



ProBiotics
Polska



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU



dr n. wet. Piotr Nowotnik

piotr.nowotnik@itm.turek.pl

Instytut Technologii Mikrobiologicznych w Turku

Departament Badań i Rozwoju Grupy ProBiotics Polska

ApiBiotic : preparat synbiotyczny o wysokim potencjale przeciwdrobnoustrojowym do stosowania w profilaktyce względem bakterii wywołującej zgnilec amerykański w rodzinach pszczelich

Zespół badawczy



prof. dr hab. Paweł Chorbiński

Pracownia Chorób Owadów Użytkowych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej



UNIwersYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU



dr hab. Paweł Migdał, prof. UPWr

Instytut Hodowli Zwierząt
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt



UNIwersYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU



dr n. wet. Piotr Nowotnik

Zakład Chorób Zakaźnych Zwierząt i Administracji Weterynaryjnej | Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Dział Badań i Rozwoju ProBiotics Polska – Wytwórnia Probiotyków



UNIwersYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU



dr inż. Bogusław Górski

Wytwórnia Probiotyków ProBiotics Polska



Geneza pracy

- Brak skutecznych **rozwiązań produktowych** na rynku do **prewencji** przed rozwojem nadkażenia;
- Niestabilny **status** administracyjno-prawny **zgnilca amerykańskiego**;
- Ryzykowne praktyki pszczelarzy i hodowców **pogłębiające problematykę** zgnilca amerykańskiego;
- Wzmożone zainteresowanie na rynku produktami naturalnymi o charakterze **celowanych biopreparatów mikrobiologicznych** o podwyższonej zawartości **metabolitów**;
- Niewykorzystany potencjał **biotechnologii i mikrobiologii** w zwalczaniu i **profilaktyce** chorób zwierząt gospodarskich;



Fot. Piotr Nowotnik

Czynnik epizootiologiczny

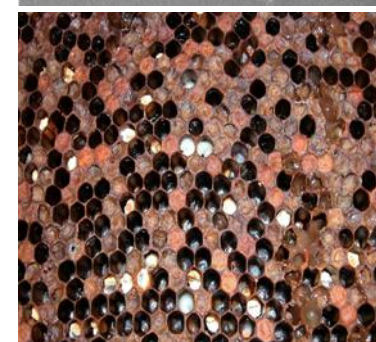
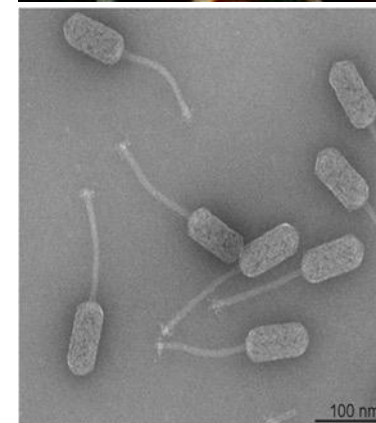
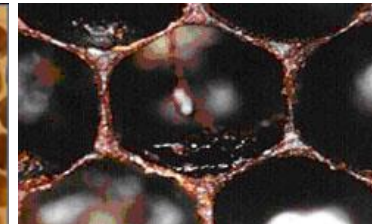
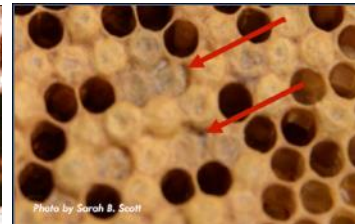
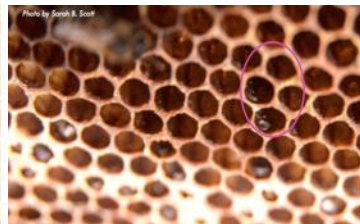
Źródła:

ScienceDirect.com

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.00804-15>

Bee Informed Partnership

Fot. B. Scott



Zmienna liczba wykrywanych ognisk zakaźnych [Biuletyn chorób zakaźnych, GIW]

Rok: Liczba przypadków:

2017 137

2018 174

2019 260

2020 149

2021 67

2022 95

2023 191

2024 118

2025 >73

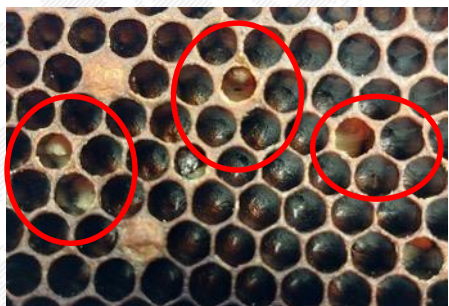
Zainfekowane rodziny bardzo szybko słabną, **drastycznie spada liczba potomstwa, zmniejsza się liczebność pszczół** co prowadzi do obniżenia ekonomiki gospodarstwa lub całkowitej likwidacji pasieki

Bioróżnorodność mikroflory pszczół jest **zaburzana** przez szereg czynników, np. ksenobiotyki, pestycydy, zaburzenie odporności, stres pokarmowy czy patogeny i pasożyty

Jednym z zagrożeń dla **równowagi mikrobiomu** rodzin pszczelich jest *Paenibacillus larvae*, który wywołuje chorobę czerwiu - **zgnilec amerykański**, przejawiający się w 5 genotypach: Eric I – Eric V

Chore rodziny pszczele zostają poddane fizycznej eradykacji z polecenia PLW, **niemożność stosowania farmakoterapii**

PIWET-PIB w Puławach [2019]: monitoring występowania w rodzinach pszczelich - **przetrawalniki *P. larvae* występują w 23-45% analizowanych przypadków**



fot. Piotr Nowotnik / Martwe larwy z widocznym nadkażeniem bakterijnym we wczesnej fazie wykrycia



fot. Piotr Nowotnik / Zdrowe larwy, prawidłowo ułożone w heksagonalnych komórkach plastra

Problematyka zgnilca amerykańskiego



99,0 tys. pszczelarzy w PL [INHORT, Semkiw 2024];



2,42 mln rodzin pszczelich w PL [INHORT, Semkiw 2024];

'Przepszczelenie' = rozwój chorób



7,7 rodziny pszczelej (9,4-12,6) / km² [INHORT, Semkiw 2024];

61 Lekarzy Weterynarii ze specjalizacją chorób
owadów użytkowych [Vetpol.org.pl]

Nieszczelne przepisy prawne dot.
przemieszczania pasiek wędrownych

Na terenie UE, liczba sięga 620 000 pszczelarzy, którzy opiekują się 20 milionami rodzin pszczelich (Dane 2024, EFSA).

Statystyki zakażeń

Europa: kilka setek do kilku tys. rocznie [Papić i wsp., 2024]

Polska 2022-2025: 49,2% (+)
[Nowotnik i wsp., 2025]

Polska 2019-2025: >252 [GIW]

Austria 2022-2024: 111
[Wikipedia]

Hiszpania 2016-2026: 2,5%
[MAPA]

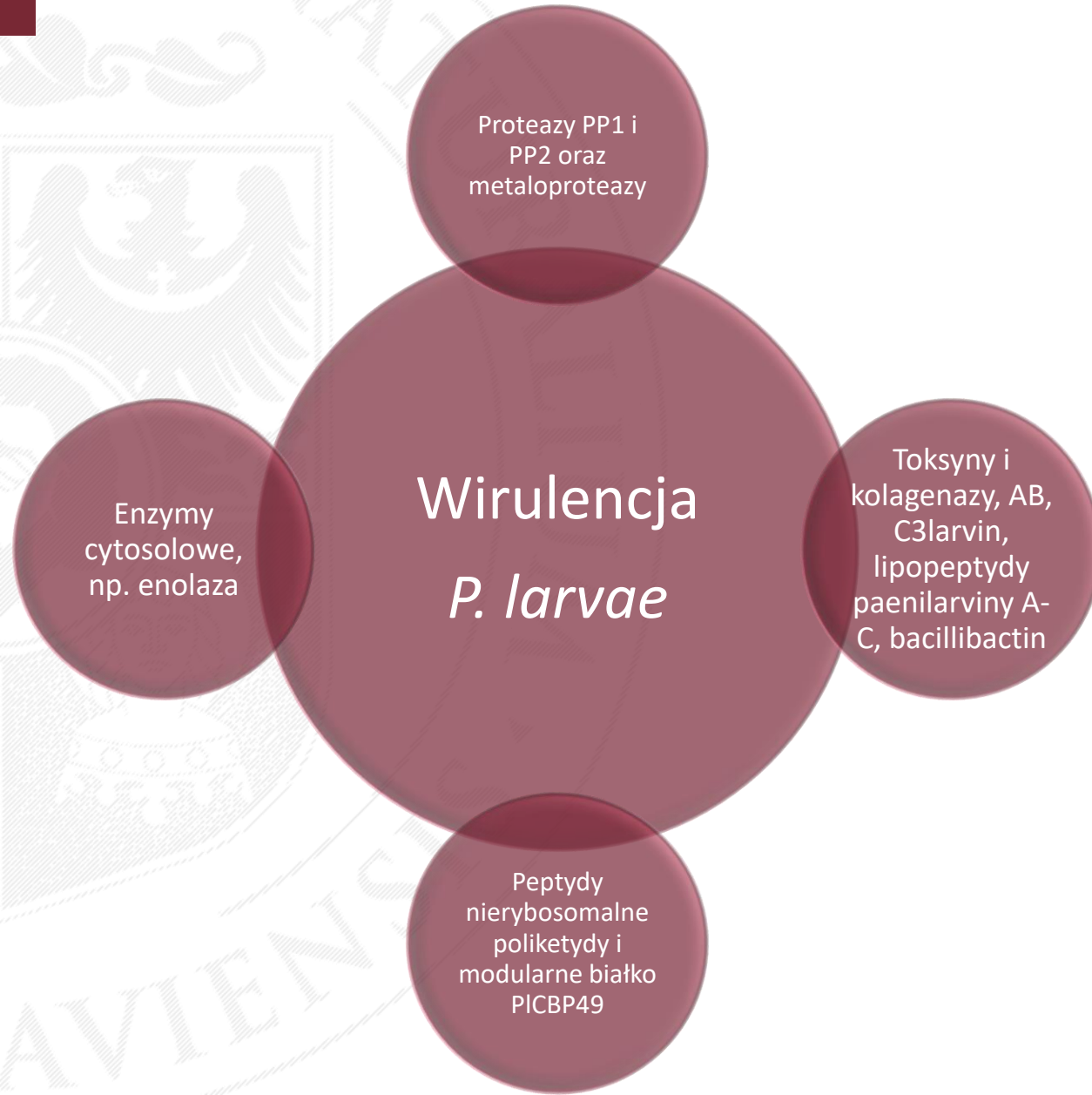
UK 2024: 888 [NBU/APHA i „Live Reports” – BeeBase]

