lub w dowolnym zestawie, do pokarmów pszczelich, korzystnie w postaci liofilizatów.

Korzystnym jest również, jeśli preparat posiada w swoim składzie znane substancje utrwalające i osłaniacze, zwiększające trwałość preparatu, takie jak: krio-, lipo- lub osmo-protektanty: laktoza, sacharoza, trehaloza; środki zwiększające objętość jak np. laktoalbumina, surowicza albumina wołowa (BSA), odtłuszczone mleko w proszku, glikol polietylenowy (PEG), dekstran lub żelatyna; polisorbaty jako stabilizatory; składniki buforujące: układ buforu PBS, buforu fosforanowego; a w przypadku braku układu buforującego woda; substancje pomocnicze: glicerol, laktuloza czy glutaminian potasu. Korzystnym jest również, jeśli w 1 ml preparatu według wynalazku zawarte jest od 1×10^3 do 1×10^{11} żywych bakterii.

Jak wykazano w przykładach, preparaty probiotyczne według wynalazku wykazują dużą skuteczność w zapobieganiu i zwalczaniu zakażeń grzybami takimi jak, *Nosema apis* czy *Nosema ceranae*, a także bakteriami patogenicznymi *Paenibacillus larvae*, wywołującymi zgnilca złośliwego w rodzinach pszczoł miodnych. Wykazano również hamujące działanie nowo wyizolowanych szczepów na rozwój bakterii takich jak, *Escherichia coli* powodujących zwiększoną śmiertelność larw pszczelich i osobników dorosłych, *Raoultella ornithinolytica* wywołujących dysfunkcję układu pokarmowego oraz *Klebsiella pneumoniae* uszkadzające układ oddechowy, przez co następuje wzmocnienie odporności i kondycji zdrowotnej pszczoł i wydłużenie okresu ich przeżycia.

Nowo wyizolowane z pszczoł bakterie probiotyczne są dedykowane pszczołom, a ich właściwości związane ze źródłem ich pochodzenia, w naturalny sposób zabezpieczają jelito pszczele, a tym samym chronią przed patogenami.

Wynalazek przedstawiono w poniższych przykładach wykonania

P r z y k ł a d 1. Sposoby izolacji i oznaczania nowych szczepów bakterii według wynalazku

Z pszczoł miodnych *Apis mellifera* wypreparowano przewody pokarmowe, a następnie treść jelita wysiewano na podłoża mikrobiologiczne. Bakterie z grupy mlekowych, namnażano na różnych podłożach dedykowanych hodowli bakterii mlekowych, takich jak: podłoże MRS o składzie: glukoza 20 g/l; ekstrakt drożdżowy 4 g/l; ekstrakt mięsny 8 g/l; pepton K 10 g/l; cytrynian triamonu 2 g/l; wodorofosforan (V) dipotasu 2 g/l; octan sodu 5 g/l; siarczan magnezu $x7H_2O$ 0,2 g/l, siarczan manganu (II) $x4H_2O$ 0,05 g/l oraz Tween 80 1 ml/l, podłoże MRS z dodatkiem fruktozy w zakresie 1–300 g/l, a także podłoża FYP o składzie: D – fruktoza 10 g/l; ekstrakt drożdżowy 10 g/l; polypepton 5 g/l; octan sodu 2 g/l; siarczan magnezu $x7H_2O$ 0,2 g/l; siarczan manganu (II) $x4H_2O$ 0,01 g/l; siarczan żelaza (II) $x7H_2O$ 0,01 g/l; chlorek sodu 0,01 g/l oraz Tween 80 0,46 ml/l, wzbogacane dodatkami fruktozy w ilości 1–300 g/l; a drugie – dodatkiem glukozy w ilości 1–200 g/l. Kolejnym podłożem, na którym prowadzono hodowle było podłoże GYP o składzie takim samym jak podłoże FYP, z tym że zamiast fruktozy występuje glukoza w zakresie 1–200 g/l, podłoże GYP z dodatkiem fruktozy w zakresie 1–300 g/l oraz podłoże GYP z dodatkiem fruktozy w zakresie 1–300 g/l i pirogronianem. Hodowle bakteryjne, prowadzone były w warunkach beztlenowych i tlenowych, w temperaturze mieszczącej się w zakresie od 10 do 42°C. Po dokonaniu wstępnej selekcji, wybrano kolonie bakteryjne o najwyższym stopniu wzrostu i ponownie przesiano je na wyżej wymienione stałe podłoża mikrobiologiczne. Tak wyrosłe z jednej komórki bakteryjnej czyste kultury szczepów, ponownie namnożono na wymienionych wyżej podłożach, po czym zagęszczono poprzez odwirowanie, a osad podzielono na dwie części.

