

<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 pszczół 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 czerwiem 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, wirginiamicyna, flawomycyna, erytromycyna i inne) lub sulfonamidy. Jednakże skutki uboczne szczególnie długotrwałego stosowania antybiotyków i polisulfamidów dla pszczół oraz ludzi (skażone produkty pszczele) doprowadziły do zakazu ich wykorzystania w krajach Unii Europejskiej (Rozporządzenie EEC 2377/90 i 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 pszczół odpornych na zgnilec również nie dały zadowalających wyników. Tymczasem przytoczone powyżej dane GIW jednoznacznie pokazują, że zagrożenie tą chorobą pszczół 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 pszczół 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 pszczół 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 pszczół. 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 Pszczół wykazały, że przy dawkach leczniczych

(powyżej MIC) kompozycja przygotowywana na bazie ekstraktów z cienkich gałązek brzozy jest toksyczna dla larw pszczelich.

80 Istotą wynalazku jest kompozycja do leczenia zgnilca złośliwego pszczoł, choroby
czerwia pszczoły miodnej *Apis mellifera* wywołanej przez przetrwalnikujące bakterie
Paenibacillus larvae, przygotowana na bazie ekstraktu. Kompozycja zawiera suchy ekstrakt
w postaci proszku uzyskiwany z owocników grzyba poliporoidalnego złotoporka niemilego
95 *Tyromyces fissilis*, który jest zmieszany bezpośrednio z wodą w proporcji 1:20. Suchy
ekstrakt metanolowy w postaci proszku otrzymywano po odparowaniu metanolu w
temperaturze poniżej 50°C w wyparce próżniowej lub suszarce rozpyłowej z
odfiltrowanego ekstraktu uzyskiwanego poprzez macerację rozdrobnionych owocników
złotoporka niemilego *Tyromyces fissilis*. Kompozycja służy do leczenia zgnilca złośliwego
90 pszczoł po wymieszaniu z syropem cukrowym w proporcjach 1:10 lub profilaktycznie w
proporcjach 1:20.

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
95 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*
100 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
105 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
110 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
115 *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).

120

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 niemily <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 Siedzuń sosnowy <i>Sparassis crispa</i>	13	13	16	14	14	15
5.	G73 Ziarnoskórnik 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

125 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 130 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 130 zrealizowano w Laboratorium Mikrobiologii Stosowanej Uniwersytetu w Białymstoku.

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

135

Lp	Nr kompozycji i gatunek grzyba z nazwą potoczną i łacińską	Rodzaj stężenia	Wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) i minimalne stężenia bakteriobójczego (MBC) względem P. larvae (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 sosno Heterobasidion annosum	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 niemily Tyromyces fissilis	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 Oligoporus guttulatus	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 Sparassis crispa	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 Ziarnoskórnik purpurowy Chondrostereum purpureum	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. Fomitopsis officinalis	MIC	nie działa	5000	5000	5000	5000	5000
		MBC	nie działa	nie działa	nie działa	nie działa	nie działa	nie działa

B

140 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.

145 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 pszczół 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.

160 Ocenę przeciwbakteryjnego działania preparatu grzybowego przeprowadzono na larwach pszczelich zakażonych, występującymi w krajowych pasiekach, terenowymi

165 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.

175 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;
- 180 • 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;
- 185 • 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;
- 190 • 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.

195 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.

200 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 wraz z 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.

205

Dzień doświadczenia	A1	A2	A3	B1	B2	B3	K1	K2	K3
	zakażone ERIC I, nieleczone	zakażone ERIC I, leczone 0.025% ekstraktem	zakażone ERIC I, leczone 0.05% ekstraktem	zakażone ERIC II, nieleczone	zakażone ERIC II, leczone 0.025% ekstraktem	zakażone ERIC II, leczone 0.05% ekstraktem	niezakażone, karmione mleczkiem bez ekstraktu	niezakażone, karmione 0.025% ekstraktem	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	10
	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

210

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

215

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.

220

Wątpliwości te nasuwa wyższa przeżywalność larw w grupie larw karmionej mleczkiem z wyższym stężeniem ekstraktu grzybowego.

225

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 czerwiu niezasklepionego.