Niemcy 2019-2023: 620
[Friedrich-Loeffler-Institut]

Pakistan 2018: 37,3% (+)
[Khezri i wsp., 2018]

UE: 11,6% [EFSA/EPILOBEE]

Wirulencja bakterii *Paenibacillus larvae*



***Paenibacillus larvae* szerzy swoją patogenność na wielu płaszczyznach poprzez liczne, złożone mechanizmy, czynniki i drogi transmisji :**

- ❑ Udział metabolitów w rozkładzie larw podczas infekcji i postępującej sepsy;
- ❑ Degradacja masy larwalnej;
- ❑ Uczestnictwo toksyn w szlakach glikolitycznych;
- ❑ Związki wysoce toksyczne i immunogenne dla larw pszczoł miodnych;
- ❑ Sekrecja śmiertelnych białek;
- ❑ Degradacja macierzy peritroficzej wyścielającej nabłonek jelita środkowego;
- ❑ Degradacja chityny i macierzy peritroficzej larw podczas superinfekcji;
- ❑ Zdolność do biosyntezy specyficznego sideroforu - bacillibactinu w warunkach ograniczonej dostępności żelaza;

Strategie lecznicze i profilaktyka stosowana na świecie



Dezynfekcja

- ❖ Rygorystyczne procedury dezynfekcyjne;
- ❖ Eradykacja zakażonych pni;
- ❖ Silne środki biobójcze degradujące mikrobiom w sposób długotrwały;
- ❖ Liczne techniki chemiczne i fizyczne;
- ❖ Przerywanie łańcucha zakaźnego i usuwanie źródeł zakażenia;



Farmakoterapia

- ✓ Antybiotyki i środki przeciwdrobnoustrojowe;
- ✓ Kraje Ameryki Północnej i niektóre kraje Ameryki Południowej;
- ✓ Narastająca oporność i efekty toksyczne;
- ✓ Horyzontalne rozprzestrzenianie się substancji czynnej [apiwektoring];
- ✓ Mutacje szczepów;



Zabiegi hodowlane

- Zabiegi biotechniczne, tzw. podwójne przesiedlenie;
- Kwarantanna pasieki;
- Zabiegi dezynfekcyjne i eradykacja podejrzanych o chorobę rodzin*;
- Wykształcanie linii odpornych o zachowaniach higienicznych;

*Zmiany w przepisach prawnych: Ustawa z dnia 21 listopada 2025 r. o zdrowiu zwierząt Dz. U. z 2025 r, poz. 1795

Problematyka zgnilca amerykańskiego

fot. Piotr Nowotnik



1

Zabieg podwójnego przesiedlania rodzin z niewysokim obciążeniem mikrobiologicznym:

Zsypanie roju podejrzanego o chorobę, przeglądanie pszczoł i osadzenie w nowym ulu

+

sugerowana bioasekuracja: oprysk pszczoł ApiBioFarmą + ApiFarmą (razem) na etapie głodzenia w rojnicy, oprysk ula ApiFarmą przed zasiedleniem i po zasiedleniu, podkarmianie pszczoł syropem z ApiBioFarmą

2

Dezynfekcja uli i elementów ulowych

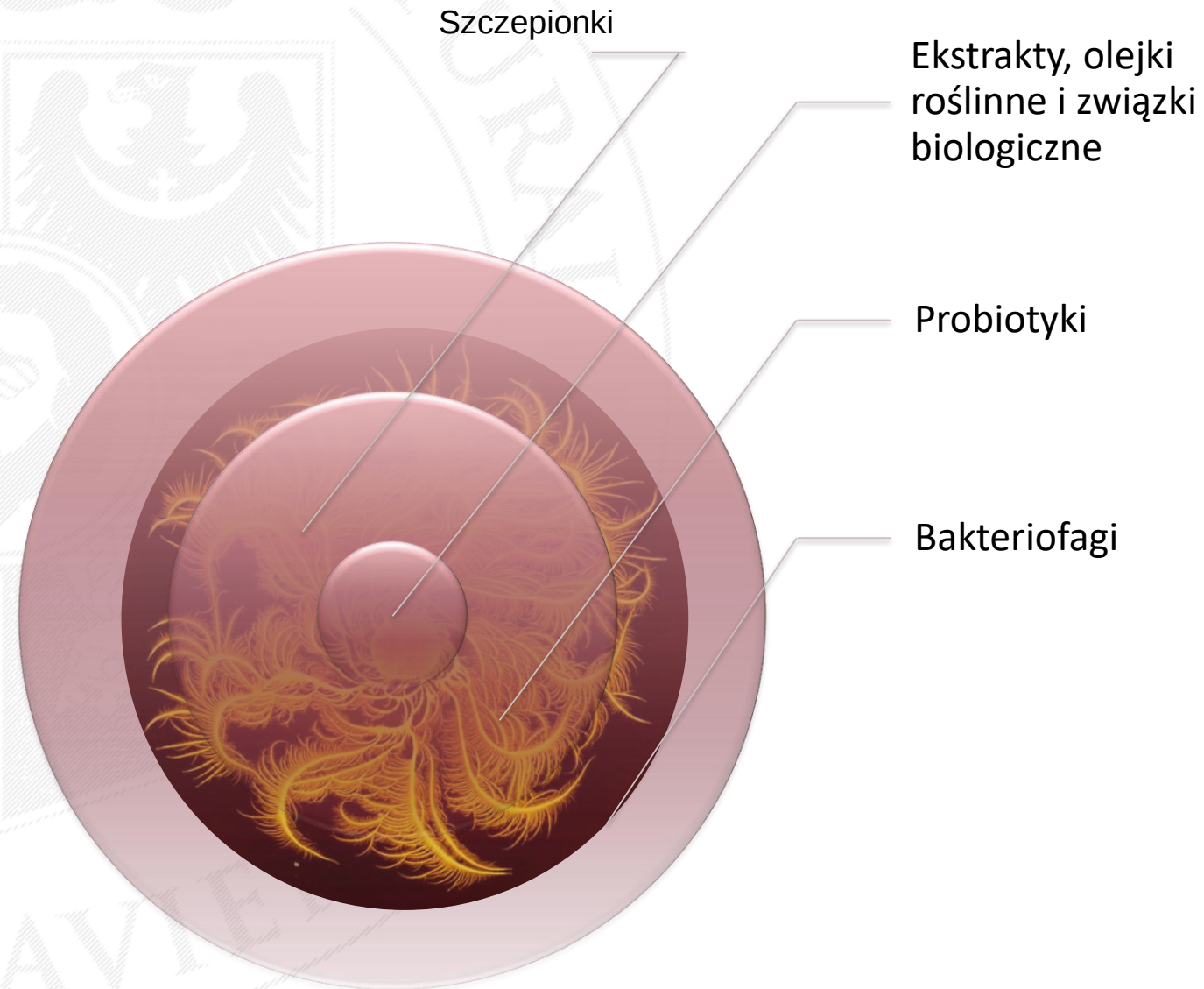
+

sugerowana bioasekuracja: po wypłukaniu i wywietrzeniu środków dezynfekcyjnych zalecany oprysk wszystkich elementów ulowych i sprzętu pasiecznego ApiFarmą

3

Oprysk gniazd, uli, sprzętu pasiecznego oraz pasieczyska ApiFarmą przed zasiedleniem jako stały nieodłączny element dobrej praktyki pszczelarskiej oraz po obsadzeniu pszczoł w ulu. Wszystkie plastry z chorobowo zmienionym czerwiem muszą zostać spalone.

IV globalna droga i koncepcja: biologizacja i czynniki do biokontroli zgnilca amerykańskiego



- Konieczne było opracowanie szerszego spektrum produktów i technologii biotechnologicznych, aby **kompleksowo przeciwdziałać zakażeniom wywołanym przez *P. larvae***;
- Bardzo często w opracowywaniu rozwiązań przemysłowych brakuje też wiedzy technologicznej dot. łączenia i praktycznego zastosowania gotowych mieszanek lub preparatów komercyjnych, które mogłyby pełnić funkcję **fitobiotyków, synbiotyków, metabiotyków lub innych biologicznie aktywnych biotyków**, odpowiednich do wykorzystania w pszczelarstwie;
- Produkty mogłyby **stanowić formę wyprzedzającej terapii antybakteryjnej i dostarczyć nowych informacji na temat kontroli *P. larvae* przy użyciu biotyków nowej generacji o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych**;
- Wymagane są próby w pasiekach i testy klatkowe w celu oceny toksyczności i skuteczności *in vivo*;
- **Dostęp do skutecznych, wolnych od antybiotyków i bezpiecznych dla środowiska narzędzi profilaktycznych**, pozwalając na kontrolowane zarządzanie populacją *P. larvae* w mikrobiomie pszczół.