Z jednej części osadu, znanymi metodami, wyizolowano DNA, a następnie w reakcji PCR, powielono fragment DNA wybranych szczepów za pomocą znanych starterów 27F i 1507R o sekwencjach

przedstawionych w wykazie. W ten sposób powielono fragment genu 16S rRNA, który posłużył do klasyfikacji wyizolowanych szczepów do poszczególnych rodzajów i gatunków bakterii. Powielone fragmenty DNA, otrzymane z nowych szczepów bakteryjnych, zsekwencjonowano i porównano ze znanymi sekwencjami umieszczonymi w genetycznej bazie danych NCBI, co pozwoliło na sklasyfikowanie wyizolowanych nowych szczepów bakterii do gatunków *Lactobacillus kunkeei* i *Fructobacillus fructosus*.

Z gatunku *Lactobacillus kunkeei*, wyizolowano 12 szczepów takich jak: *L. kunkeei* CH1, *L. kunkeei* CH2, *L. kunkeei* CH3, *L. kunkeei* Z1, *L. kunkeei* Z3, *L. kunkeei* Z5, *L. kunkeei* III1, *L. kunkeei* VI1, *L. kunkeei* VI3, *L. kunkeei* VI4, *L. kunkeei* VI6, *L. kunkeei* VII4 oraz z gatunku *Fructobacillus fructosus*, taki e jak: *F. fructosus* V5 i *F. fructosus* VIII1.

Sekwencje nowych szczepów zostały umieszczone w genetycznej bazie danych NCBI pod numerami: *L. kunkeei* VI3 – MF461307; *L. kunkeei* III1 – MF461308; *L. kunkeei* VI1 – MF461309; *L. kunkeei* CH1 – MF461310; *L. kunkeei* VI4 – MF461311; *L. kunkeei* CH2 – MF461312; *L. kunkeei* Z1 – MF461313; *L. kunkeei* Z5 – MF461314; *L. kunkeei* Z3 – MF461315; *L. kunkeei* CH3 – MF461316; *L. kunkeei* VII4 – MF461317; *L. kunkeei* VI6 – MF461318; *F. fructosus* VIII1 – MF461319 oraz *F. fructosus* V5 – MF461320.

Druga część rozdzielonego osadu, posłużyła do założenia czystych hodowli nowych szczepów bakteryjnych, ich namnożenia, a po usunięciu podłoża hodowlanego otrzymane koncentraty, zliofilizowano i używano do sporządzania preparatów probiotycznych dla pszczoł.

P r z y k ł a d 2. Preparaty na bazie nowo wyizolowanych szczepów bakterii probiotycznych według wynalazku

Wyizolowane i oznaczone według przykładu 1, poszczególne hodowle szczepów bakterii, *L. kunkeei*, takie jak: CH1, CH2, CH3, Z1, Z3, Z5, III1, VI1, VI3, VI4, VI6, VII4 oraz szczepy *F. fructosus*, V5, i VIII1, rozlewano pojedynczo do fiolek i liofilizowano, doprowadzając do liczby bakterii od 1×10^3 do 1×10^{11} /ml.

Tak przygotowane fiołki stanowiły gotowe składniki do mieszania w czystej postaci z pokarmem pszczelim w postaci syropu cukrowego, ciasta pszczelego i innych, lub w postaci mieszanin wybranych szczepów, przy czym wymienione preparaty, korzystnie, dla zwiększenia trwałości preparatu w przypadku jego masowej produkcji, wzbogacano o znane substancje osłaniające i utrwalające. Dla przeprowadzenia dalszych badań opisanych w kolejnych przykładach, sporządzono preparat według wynalazku, pod nazwą preparat 1, zawierający szczep CH1 *L. kunkeei* o łącznej zawartości 1×10^{11} bakterii w 1 ml preparatu.