230

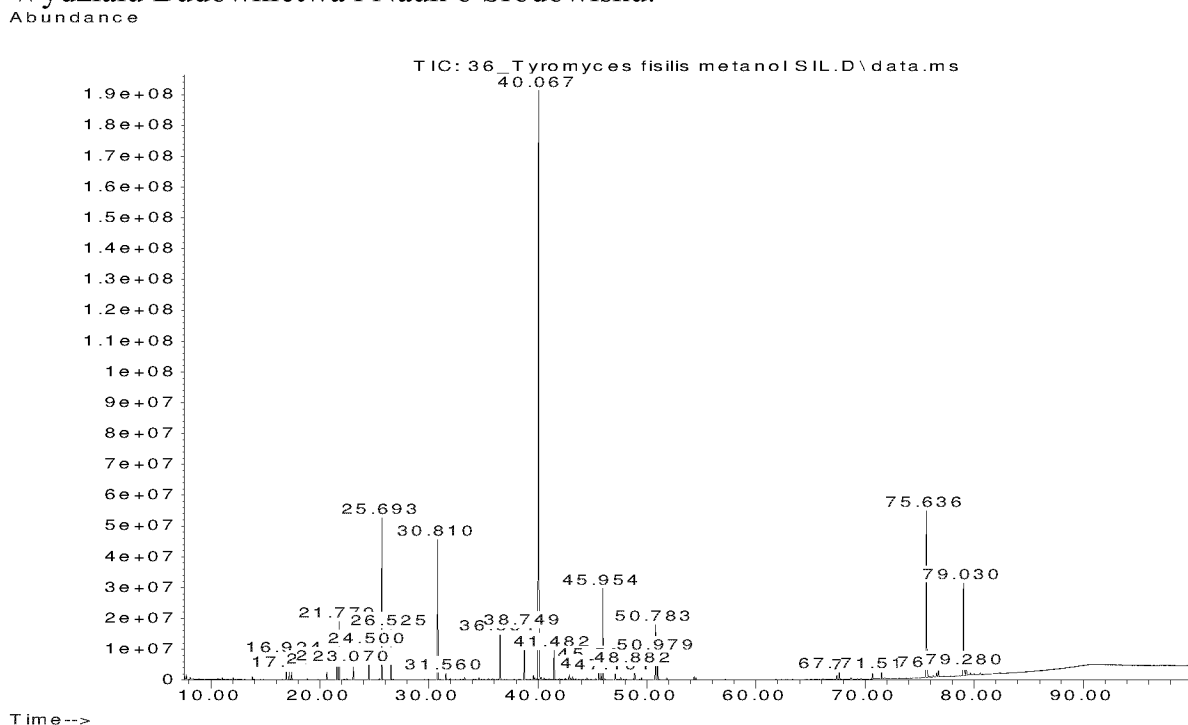
Podanie larwom zakażonym ERIC I (grupa A2, A3) preparatu grzybowego w stężeniu 0,025% jak i 0,05% nie zahamowało zamierania larw będącego następstwem rozwoju zakażenia. Zamieranie larw następowało nawet znacznie szybciej w porównaniu do larw zakażonych ale nieleczonych (A1). Co prawda w grupie larw leczonych 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.

235

240 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 245 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 niemilego 250 *Tyromyces fissilis* na bakterie *P. larvae*, a co najmniej na jej selektywne działanie na genotypy Eric II. Badania bakteriobójczego działania kompozycji zostaną powtórzone w 2020 roku.

Skład chemiczny suchego ekstraktu metanolowego ze złotoporka niemilego *Tyromyces fissilis* (po odparowaniu alkoholu) określono techniką GC-MS po wcześniejszej siliacji próbek. Identyfikację składu prowadzono na podstawie baz danych: Wiley Registry: 255 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 260 Wydziału Budownictwa i Nauk o Środowisku.



265 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

270 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.

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

Grupa związków chemicznych	Numer CAS	t _{ret.} (min.)	Zawartość (%)
Hydroksykwasy 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-Glucopiranoza, 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-Glucopiranoza, 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 piroglutaminowy, 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

- 280 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. Wstępne wyniki badań hodowli Złotoporek niemiłego *Tyromyces fissilis* są bardzo obiecujące. Hodowla pozwoli uzyskać nieograniczony zasób
- 285 surowca w postaci owocników lub micelium (hodowla hydroponiczna) do wykorzystania przy produkcji leku weterynaryjnego do leczenia zgnilca złośliwego.