Opracowanie biotyków – celowanych rozwiązań biologicznych w pszczelarstwie

- Biotyki nowej generacji, a przykładem wpisującym się w linie takich produktów i technologii może być wynalazek polskich naukowców, o nazwie roboczej ApiBiotic;
- Do bioasekuracji na podstawie Evidence-Based Practices i Evidence-Based Management;
- Wypracowanie rozwiązania produktowego w postaci kontaktowego synbiotyku zmniejszającego presję zgnilca amerykańskiego w rodzinach pszczelich poprzez wspieranie rozwoju mikrobiomu larw i dorosłych osobników pszczoły miodnej, konkurującego i blokującego nadmierne namnażanie się i wytwarzanie endospor *P. larvae*;

Wspieranie mikrobiomu rodzin pszczelich

Metafilaktyka

Prewencja weterynaryjna

Zwiększenie bioasekuracji

Wykorzystanie metabolitów bakteryjnych do biologicznej kontroli AFB

Probiotyki, synbiotyki, postbiotyki (produkty metaboliczne, metabiotyki), preparaty fito-mikro-farmakologiczne i farmakobiotyki

Utrzymanie higieny produktów pochodzenia zwierzęcego

Redukcja czynników stresogennych

Poprawa ogólnego dobrostanu rodzin pszczelich

Problem badawczy

Złożoność problemu badawczego dotyczy:

- zmniejszenia presji zgnilca amerykańskiego w rodzinach pszczelich poprzez opracowanie rozwiązań biotechnologicznych **wspierających ochronę i rozwój mikrobiomu fizjologicznego larw rodzin pszczelich, konkurującego z *P. larvae* i blokującego nadmierne namnażanie się i wytwarzanie endospor;**
- sprawdzenia w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* **wrażliwości komórek wegetatywnych *P. larvae* na substancje biologicznie aktywne, ukonstytuowanych na drodze procesów biotechnologicznych, ukierunkowanych na uzyskanie w końcowym wyrobie **wysokiej zawartości związków bioaktywnych** z wykorzystaniem bakteryjnych komponentów probiotycznych;**
- konsekwencji wynikających z zakażeń bakteryjnych w postaci narastających strat w gospodarce pasiecznej i zagrożenia bezpieczeństwa pszczoły miodnej jako głównego zapylacza w łańcuchu produkcji żywności.

Cel doktoratu wdrożeniowego

Sprawdzenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej: poszczególnych komponentów i surowców roślinnych stanowiących skład pilotażowej pre-formulacji przyszłego preparatu na poziomie laboratoryjnym (1) ; prototypu finalnego na poziomie laboratoryjnym (2) ; prototypu finalnego w warunkach *in vivo* na modelu rodzin pszczelich (3).

Opracowanie i dostarczenie kontaktowego synbiotyku o wysokim potencjale przeciwdrobnoustrojowym dla pszczoł, zabezpieczającego przed zakażeniem bakterią *Paenibacillus larvae* wywołującą zgnilec amerykański w rodzinach pszczelich

CELE PRAC B+R

Wypracowanie synbiotyku zmniejszającego presję zgnilca amerykańskiego w rodzinach pszczelich poprzez wspieranie rozwoju mikrobiomu larw i dorosłych osobników pszczoły miodnej, konkurującego i blokującego nadmierne namnażanie się i wytwarzanie endospor *P. larvae*.

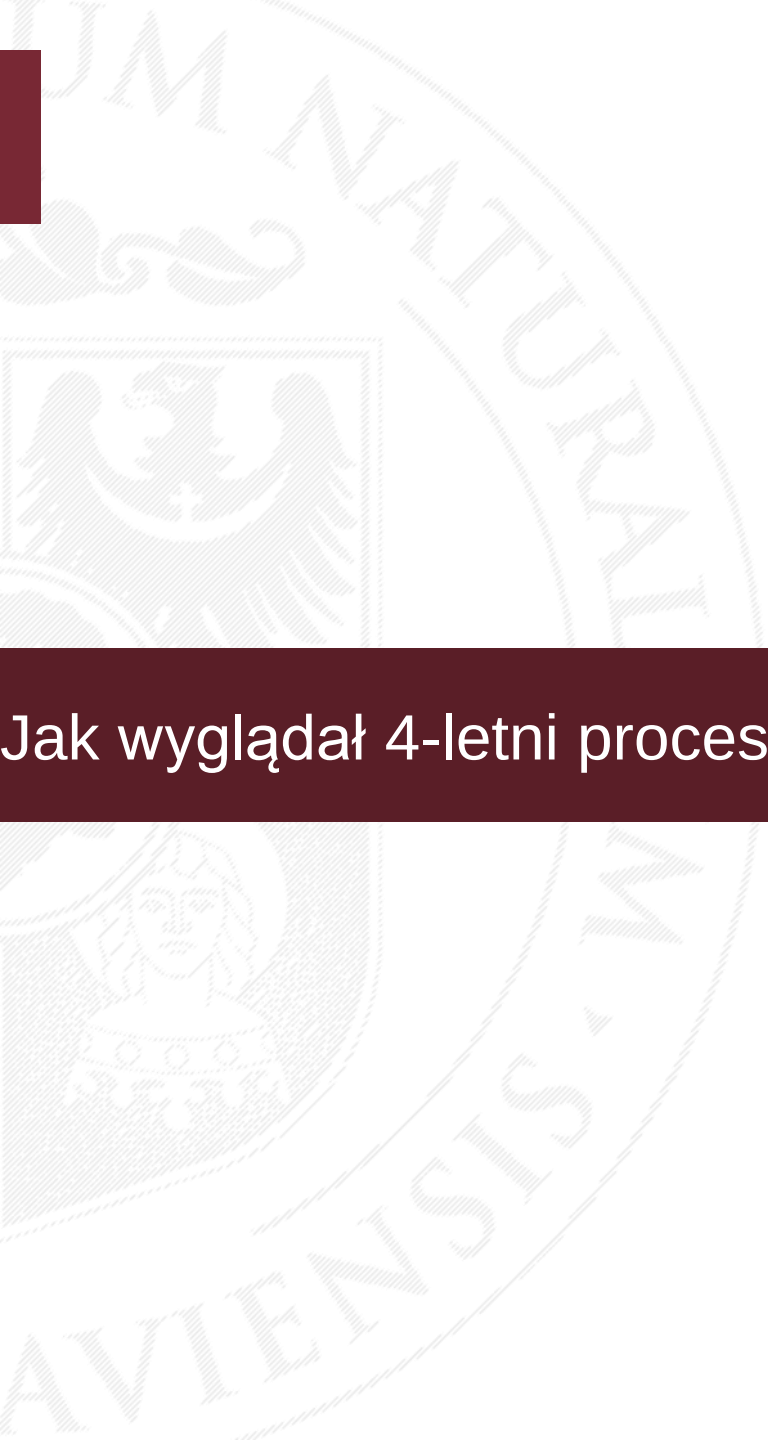
Opracowanie i zwalidowanie sposobu, dawkowania oraz drogi podania preparatu z uwzględnieniem elementów dobrej praktyki pszczelarskiej.

Utrwalenie działania rozwiązania produktowego w przerywaniu łańcucha zakażeń i transmisji bakterii *P. larvae* pomiędzy rodzinami pszczelimi oraz zabezpieczającego przed zakażeniem wywołanym przez *Paenibacillus larvae*.

Hipotezy badawcze w projekcie

- (1) wykazanie wrażliwości komórek wegetatywnych *P. larvae* (Eric I, Eric II, Eric III) na antagonistycznie działające w stosunku do tych patogenów substancje biologicznie aktywne, ukonstytuowanych na drodze procesów biotechnologicznych z wykorzystaniem użytych komponentów mikrobiologicznych i roślinnych w składzie preparatu;
- (2) zmniejszenie presji występowania zgnilca amerykańskiego w rodzinach pszczelich przez wspieranie rozwoju mikrobiomu fizjologicznego pszczół, konkurującego z *Paenibacillus larvae*, co umożliwiłoby blokowanie nadmiernego namnażania się i wytwarzania endospor tego patogenu;
- (3) próba środowiskowego ograniczenia wzrastającej liczby obszarów zapowietrzonych i rozszerzających się ognisk zakaźnych podlegających eradykacji przez służby weterynaryjne;
- (4) skuteczne zredukowanie terenowych ognisk chorobowych przy odpowiednim zastosowaniu potencjału biotechnologicznego i mikrobiologicznego;
- (5) synbiotyki będą bezpieczne dla pszczół oraz produktów pszczelich przeznaczonych do spożycia i wykorzystania przez człowieka;





Jak wyglądał 4-letni proces badawczy, który doprowadził do otrzymania ApiBiotic?

Poszukiwano najaktywniejszych drobnoustrojów spośród 79 mikrobiologicznych czynników do biokontroli *P. larvae*

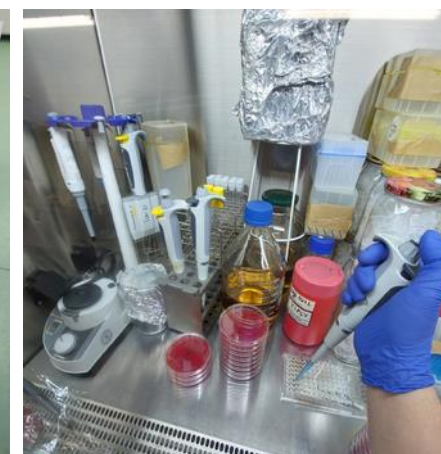
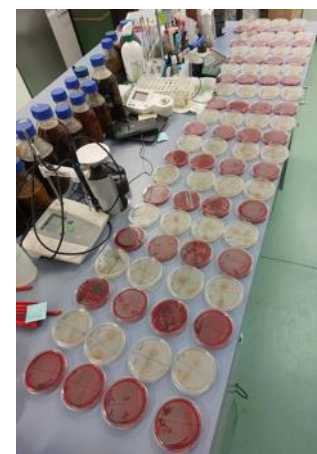
• <i>Lactobacillus gasseri</i> • <i>Lactobacillus amylovorus</i> • <i>Lactobacillus rhamnosus</i> • <i>Lactobacillus crispatus</i> • <i>Lactobacillus fructivorans</i> • <i>Lactobacillus hilgardii</i> • <i>Lactobacillus constellatus</i> • <i>Lactobacillus melifer</i> • <i>Lactobacillus johnsonii</i> • <i>Lactobacillus reuteri</i> • <i>Ligilactobacillus salivarius</i> • <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> • <i>Lactobacillus acidophilus</i> • <i>Lactobacillus bulgaricus</i> • <i>Lactobacillus fermentum</i>	• <i>Lactobacillus kullabergensis</i> • <i>Lactobacillus helsingborgensis</i> • <i>Bombilactobacillus mellis</i> • <i>Lactobacillus apis</i> • <i>Lactobacillus melliventris</i> • <i>Lactobacillus panisapium</i> • <i>Apilactobacillus apinorum</i> • <i>Lactobacillus kimbladii</i> • <i>Bombilactobacillus mellifer</i> • <i>Lactobacillus helveticus</i> • <i>Lactobacillus jensenii</i> • <i>Lactocaseibacillus casei</i> • <i>Levilactobacillus brevis</i> • <i>Lactobacillus farciminis</i> • <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	• <i>Bacillus megaterium</i> • <i>Bacillus cereus</i> • <i>Bacillus subtilis</i> • <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> • <i>Bacillus licheniformis</i> • <i>Bacillus pumilus</i> • <i>Lysinibacillus fusiformis</i> • <i>Bacillus thuringiensis</i> • <i>Bacillus simplex</i> • <i>Bacillus laterosporus</i> • <i>Bacillus polymyxa</i> • <i>Bacillus constellatus</i>	• <i>Bifidobacterium bifidum</i> • <i>Bifidobacterium longum</i> • <i>Bifidobacterium lactis</i> • <i>Bifidobacterium coryneforme</i> • <i>Bifidobacterium asteroides</i> • <i>Bifidobacterium animalis</i>	• <i>Serratia marcescens</i> • <i>Serratia plymuthica</i> • <i>Pseudomonas fluorescens</i> • <i>Serratia liquefaciens</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	• <i>Gluconacetobacter sacchari</i> • <i>Apibacter adventoris</i> • <i>Gilliamella apicola</i> • <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> • <i>Parasaccharibacter apium</i> • <i>Brevibacterium spp.</i> • <i>Snodgrassella alvi</i> • <i>Actinomadura apis</i> • <i>Bartonella apis</i> • <i>Frischella perrara</i> • <i>Saccharibacter floricola</i> • <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> • <i>Gluconobacter oxydans</i> • <i>Pseudobacterium rigidus apis</i>	• <i>Enterococcus casseliflavus</i> • <i>Pediococcus pentosaceus</i> • <i>Pediococcus acidilactici</i> • <i>Streptococcus faecalis</i> • <i>Enterococcus faecium</i> • <i>Enterococcus durans</i> • <i>Lactococcus lactis</i> • <i>Streptococcus thermophilus</i>	• <i>Saccharomyces cerevisiae</i> • <i>Streptomyces rimosus</i> • <i>Streptomyces narbonensis</i> • <i>Wickerhamomyces anomalus</i>
---	--	---	--	---	--	--	--