Kolejny preparat probiotyczny, pod nazwą preparat 2, sporządzono ze szczepu CH1 *L. kunkeei* w liczbie 1×10^3 bakterii w 1 ml preparatu; do bakterii dodano osłaniacz o następującym składzie: laktoza 10 g/l; laktoalbumina 10 g/l; glutaminian potasu 10 g/l; NaCl 3,4 g/l; KCl 0,2 g/l; Na_2HPO_4 27,87 g/l; KH_2PO_4 19,52 g/l i żelatyna 5 g/l.

Następny preparat pod nazwą preparat 3, sporządzono ze szczepu VIII1 *F. fructosus* w łącznej liczbie 1×10^4 bakterii w 1 ml preparatu, do których dodano osłaniacz o następującym składzie: sacharoza 10 g/l; surowicza albumina wołowa (BSA) 5 g/l; laktoalbumina 5 g/l; glutaminian potasu 10 g/l; glicerol 1,7 g/l; laktuloza 0,1 g/l; NaCl 1,7 g/l; KCl 0,1 g/l; Na_2HPO_4 27,87 g/l; KH_2PO_4 19,52 g/l i żelatyna 5 g/l.

Kolejny preparat pod nazwą preparat 4, sporządzono ze szczepów *L. kunkeei*: CH1, CH2, CH3, Z1, Z3, Z5, III1, VI1, VI3, VI4, VI6 oraz VII4, w łącznej liczbie 1×10^5 bakterii w 1 ml preparatu. Następny preparat pod nazwą preparat 5, sporządzono ze szczepów *L. kunkeei*: Z3, Z5, III1 i VIII1 w łącznej liczbie 1×10^6 bakterii w 1 ml preparatu, do których dodano osłaniacz zawierający w swoim składzie: trehalozę 10 g/l; odtłuszczone mleko w proszku 4 g/l; dekstran 3 g/l; laktoalbuminę 3 g/l; glutaminian potasu 10 g/l; glicerol 1,7 g/l; NaCl 1,7 g/l; KCl 0,2 g/l; Na_2HPO_4 27,87 g/l; KH_2PO_4 19,52 g/l i żelatynę 5 g/l. Inny preparat pod nazwą preparat 6, sporządzono ze szczepów *L. kunkeei* VI3 i VI6 o łącznej liczbie 1×10^7 bakterii w 1 ml preparatu. Inny preparat, pod nazwą preparat 7, sporządzono ze szczepów *F. fructosus* V5 i VIII1 w łącznej liczbie 1×10^8 bakterii w 1 ml preparatu, a kolejny, pod nazwą preparat 8, sporządzono ze szczepów *L. kunkeei*: CH1, CH2, CH3, Z1, Z3, Z5, III1, VI1, VI3, VI4, VI6, VII4 oraz szczepów *F. fructosus* V5 i VIII1, w łącznej liczbie 1×10^9 bakterii w 1 ml preparatu, do których dodano osłaniacz zawierający w swoim składzie: trehalozę 10 g/l; glikol polietylenowy (PEG) 5 g/l; laktoalbuminę 5 g/l; polisorbaty 10 g/l; NaCl 3,4 g/l; KCl 0,2 g/l; Na_2HPO_4 27,87 g/l; KH_2PO_4 19,52 g/l oraz żelatynę 5 g/l.

P r z y k ł a d 3. Badanie tolerancji przewodu pokarmowego pszczół na preparaty probiotyczne według wynalazku

Do eksperymentu przygotowano po 6 klatek, w których umieszczono po 40 zdrowych pszczół, dla każdego z badanych preparatów otrzymanych w punkcie 2 oraz 6 klatek, w których również umieszczono po 40 zdrowych pszczół, traktowanych jako grupa kontrolna eksperymentu. Z poszczególnych klatek wybrano po 5 zdrowych pszczół, wypreparowano ich jelita, zważono i przeniesiono do jałowych probówek. Treść jelit wysiano na podłoża mikrobiologiczne MRS, które inkubowano w atmosferze 5% CO₂, w ciągu 72 godz. i temp. 30°C. Następnie policzono kolonie bakteryjne w odniesieniu do 1 mg zawartości jelita.