Poszukiwano najaktywniejszych substratów roślinnych spośród 101 czynników do biokontroli *P. larvae*

• Liść yerba mate • Liść wawrzynu szlachetnego • Ziele bylicy bożego drzewka • Liść wierzby białej • Liść orzecha włoskiego • Pączki sosny zwyczajnej • Liść brzozy brodawkowatej • Liść oliwki europejskiej • Liść dębu szypułkowego • Owoc ziela angielskiego • Liść rukwi wodnej • Kwiat nagietka lekarskiego	• Akszolina • Lebidodka amerykańska • Eukaliptus cynereus • Gnaphalium • Turbinata • Szanta zwyczajna • Miętolisna werbenowata • Lebidodka pospolita • Aksamitka drobnokwiatowa • Tymianek pospolity • Ziele glistnika jaskółcze ziele • Ziele krwawnicy pospolitej • Ziele świerzbnicy polnej	• Czosnek pospolity • Chromolaena wonna • Amomum • Cynamonowiec cejloński • Betel zwyczajny • Pieprz ribesiody • Pieprz sarmentozny • Goździkowiec korzenny • Mirt pospolity • Chmiel zwyczajny • Ziele przetacznika lekarskiego • Ziele fiołka trójbarwnego • Liść nasturcji wysokiej • Pączki topoli czarnej	• Drzewo herbaciane • Niaouli • Cytronela wonna • Palmaroza • Cytryna zwyczajna • Majeranek ogrodowy • Rozmaryn lekarski • Szałwia lekarska • Bazylia pospolita • Mięta pieprzowa • Żurawina błotna • Borówka czarna • Borówka brusznica • Aronia czarnoowocowa • Jarzab pospolity • Papryka roczna • Jambolan • Granatowiec właściwy	• Ruta zwyczajna • Macierzanka piaskowa • Lawenda wąskolistna • Bylica piołun • Jeżówka purpurowa • Nagietek lekarski • Berberys zwyczajny • Cykoria podróżnik • Pokrzywa zwyczajna • Nawłoc pospolita • Krwawnik pospolity • Tymianek cytrynowy • Cząber ogrodowy • Czarnuszka siewna • Imbir lekarski • Kurkuma długa • Cebula zwyczajna • Pięciornik gęsi	• Kora dębu szypułkowego • Kora dębu bezszypułkowego • Kora wierzby białej • Kora kruszyny pospolitej • Kora kasztanowca zwyczajnego • Pączki brzozy brodawkowatej • Tawuła wiązolistna • Wiązówka błotna • Przywrotnik pospolity • Rdest ptasi • Rdest węzownik • Pięciornik kurze ziele • Dziurawiec zwyczajny • Ziele ostrożeńca polnego	• Tarnina • Głóg jednoszyjkowy • Dzika róża • Czeremcha zwyczajna • Kora granatu • Owoc jałowca pospolitego • Ziele oman wielki • Ziele dziewanny wielkokwiatowej • Ziele rdestowca japońskiego • Ziele szczawiu zwyczajnego • Ziele lebidodki białej • Ziele tasznika pospolitego
---	--	---	--	---	--	---

Otrzymano pierwsze preformulacje pilotażowych kompozycji w skali mikrolaboratoryjnej i sprawdzono ich aktywność przeciwdrobnoustrojową

- Otrzymanie biofermentów z wybranych substratów roślinnych** (zawieszenie 4-10% m/v w jałowym 4% roztworze wodnym melasy z trzciny cukrowej; inokulacja zaszczepką mikrobiologiczną ProBioFood 4-5% v/v; inkubacja 37°C/72h; warunki beztlenowe, kontrola wilgotności inkubatorów);
- Otrzymanie inokulatów bakteryjnych wybranych drobnoustrojów funkcjonalnych** (zawieszenie 4-5% v/v w jałowym 4% roztworze wodnym melasy z trzciny cukrowej, OD ~ 0,5° McFarlanda; inkubacja 37°C/72h; warunki tlenowe/beztlenowe w zależności od specyfiki drobnoustroju, kontrola wilgotności inkubatorów);
- Wykonanie analiz przeciwdrobnoustrojowych z użyciem biofermentów i inokulatów bakteryjnych**, w oparciu o zmodyfikowane standardy EUCAST ISO 20776-1, ISO 20776-2, VetCAST 2015 (posiew *P. larvae*: ATCC 9545, CCUG 50846, CCUG 48973, ATCC 49843 w agarze krwawym, V = 200 µl, OD ~ 0,5° McFarlanda; wlew do studzienek 100 µl filtratów otrzymanych z użyciem filtrów strzykawkowych 0,2 µm o różnych stężeniach; inkubacja 37°C/24-48h; warunki mikroaerofilne, kontrola wilgotności inkubatorów);
- Wyznaczenie stężeń: bakteriobójczych i hamujących wzrost dla komponentów o wstępnie potwierdzonym antagonizmie**, w oparciu o zmodyfikowane standardy CLSI – wyznaczenie MIC, MBC, oznaczenie farmakodynamiki Time-kill / Jorgensen i Ferraro, 2009; Cockerill, 2012a; CLSI M07-A9, Cockerill, 2012b; CLSI M100-S22; CLSI M23; Applemen, CLSI M56, 2014; Jorgensen i Ferraro, 2009; Sweeney, 2017; Goodwin i wsp., 2023;
- Otrzymanie 9 pilotażowych mieszanin synbiotycznych ze składnikami o najwyższym potencjale przeciwdrobnoustrojowym**, kontrola jakości i powtórne analizy w oparciu o zmodyfikowane standardy EUCAST i CLSI



Wybrano pasieki o największym obciążeniu mikrobiologicznym i sprawdzono wpływ mieszanin na odporność pszczół oraz toksyczność w badaniach klatkowych

- 1. Screening, selekcja pasiek i poszukiwanie izolatów terenowych: metody molekularne** - ilościowy pomiar z liczbą kopii DNA żywych komórek w próbce (qPCR, genomiczne liczby bakterii, zastosowanie PMA – Propidium Monoazide oraz EMA – Ethidium Monoazide do komórek martwych, tworzą wiązania z DNA, blokując PCR i amplifikację), shotgun; **łącznie 981 pni**;
- 2. Analizy wskaźników biochemicznych hemolimfy pszczół: badania klatkowe reakcji robotnic pszczoły miodnej w wieku 2, 12 i 21 dni na poszczególne mieszanki pilotażowe synbiotyków (grupy testowe i kontrolna).** Pobranie i zabezpieczenie hemolimfy pszczół w celu analizy wybranych markerów biochemicznych (ALP, ALT, TP, TG, GLUC, GGT, UREA II, UA II, CREA ENZ, ASAT II, ALAT II), pobór od 10 robotnic z każdej klatki (100 robotnic z każdej rodziny pszczelej) z użyciem automatycznego analizatora biochemicznego Pentra 400 firmy Horiba ABX (Francja), stosując odczynniki tej firmy oraz firmy Randox (Wielka Brytania);
- 3. Ocena toksyczności LD50 przeprowadzona według metodyki OECD 213/214, 245 z kontrolą dodatnią w formie roztworu acetonu w czasie 24-96 godzin, rejestracja śmiertelności od 4 godziny trwania testu, przy założeniu, że śmiertelność w grupie kontrolnej <10%;**



Opracowano pierwsze formułacje pilotażowych prototypów preparatu, które zaaplikowano do pasiek doświadczalnych