Grupę kontrolną, karmiono czystym 35% syropem cukrowym zaś w pozostałych grupach eksperymentalnych pszczoły dokarmiano przez 7 dni różnymi pokarmami pszczelimi z dodatkiem preparatów ze szczepami bakteryjnymi, otrzymanymi w przykładzie 2. Preparaty oznaczone jako 1 i 5, dodawano do 35% syropu cukrowego, preparaty 2 i 3 do ciasta pszczelego, a preparaty 4, 6 i 8 do cukru inwertowanego, zaś preparat 7 do melasy.

Po 7 dniowym okresie karmienia, ponownie wybrano po 5 pszczół z każdej klatki, wypreparowano ich jelita, zważono i analogicznie jak poprzednio, określono liczbę bakterii w odniesieniu na 1 mg zawartości jelita.

Po 14-dniowym okresie kwarantanny wybrano po 5 pszczół z każdej klatki, wypreparowano ich jelita, zważono i określono liczbę bakterii w odniesieniu na 1 mg zawartości jelita.

Wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Średnio, zawartość bakterii w jelitach pszczół zarówno z rodzaju *Lactobacillus*, jak i *Fructobacillus*, w trakcie karmienia preparatami według wynalazku uległa w naturalny sposób powiększeniu, jednakże po 14-dniowym okresie kwarantanny, wróciła do poziomu, jaki oznaczono przed rozpoczęciem eksperymentu. To dowodzi, że karmienie pszczół preparatami według wynalazku jest w pełni tolerowane przez przewód pokarmowy pszczół.

P r z y k ł a d 4. Wpływ preparatów według wynalazku na patogeny z rodzaju *Nosema*

a) zwalczanie nosemozy

Dla każdego z preparatów określonych w przykładzie 2, oraz dla grupy kontrolnej, przygotowano po 6 standardowych klatek, w których umieszczono po 40 zdrowych pszczół. Pszczoły sztucznie zakażono *Nosema* spp. i następnie karmiono przez 6 dni pokarmami z domieszką preparatów probiotycznych określonych w przykładzie 2.

Kontrolę stanowiły pszczoły zakażone, karmione czystym 35% syropem cukrowym.

b) zapobieganie nosemozie

Dla każdego z preparatów określonych w przykładzie 2, oraz dla grupy kontrolnej przygotowano po 6 standardowych klatek, w których umieszczono po 40 zdrowych pszczół, które karmiono przez 6 dni pokarmami z domieszką preparatów probiotycznych określonych w przykładzie 2. Następnie pszczoły sztucznie zakażono *Nosema* spp. Kontrolę stanowiły pszczoły zakażone, karmione czystym 35% syropem cukrowym.

Preparaty nr 1 i 5 dodawano do 35% syropu cukrowego, preparaty 2 i 3 dodawane były do ciasta miodowo-cukrowego, zaś preparaty 4, 6 i 8 do cukru inwertowanego, a preparat 7 do melasy.

W końcowej fazie, z 10 pszczół stanowiących kontrolę oraz karmionych poszczególnymi preparatami probiotycznymi, wykonywano standardowe rozciery w dwóch powtórzeniach, dla sporządzenia preparatów mikroskopowych. Zarodniki liczono w komorze Bürkera obserwowanej w mikroskopie optycznym Olympus BX61 i porównywano z preparatem kontrolnym, sporządzonym z rozciery pszczół zakażonych, karmionych czystym pokarmem. Podczas gdy w grupie pszczół kontrolnych, zakażenie rozwinęło się w zakresie 7,2 mln – 10,1 mln zarodników *Nosema* spp./pszczołę, to w przypadku pszczół karmionych preparatami, liczba zarodników zmalała do granic do 0,1–0,2 mln zarodników/pszczołę.

Na uwagę zasługuje również fakt, że dodatek osłaniacza do preparatu probiotycznego, polepszający żywotność bakterii po liofilizacji, w pewnym stopniu wpływa korzystnie na zredukowanie liczby zarodników *Nosema* spp.. Wpływ preparatów według wynalazku na zwalczanie patogenów z rodzaju *Nosema*, w postaci spadku liczby ich chorobotwórczych zarodników w stosunku do kontroli, przedstawiono graficznie na rysunku jako fig. 1.

Dla wykazania zwiększenia odporności pszczół dokarmianych preparatami probiotycznymi według wynalazku i wydłużenia okresu ich przeżycia, na koniec eksperymentu liczono liczbę pszczół żywych w poszczególnych klatkach.

W hodowlach kontrolnych, w których pszczołom zakażonym zarodnikami *Nosema* spp, podawano jedynie czysty syrop cukrowy, przeżywało średnio 10 z 40 sztuk pszczoł, natomiast w hodowlach karmionych preparatami określonymi w przykładzie 2, jako preparat 1–27 pszczoł, preparat 2–2,3 pszczoły; preparat 3–16 pszczoł; preparat 4–23 pszczoły; preparatu 5–26 pszczoł; preparatu 6–16 pszczoł, preparat 7–23 pszczoły, a w przypadku preparatu 8–24 pszczoły.

Wraz ze wzrostem liczby zakażonych pszczoł żywych, malała ich śmiertelność, co zobrazowano w sposób graficzny na rysunku, jako fig. 2.

P r z y k ł a d 5. Bójcze działanie preparatów według wynalazku na bakterie *Paenibacillus larvae*, *Escherichia coli*, *Raoultella Ornithinolytica* i *Klebsiella pneumoniae*

Na znanych i dedykowanych podłożach stałych prowadzono 24-godzinna, wgłębną hodowlę szczepów *L. kunkeei* CH1, CH2, CH3, Z1, Z3, Z5, III1, VI1, VI3, VI4, VI6, VII4 oraz *F. fructosus* V5, VIII1, po czym z każdej hodowli wycięto krążki, umieszczając je pojedynczo w otworkach na płytkach z posianymi wgłębnie, na znanych i dedykowanych podłożach stałych, szczepami *Paenibacillus larvae*, *Escherichia coli*, *Raoultella ornithinolytica* i *Klebsiella pneumoniae*. Hodowle bakteryjne inkubowano przez 24 h w temperaturze 35°C, po czym zmierzono strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów jako odległość od brzegu krążka do końca strefy zahamowania wzrostu.

Wyniki wielkości stref zahamowania wzrostu poszczególnych bakterii chorobotwórczych wskutek bójczego oddziaływania preparatów zawierających szczepy bakterii według wynalazku, wyrażone w mm, zamieszczono na rysunku jako tabela 2.

Wśród zamieszczonych wyników pomiarów, największą strefą zahamowania wzrostu poszczególnych bakterii, w stosunku do zerowej wartości strefy dla kontroli (płytki z bakteriami, na które nie działano preparatami według wynalazku), wyróżniają się bakterie *Paenibacillus larvae*, będące jednym z głównych patogenów chorobotwórczych pszczoł miodnych – zgnilca amerykańskiego.

P r z y k ł a d 6. Badanie toksyczności preparatów według wynalazku na organizmy pszczoł

Do eksperymentu przygotowano po 6 klatek, w których umieszczono po 40 zdrowych pszczoł, dla każdego z badanych preparatów otrzymanych w punkcie 2 oraz 6 klatek, w których również umieszczono po 40 zdrowych pszczoł, traktowanych jako grupa kontrolna eksperymentu. Grupę kontrolną, stanowiły pszczoły karmione czystym 35% syropem cukrowym, zaś pozostałe pszczoły dokarmiano pokarmami pszczelimi z dodatkiem preparatów określonych w przykładzie 2. Preparaty 1 i 5 dodawane były do 35% syropu cukrowego, preparatu 2 i 3 do ciasta pszczelego, zaś preparaty 4, 6 i 8 do cukru inwertowanego, a preparat 7 do melasy. Po 21 dniach policzono i porównano liczbę martwych pszczoł w poszczególnych klatkach hodowlanych z kontrolą. Liczba martwych pszczoł w kontroli wynosiła 193 sztuki, zaś w klatkach gdzie pszczoły dokarmiano preparatami według wynalazku kształtowała się od 115 do 169 sztuk.