- Opracowanie metodyki i schematów aplikacji wraz z dawkami** pilotażowych preformulacji wyrobów synbiotycznych celem osiągnięcia najefektywniejszych wyników;
- Przeanalizowanie danych z bazy 64 pasiek i rozpisanie układów doświadczalnych (16); opracowanie autorskie protokoły badawcze uwzględniające wymagane kryteria do spełnienia** (np. rodziny pszczoły niewykazujące historii chorobowej, o podobnej sile i zbliżonym stopniu rozwoju, zajmujące odpowiednią liczbę ramek, z precyzyjnie wskazaną linią i rasą pszczoł, bez przekraczania 50 pni w obsadzie, prowadzone w poszanowaniu rygorów sanitarnych, unikanie pasiek leczonych kwasami organicznymi i tymolem na dręcza pszczelego, z zachowaną odległością od kolejnej pasieki o 8 km, z optymalną bazą pożytkową);
- Przeskalowanie 3 pilotażowych preformulacji wyrobu do skali półtechnicznej (1000 L)** z odtworzeniem jakości, stabilności i aktywności przeciwdrobnoustrojowej;
- Przeprowadzenie kontroli jakości** (OLD, LAB, grzyby, patogeny, Brix, ORP, pH, zawartość cukrów, HMF, analiza kwasowości i metabolitów, rozpoczęcie analiz trwałości produktu);
- Określenie obciążenia mikrobiologicznego, profilaktyczne podawanie pilotażowych preformulacji i ocena ich wpływu na liczbę *P. larvae***;
- Podział pasiek doświadczalnych na 4 grupy doświadczalne** - 3 otrzymujące 4-krotnie w odstępach 7-dniowych syrop sacharozowy (20-50% m/v) z dodatkiem ApiBiotic (1,5%-100% v/v) w formie: pokarmu (Gr. I), nakraplania uliczek międzyramkowych (Gr. II), oprysku ramek (Gr. III). Grupa IV – kontrolna, otrzymująca tylko syrop; regularne prowadzenie przeglądów, monitorowanie cech użytkowych, zachowania, rozwoju, parametryzacja w skali punktowej. Pobór próbek larw ze wszystkich grup do diagnostyki *P. larvae*, z potwierdzeniem MALDI-TOF/MS;



Zaaplikowano pilotażowe preformulacje prototypów produktu do pasiek i przeskalowano produkcję do skali półtechnicznej

Układ doświadczalny (kombinacje)	Eksperyment 1 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 2 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 3 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 4 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 5 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 6 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 7 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 8 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 9 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 10 (4 pasieki badawcze)
	Warianty aplikacyjne:									
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	A1+B1	A1+B2	A1+B3	A2+B1
	Pasieki aplikacyjne:									
	NB01 NB02 PZ01 PZ02	NB03 NB04 PZ03 PZ04	NB05 NB06 PZ05 PZ06	NB07 NB08 PZ07 PZ08	NB09 NB10 PZ09 PZ10	NB11 NB12 PZ11 PZ12	NB13 NB14 PZ13 PZ14	NB15 NB16 PZ15 PZ16	NB17 NB18 PZ17 PZ18	NB19 NB20 PZ19 PZ20

Układ doświadczalny (kombinacje)	Eksperyment 11 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 12 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 13 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 14 (4 pasieki badawcze)	Eksperyment 15 (4 pasieki badawcze)	*Dodatkowy Eksperyment 16 (3 pasieki badawcze)
	Warianty aplikacyjne:					
	A2+B2	A2+B3	A3+B1	A3+B2	A3+B3	C
	Pasieki aplikacyjne:					
	NB21 NB22 PZ21 PZ22	NB23 NB24 PZ23 PZ24	NB25 NB26 PZ25 PZ26	NB27 NB28 PZ27 PZ28	NB29 NB30 PZ29 PZ30	PZ31 PZ32 NB28 – II pasieka NB31

Skład każdego układu doświadczalnego – eksperymentu (4 pasieki*):		
T	1 pasieka testowa potencjalnie zagrożona i obciążona (z nadkażeniem bakteryjnym)	Podanie preparatu według wariantu
T	1 pasieka testowa potencjalnie zdrowa	Podanie preparatu według wariantu
K	1 pasieka kontrolna potencjalnie zagrożona i obciążona (z nadkażeniem bakteryjnym)	Bez preparatu
K	1 pasieka kontrolna potencjalnie zdrowa	Bez preparatu

*Każda pasieka składa się z min. 5 uli. Dla najlepszego efektu najlepiej użyć produkt w przeciągu 6 miesięcy od otwarcia opakowania.

Norma ISO 750:1998	Kwas jabłkowy	Kwas szczawiowy	Kwas cytrynowy jednowodny	Kwas winowy	Kwas siarkowy	Kwas octowy	Kwas mlekowy	Kwas cytrynowy
FAKTORY do przeliczeń zawartości konkretnych kwasów	0,067	0,045	0,07	0,075	0,049	0,06	0,09	0,064

Wybrano formulację preparatu najlepiej zabezpieczającą rodziny pszczele przed zakażeniem



- Przeanalizowanie kart ulowych, protokołów doświadczalno-obserwacyjnych z 64 pasiek, na podstawie których wytypowano formulacje o wysokim potencjale względem rozwoju rodzin pszczelich;
- Przeanalizowanie wyników diagnostyki mikrobiologicznej i redukcji *P. larvae* z 486 rodzin pszczelich, na podstawie których wytypowano formulację o wysokim potencjale przeciwdrobnoustrojowym w warunkach terenowych;
- Odrzucenie formulacji wyrobu, które nie zabezpieczyły rodzin pszczelich przed nabyciem lub/i rozwinięciem się zakażenia;
- Ocena rozwoju wiosennego rodzin, wydajności, oddziaływania preformulacji w ujęciu całego sezonu, włączenie pszczelarzy w proces oceny i testowania, zabezpieczenie materiału biologicznego do posiewów celem oceny skuteczności pilotażowego preparatu;
- Sporządzenie dokumentacji uwzględniającej analizę wpływu aplikacji preparatu na cechy użytkowe rodzin pszczelich takie jak: zimotrwałość, produkcja miodu, agresywność, rozwój, siła, kondycja i rojliwość. Parametr siły i kondycji odnosił się do liczby zaczerwionych ramek;
- **Ocena wskaźników:** zmiany masy uli poprzez pomiar wagowy i zimotrwałość rodzin pszczelich, analiza zmian behawioralnych pszczół (nadpobudliwość pszczół, pełzanie, podejmowanie aktywności lotnej bądź niemożność latania) monitoring wkładki dennicowej, obserwacja aktywności lotnej 1 raz w tygodniu przez 5 min., po podaniu preparatu, na podstawie rejestrowania liczby pszczół powracających do ula.

Wykonano selekcję pasiek odpowiadającym wymogom protokołu badawczego

DANE LICZBOWE

Badania funkcjonalności preparatu przeprowadzono na 486 rodzinach pszczelich w PL (skupionych w 37 pasiekach), 20 na Litwie, 87 w UK

Dane pasiek objęte są anonimowością ze względu na RODO

**Pre-screening przesiewowy:
981 rodzin pszczelich: 801 w PL (skupionych w 43 pasiekach), 36 na Litwie, 34 w Republice Czeskiej, 110 w UK**

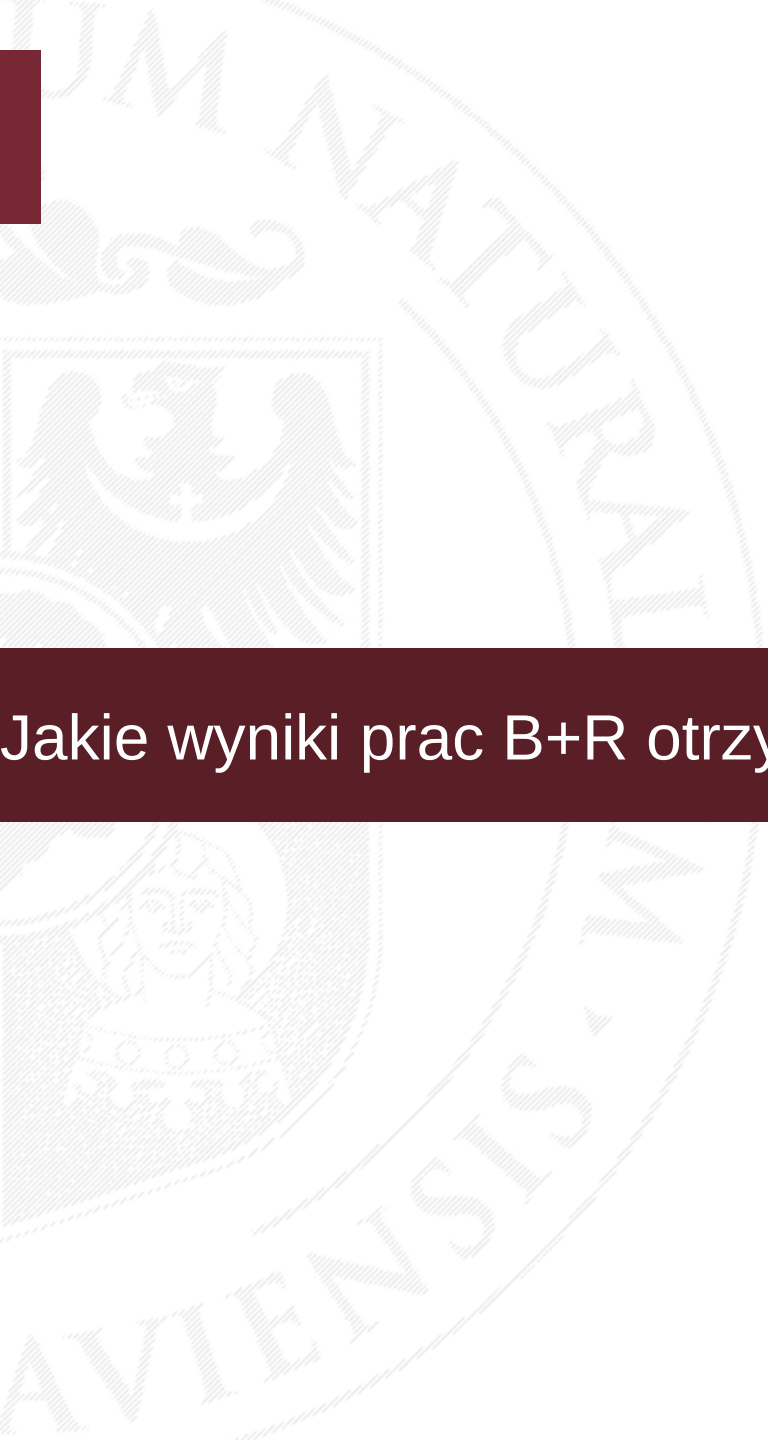
Przeskalowano produkcję do skali przemysłowej, rozpoczęto próby przechowalnicze, oceniono wpływ preparatu na rodziny pszczele w ujęciu całego sezonu, opracowano metodykę aplikowania wyrobu i przeanalizowano jego skuteczność w warunkach *in vivo*.



- **Otrzymanie preparatu w objętości 10 000 L**, przeprowadzenie kontroli jakości (OLD, LAB, grzyby, patogeny, Brix, ORP, pH, zawartość cukrów, HMF, analiza kwasowości i metabolitów);
- **Wyliczenie dawki i długości trwania aplikacji w oparciu o wszystkie dane laboratoryjne** (MIC, MBC, Time-kill) i terenowe (pora roku, okres w sezonie, uwzględnienie praktyki pszczelarskiej)
- **Przeprowadzenie analiz trwałości produktu** w kolejnych interwałach czasowych,
- **Ocena funkcjonalności i parametrów specyfikacji zwolnieniowej;**
- **Ocena parametrów zimotrwałości, siły i kondycji w 2 roku stosowania prototypu synbiotyku** - liczby zaczerwionych ramek według skali:: bardzo dobra (ponad 10 ramek wielkopolskich, 3-4 punkty), dobra (7–10 ramek wielkopolskich, 2 punkty) oraz słaba (mniej niż 7 ramek wielkopolskich 0-1 punktów);
- **Ostatni pobór próbek czerwii i miodu celem analizy kinetyki zmian w liczebności *P. larvae*** i oceny efektu protekcyjnego;
- **Analizy statystyczne mikrobiomów rodzin pszczelich;**

Przygotowano symulację wdrożenia synbiotyku na rynek

- Opracowanie publikacji naukowych, ulotek, broszur informacyjnych i materiałów dydaktycznych;
- Nadanie nazwy dla otrzymanego wyrobu synbiotycznego;
- Wydanie w formie pisemnej metodyki, dawkowania i sposobów aplikacji synbiotyku z uwzględnieniem aspektów praktyki pszczelarskiej;
- Pozyskanie zgody na sygnowanie wyrobu logotypem i informacją o współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu;
- Pozyskanie zgody na sygnowanie wyrobu badaniem jakości w Instytucie Technologii Mikrobiologicznych w Turku;
- Opracowanie etykiety, wzoru opakowania i zaplanowanie kalendarium z formami promocji produktu;
- Zgłoszenie wprowadzenia do obrotu synbiotyku w Powiatowym Inspektoracie Weterynarii w Turku;
- Aktywny udział w konferencjach naukowych, szkoleniach i sympozjach pszczelarskich;
- Wdrożenie produktu synbiotycznego do oferty przedsiębiorstwa ProBiotics Polska;
- Poinformowanie interesariuszy i dystrybutorów o zakończeniu procesu B+R i wprowadzeniu produktu synbiotycznego na rynek pszczelarski.



Jakie wyniki prac B+R otrzymano na poszczególnych etapach?

Na początku opracowano 9 wyjściowych mieszanin o wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej względem *P. larvae* w warunkach *in-vitro*

1:	2:	3:	4:	5:	6:	7:	8:	9:
<i>Parasaccharibacter apium</i>, <i>Lactobacillus amylovorus</i> I, <i>Lactobacillus amylovorus</i> II, <i>Lactobacillus apis</i>, <i>Lactobacillus meliventris</i>, <i>Apilactobacillus apinorum</i>	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Gilliamella apicola</i> <i>Snodgrassella alvi</i> <i>Actinomadura apis</i> <i>Bartonella apis</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptomyces rimosus</i> <i>Streptomyces narbonensis</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Lactobacillus fructivorans</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus constellatus</i> <i>Lactobacillus melifer</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Ligilactobacillus salivarius</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus amylovorus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Lactobacillus kullabergensis</i> <i>Lactobacillus helsingborgensis</i> <i>Bombilactobacillus mellis</i> <i>Lactobacillus apis</i> <i>Lactobacillus melliventris</i> <i>Lactobacillus panisapum</i> <i>Apilactobacillus apinorum</i> <i>Lactobacillus kimbladai</i> <i>Bombilactobacillus mellifer</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Lactocaseibacillus casei</i> <i>Levilactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus farciminis</i> <i>Lactobacillus panisapum</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Bifidobacterium coryneforme</i> <i>Bifidobacterium asteroides</i> <i>Bifidobacterium animalis</i>
Liść yerba mate, liść wawrzynu szlachetnego, ziele bylicy bożego drzewka, liść wierzby białej, liść orzecha włoskiego, pączki sosny zwyczajnej, liść brzozy brodawkowatej, liść oliwki europejskiej, liść dębu szypułkowego, owoc ziela angielskiego, liść rukwi wodnej, kwiat nagietka lekarskiego, liść nasturcji wysokiej, pączki topoli czarnej	Lebiodka amerykańska, Eukaliptus cynereus, Gnaphalium, Turbinata, Szanta zwyczajna, Miętolisna werbenowata, Lebiodka pospolita, Aksamitka drobnokwiatowa, Tymianek pospolity, Ziele glistnika jaskółcze ziele	Ruta zwyczajna, Macierzanka piaskowa, Lawenda wąskolistna, Bylica piołun, Jeżówka purpurowa	Kora dębu szypułkowego, Kora dębu bezszypułkowego, Kora wierzby białej, Kora kruszyny pospolitej, Kora kasztanowca zwyczajnego, Pączki brzozy brodawkowatej, Tawuła wiązolistna, Wiązówka błotna, Przywrotnik pospolity	Ziele bylicy bożego drzewka, liść wierzby białej, liść orzecha włoskiego, pączki sosny zwyczajnej, liść brzozy brodawkowatej, liść oliwki europejskiej, liść dębu szypułkowego, owoc ziela angielskiego, liść rukwi wodnej, Lawenda wąskolistna, Bylica piołun, Jeżówka purpurowa	Owoc jałowca pospolitego, Ziele oman wielki, Ziele dziewanny wielkokwiatowej, Ziele rdestowca japońskiego, Ziele szczawiu zwyczajnego, Ziele lebiodka białej, Ziele tasznika pospolitego	Tarnina, Głóg jednoszyjkowy, Dzika róża, Czeremcha zwyczajna, Kora granatu	Pieprz ribesiody, Pieprz sarmentozny, Goździkowiec korzenny, Mirt pospolity, Chmiel zwyczajny, Ziele przetacznika lekarskiego, Ziele fiołka trójbarwnego, Liść nasturcji wysokiej, Pączki topoli czarnej	Liść dębu szypułkowego, owoc ziela angielskiego, liść rukwi wodnej, kwiat nagietka lekarskiego, liść nasturcji wysokiej, pączki topoli czarnej, Ziele glistnika jaskółcze ziele, Ziele krwawnicy pospolitej, Ziele świerzbnicy polnej

Następnie na poszczególnych etapach dokonywano stopniowej selekcji eliminując wadliwe, pilotażowe kompozycje

1:	2:	3:	4:	5:	6:	7:	8:	9:
	Niemожność namnażania na pożywce przemysłowej	Trudność w ożywianiu i namnażaniu szczepów, <1000 jtk/ml				Znikoma aktywność przeciwdrobnoustrojowa; Niska aktywność metaboliczna		

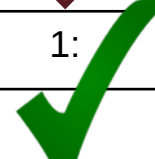


1:	4:	5:	6:	8:	9:
	Pre-formulacja ulega zakażeniom; Wzrost <i>Clostridiales</i> w mikrobiomie ula po aplikacji		Trudność w przeskalowaniu preformulacji; Pre-formulacja niestabilna (pH>4.0); Brak surowców roślinnych do większej produkcji;	Wysoka toksyczność wobec pszczoł, LD50=10% v/v; Gwałtowna redukcja LAB;	

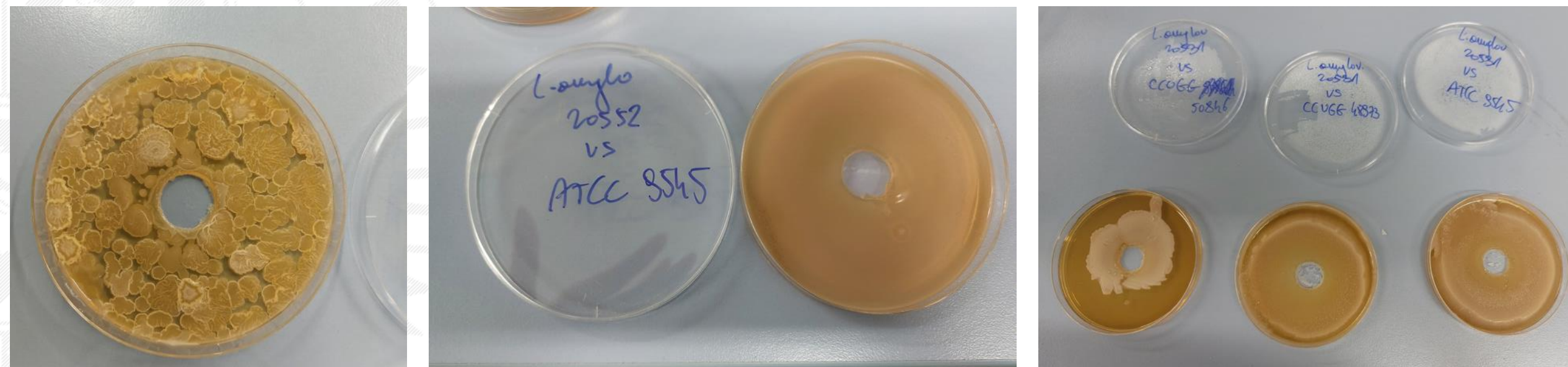


1:	5:	9:
	Brak primingu immunologicznego; Brak redukcji <i>P. larvae</i> w warunkach terenowych;	Brak dostatecznego rozwoju rodziny pszczoły; pogorszona zimotrwałość; brak redukcji <i>P. larvae</i> w warunkach terenowych



1:


Sprawdzano również relację odwrotną - czy *P. larvae* nie powoduje ograniczania wzrostu killerowych bakterii probiotycznych