Liczby obrazujące przeżywalność pszczoł w poszczególnych klatkach, przedstawiono na rysunku (fig. 2) oraz w postaci tabeli 3.

Mając na względzie naturalną śmiertelność pszczoł, należy stwierdzić, iż preparaty według wynalazku to substancje nietoksyczne, przedłużające czas życia pszczoł i w pełni bezpieczne jako dodatki do pszczelich pokarmów.

Wykaz sekwencji

Starter 27F o sekwencji:

(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA-3')

Starter 1507R o sekwencji:

(5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAG-3')

Zastrzeżenia patentowe

1. Szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus kunkeei* oraz z gatunku *Fructobacillus fructosus*, wyizolowane z przewodu pokarmowego pszczoł miodnych, takie jak: *Lactobacillus kunkeei* CH1, *Lactobacillus kunkeei* CH2, *Lactobacillus kunkeei* CH3, *Lactobacillus kunkeei* Z1, *Lactobacillus kunkeei* Z3, *Lactobacillus kunkeei* Z5, *Lactobacillus kunkeei* III1, *Lactobacillus kunkeei* VII, *Lactobacillus kunkeei* VI3, *Lactobacillus kunkeei* VI4, *Lactobacillus kunkeei* VI6, *Lactobacillus kunkeei* VII4 oraz *Fructobacillus fructosus* V5 i *Fructobacillus fructosus* VIII1, zdeponowane w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda, Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, pod numerami: *Lactobacillus kunkeei* CH1 – B/00125; *Lactobacillus kunkeei* – CH2 B/00126; *Lactobacillus kunkeei* CH3 – B/00127; *Lactobacillus kunkeei* Z1 – B/00128; *Lactobacillus kunkeei* Z3 – B/00129; *Lactobacillus kunkeei* Z5 – B/00130; *Lactobacillus kunkeei* III1 – B/00131; *Lactobacillus kunkeei* VI1 – B/00132; *Lactobacillus kunkeei* VI3 – B/00133; *Lactobacillus kunkeei* VI4 – B/00134; *Lactobacillus kunkeei* VI6 – B/00135; *Lactobacillus kunkeei* VII4 – B/00136; *Fructobacillus fructosus* VIII1 – B/00137 oraz *Fructobacillus fructosus* V5 – B/00138.
2. Szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus kunkeei* oraz z gatunku *Fructobacillus fructosus*, jak opisano w zastrz. 1, do zastosowania w zwalczaniu i zapobieganiu chorób pszczoł miodnych, a także we wzmacnieniu ich odporności i kondycji zdrowotnej.
3. Preparaty probiotyczne na bazie nowo wyizolowanych szczepów bakterii, zdefiniowanych w zastrz. 1, **znamiennie tym**, że zawierają jeden z tych szczepów *Lactobacillus kunkeei* lub *Fructobacillus fructosus*, bądź dowolne ich mieszaniny.
4. Preparaty probiotyczne według zastrz. 3, **znamiennie tym**, że mają postać liofilizatu.
5. Preparaty probiotyczne według zastrz. 3 i 4, **znamiennie tym**, że zawierają substancje utrwalające i osłaniacze.
6. Preparaty probiotyczne według zastrz. 3, **znamiennie tym**, że w 1 ml preparatu, zawarte jest od 1×10^3 do 1×10^{11} bakterii.