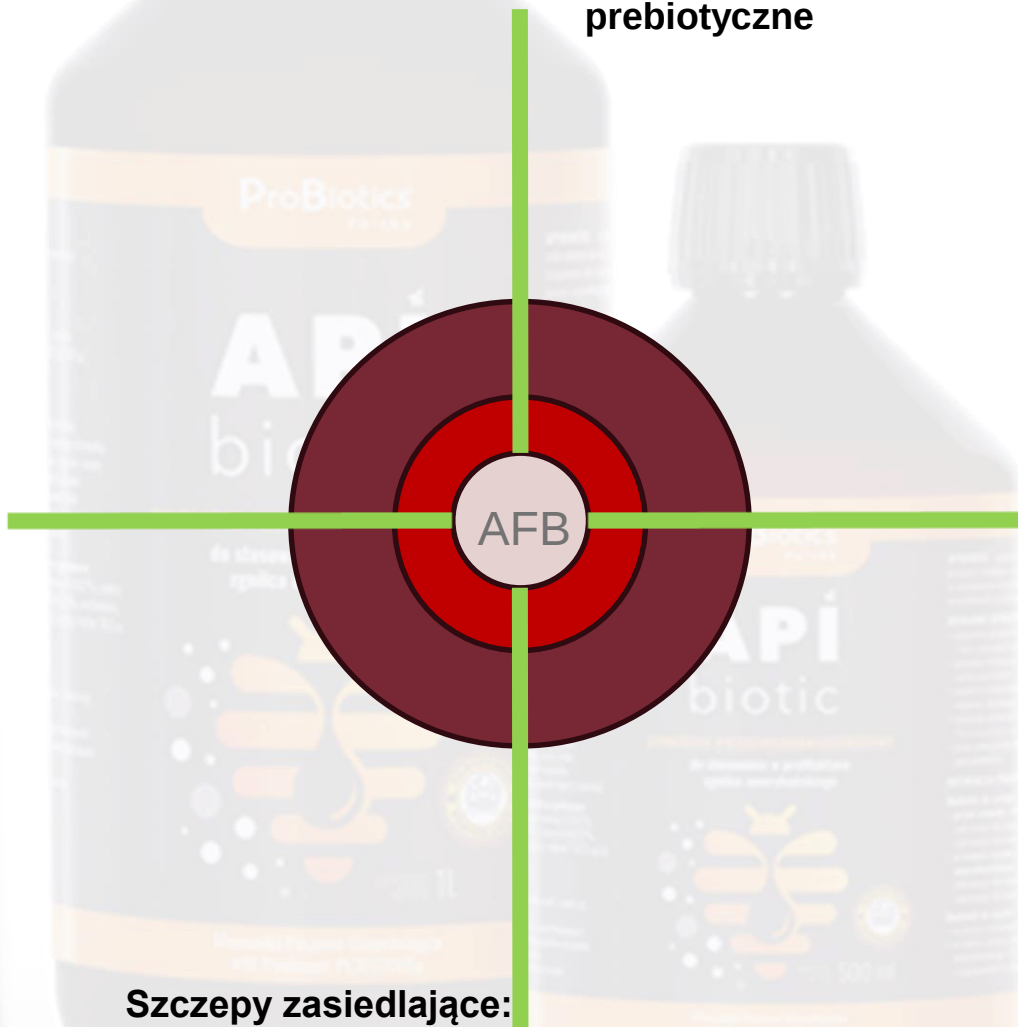
Rycina 5. Nieskuteczna próba zahamowania wzrostu killerowych szczepów bakterii kwasu mlekowego będących komponentami wyrobu ApiBiotic przy użyciu inokulantów *P. larvae* (badanie antagonizmów).

Wypracowano końcową formułę preparatu z synergicznie działającymi komponentami

Mieszanka surowców roślinnych (antagonistycznych, prebiotycznych):

- liść yerba mate, liść wawrzynu szlachetnego;
- ziele bylicy bożego drzewka, liść wierzby białej;
- liść orzecha włoskiego, pączki sosny zwyczajnej;
- liść brzozy brodawkowatej, liść oliwki europejskiej;
- liść dębu szypułkowego, owoc ziela angielskiego;
- liść rukwi wodnej, kwiat nagietka lekarskiego;
- liść nasturcji wysokiej, pączki topoli czarnej

Boostery wzrostu i substancje prebiotyczne



Szczepy killerowe (antagonistyczne, redukujące, „czyszczące”):

Parasaccharibacter apium PBP01,
Lactobacillus amylovorus PBP02,
Lactobacillus amylovorus PBP03,
Lactobacillus apis PBP04,
Lactobacillus meliventris PBP05,
Apilactobacillus apinorum PBP06.

Szczepy zasiedlające:

Lactobacillus acidophilus, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium animalis*,
Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*

Uzasadniono na podstawie literatury i badań własnych działanie plejotropowe składników biologicznie czynnych | Model Evidence Based Veterinary Medicine

Liść oliwki europejskiej: oleuropeina, silne działanie przeciwdrobnoustrojowe, blokuje namnażanie się *P. larvae*, osłania larwy pszczoł wytwarzając specjalną powłokę izolującą

Pączki sosny zwyczajnej: monoterpeny, umiarkowane działanie na Gram+, silnie immunogenne, pobudzające układ immunologiczny, zaburzenie funkcjonowania pompy protonowej

Liść yerba mate: polifenole. Ksantyny. umiarkowane działanie antybakteryjne wobec *P. larvae*. w niskich stężeniach wspierać rozwój LAB zwłaszcza działa jako booster wobec *Parasaccharibacter apium*, działa antyoksydacyjnie

Liść nasturcji wysokiej: glukozynolaty, posiada zdolności agregowania komórek bakteryjnych, ułatwia dostęp do błony cytoplazmatycznej drobnoustrojów, działa toksycznie na DNA

Owoc ziela angielskiego: eugenol, działanie bakteriobójcze, otwiera komórki bakteryjne i poddaje ich treść cytoplazmatyczną na związki przeciwdrobnoustrojowe

Liść brzozy brodawkowatej: flawonoidy, zapobiega wytwarzaniu zarodników *P. larvae*, unieczynnienie ruchliwości *P. larvae*. Dochodzi do perforacji i permeabilizacji błony komórkowej

Liść wawrzynu szlachetnego: eugenol, cineol, działa nieselektywnie oczyszczając inne drobnoustroje patogenne, chroniące *P. larvae*, osłabia działanie blokerów antagonistycznych

Kwiat nagietka lekarskiego: polisacharydy, saponiny stymuluje *Lactobacillus*, działa przeciwzapalnie (pośrednio ogranicza patogeny), pobudza odporność pszczoł i ich larw

Liść rukwi wodnej: glukozynolaty, polisacharydy, sprzyja wzrostowi LAB, jednocześnie ogranicza patogeny oportunistyczne w czasie superinfekcji

Liść dębu szypułkowego: garbniki, hamuje wzrost i adhezję bakterii, bakteriostatyczny, utrudnia zagnieżdżanie się komórek bakteryjnych w larwach

Liść ziele bylicy bożego drzewka: tujon, kamfora, terpeny. silne działanie antybakteryjne (Gram+). Dezintegruje biofilm bakteryjny, zmniejsza energię w postaci ATP, która niezbędna jest dla ruchu rzęsek.

Pączki topoli czarnej: flawonoidy, kwasy fenolowe (propolisowy profil), silny inhibitor wzrostu i namnażania się *P. larvae*, długotrwały efekt przeciwdrobnoustrojowy, najdłużej trwale związki antybiotyczne

Liść wierzby białej: salicylany, modulator środowiska, otwiera komórki i tkanki, uwrażliwia, odsłania, dezintegruje, pozwala lepiej przechodzić substancjom aktywnym do wnętrza, zmienia potencjał ORP, rozkurcza

Liść orzecha włoskiego: juglon, silny antybakteryjny, wybiórczy, i przeciwgrzybiczy – asekuruje holobiom w trakcie przebudowywania mikrobiomu pszczoł, zapobiega kiełkowaniu zarodników

Apilactobacillus apinorum: ochrona jelita tylnego, utrzymuje integralność nabłonka, ogranicza przenoszenie patogenów przez karmicielki, bardzo silne działanie immunomodulujące, regulacja ekspresji genów odpornościowych, silna inhibicja wzrostu *P. larvae*, zakwaszanie + bakteriocyny, ważny element odporności zbiorowej.

Przeanalizowano wyniki chromatograficzne podobnych wyrobów ProBiotics Polska

1. ANALIZA HPLC (preparat Z. Zieniewicz) mg/L preparatu (preparat liofilizowano, naważkę rozpuszczano w mieszaninie MeOH/H₂O; 1:1 v/v)

Nr próby	GAL	CHL	4-HYD	WAN	3-HYD	KAW	SYR	P-KUM	FER	CYN	ABS	ROS	KWE	MIR	PIN	GAL
1	0,278	0,203	1,456	5,115	1,411	0,184	-----	0,684	0,095	1,779	----	1,334	0,237	1,537	0,544	1,151
2	0,257	0,199	1,470	5,028	1,302	0,196	----	0,709	0,084	1,816	----	1,298	0,283	1,544	0,571	1,095

GAL - kwas galusowy; CHL - kwas chlorogenowy; 4-HYD - kwas 4-hydroksybenzoesowy; WAN - kwas wanilinowy; 3-HYD - kwas 3-hydroksybenzoesowy; KAW - kwas kawowy; SYR - kwas syringowy; P-KUM - kwas p-kumarowy; FER - kwas ferulowy; CYN - kwas cynamonowy; ABS - kwas abscysynowy; ROS - kwas rozmarynowy; KWE - kwercetyna; MIR - mirycetyna; PIN - pinocembryna; GAL - galangina.