Rysunki

Tabela 1

Rodzaj preparatu określonego w przykł. 2., z uwzględnieniem liczba bakterii wg wynalazku	Łączna liczba bakterii szczepów <i>L. kunkeei</i> i <i>F. fructosus</i> na 1g jelita przewodu pokarmowego pszczoł		
	Przed podaniem preparatu	Po 7 dniach podawania preparatów	Po 14 dniach od zakończ. podawania preparatu
Kontrola - czysty 35% syrop cukrowy	1,0-1,3 x10 ⁷	1,0-1,3 x10 ⁷	1,1-1,9 x10 ⁷
Preparat 1 (1x10 ¹¹ bakterii w 1 ml preparatu)	1,0-1,2 x10 ⁷	6,5-7,3 x10 ⁸	1,8-2,1 x10 ⁷
Preparat 2 (1x10 ³ w 1 ml preparatu)	1,0-1,1 x10 ⁷	1,2-1,6 x10 ⁸	1,1-1,4 x10 ⁷
Preparat 3 (1x10 ⁴ w 1ml preparatu)	1,0-1,2 x10 ⁷	1,2-1,5 x10 ⁸	1,2-1,6 x10 ⁷
Preparat 4 (1x10 ⁵ w 1 ml preparatu)	1,0-1,3 x10 ⁷	6,1-7,9 x10 ⁸	1,3-2,0 x10 ⁷
Preparat 5 (1x10 ⁶ w 1 ml preparatu)	1,0-1,3 x10 ⁷	4,8-5,3 x10 ⁷	1,6-2,0 x10 ⁷
Preparat 6 (1x10 ⁷ w 1 ml preparatu)	1,0-1,2 x10 ⁷	4,9-5,1 x10 ⁸	1,7-2,0 x10 ⁷
Preparat 7 (1x10 ⁸ w 1 ml preparatu)	1,0-1,2 x10 ⁷	5,5-5,9 x10 ⁸	1,7-2,1 x10 ⁷
Preparat 8 (1x10 ⁹ w 1 ml preparatu)	1,0-1,2 x10 ⁷	6,1-7,0 x10 ⁸	1,7-2,1 x10 ⁷

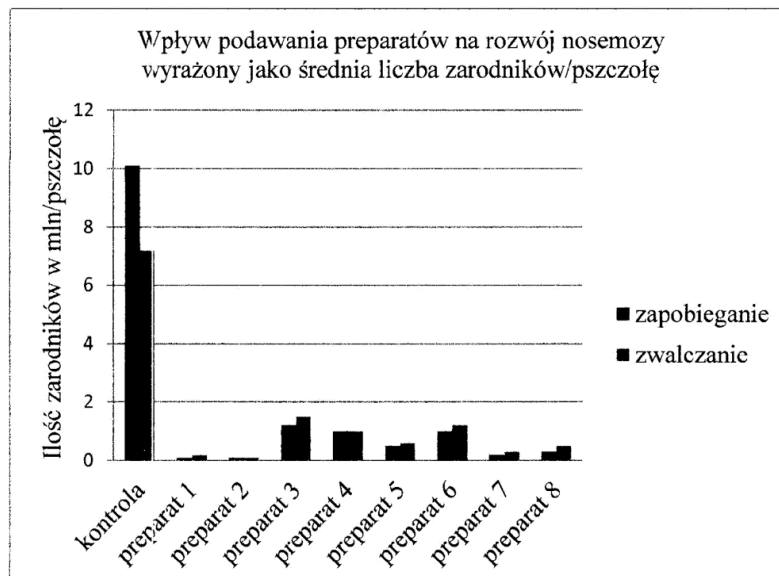


Fig.1

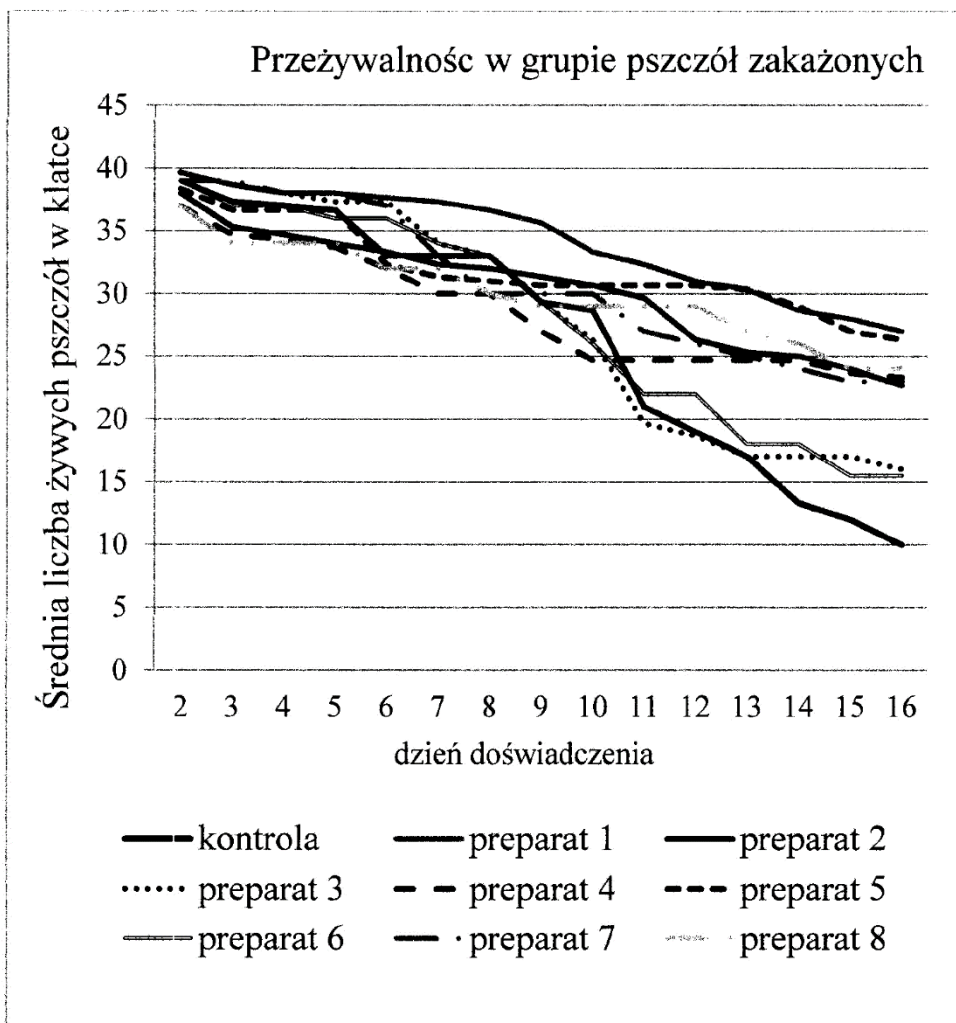


Fig. 2

Tabela 2

Szczep	Strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów (w mm)				
	<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kontrola (agar)
<i>L. kunkeei</i> CH1	15	5	5	5	0
<i>L. kunkeei</i> CH2	15	5	5	5	0
<i>L. kunkeei</i> CH3	14	4	5	5	0
<i>L. kunkeei</i> Z1	14	4	4	4	0
<i>L. kunkeei</i> Z3	15	4	4	4	0
<i>L. kunkeei</i> Z5	14	4	4	4	0
<i>L. kunkeei</i> III1	14	5	5	5	0
<i>L. kunkeei</i> VI1	14	5	5	5	0
<i>L. kunkeei</i> VI3	15	5	5	4	0
<i>L. kunkeei</i> VI4	14	4	4	4	0
<i>L. kunkeei</i> VI6	15	5	5	4	0
<i>L. kunkeei</i> VII4	14	4	5	5	0
<i>F. fructosus</i> V5	14	4	4	4	0
<i>F. fructosus</i> VIII1	14	4	4	4	0

Tabela 3

Grupa badawcza preparatów o składzie określonym w przykł. 2, podawana pszczołom	Liczba pszczół	
	Początkowa przed eksperymentem	martwych tj. po zakończeniu podawania określonego preparatu
Kontrola (czysty pokarm)	240	193
Preparat 1	240	119
Preparat 2	240	121
Preparat 3	240	169
Preparat 4	240	152
Preparat 5	240	115
Preparat 6	240	157
Preparat 7	240	132
Preparat 8	240	128