1. CAŁKOWITA ZAWARTOŚĆ ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH (METODA KOLORYMETRYCZNA FOLINA-CIOCALTEAU)

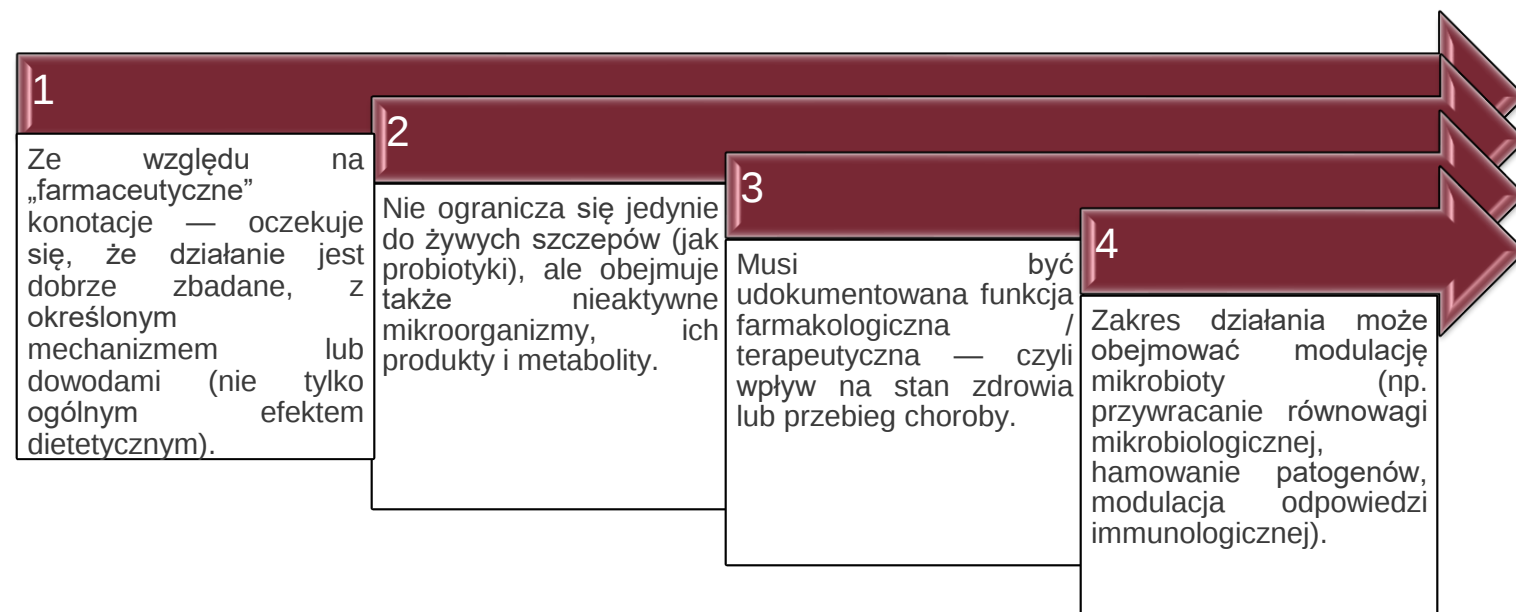
Całkowita zawartość związków fenolowych = $276,48 \pm 21$ [mg GAE/kg $\pm$ RSD], ($n = 3$)

Podano mechanizm działania farmakobiotycznego związków flawonoidowych

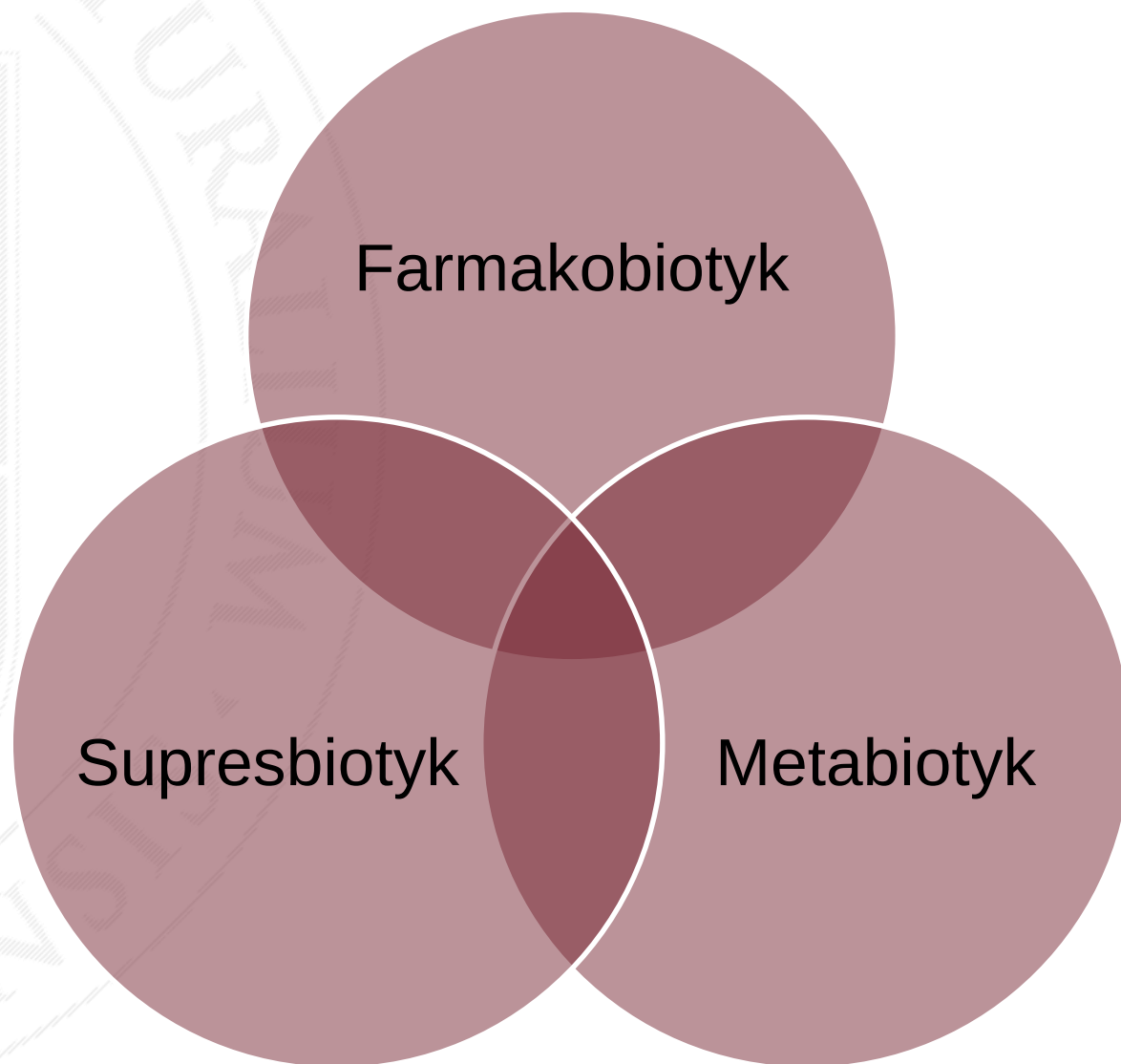
Złożony efekt letalny	Związek	Działanie
Etap I – destrukcja struktury ściany bakteryjnej i błony cytoplazmatycznej na drodze trawienia enzymatycznego przy aktywności amylaz, esteraz i kwasów organicznych	Kwas hydroksybenzoesowy kwas kawowy kwas cynamonowy	Uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej
Etap II – zniszczenie materiału genetycznego komórki mikroorganizmu poprzez odszczepienie reszty fosforanowej od białek przy uczestnictwie fosfataz oraz hydroliza wiązania prowadząca do dezintegracji i fragmentacji DNA	Kwas kawowy + kwercetyna + mirycetyna Kwas p-kumarowy Kwas ferulowy	Dochodzi do perforacji i permeabilizacji błony komórkowej w wyniku czego dochodzi do nadmiernej utraty jonów wodorowych i potasowych a w rezultacie obniża się potencjał i ciągłość błony. Następstwem tego jest zaburzenie funkcjonowania pompy protonowej i zmniejszenie energii w postaci ATP, która niezbędna jest dla ruchu rzęsek.
Etap III – sukcesywnie postępująca autoliza komórki mikroorganizmu, odsłonięcie treści komórkowej i poddanie jej na działanie bakteriocyn, antybiotyków i poszczególnych substancji bioaktywnych	Kwercetyna, kwas galusowy Galangina	Zdolność bakteriobójcza dzięki hamowaniu aktywności gyrazy DNA u bakterii. Posiada zdolności agregowania komórek bakteryjnych, ułatwia dostęp do błony cytoplazmatycznej drobnoustrojów. Blokowanie iNOS mRNA podczas rozwoju stanu zapalnego.

Empirycznie potwierdzono, że ApiBiotic spełnia definicję farmakobiotyku najnowszej generacji łączącego metabolity pochodzenia roślinnego i bakteryjnego

- Farmakobiotyk (pharmabiotic) to termin obejmujący żywe lub nieaktywne mikroorganizmy, ich składniki (np. struktury komórkowe, fragmenty ścian komórkowych) lub metabolity (produkty wytwarzane przez mikroby), które mają udokumentowany wpływ terapeutyczny lub modulujący mikrobiotę gospodarza w sposób korzystny dla zdrowia lub leczenia chorób;
- W szerszym znaczeniu farmakobiotyki to biologiczne czynniki, związane z mikrobiotą, które mogą być traktowane jako „terapeutyki mikrobiotyczne” — czyli substancje lub byty mikrobiologiczne, które pełnią rolę leku lub współdziałają w leczeniu, przez wpływ na mikroflorę gospodarza;
- W naszym przypadku mechanizm ten został rozpoznany w oparciu o system Evidence Based Medicine (*in vitro*), Evidence Based Management (*ex-vivo*), Evidence Based Practices (*in-vivo*).



Dowodzono, że ApiBiotic jest połączeniem trzech nowoczesnych koncepcji



Sprawdzono funkcjonalność ApiBiotic w kontekście wiedzy naukowej o farmakobiotykach

W przeglądach literaturowych zauważa się, że termin pharmabiotic jest używany raczej w środowisku naukowym jako koncepcja obejmująca żywe mikroorganizmy, ich metabolity lub składniki, z potencjalnym zastosowaniem terapeutycznym, ale nie ma formalnych dokumentów instytucji unijnych (EMA/EFSA), które by tę koncepcję regulowały bezpośrednio (np. w ramach prawa medycznego lub żywnościowego).

W przeglądzie „Recent Insights About Probiotics Related Pharmabiotics in Gastrointestinal Disorders” autorzy określają farmakobiotyki jako „prebiotyki, probiotyki, synbiotyki, paraprobiotyki, postbiotyki, metabiotyki, next-generation probiotics i inne byty mikrobiologiczne lub ich produkty, które mają potencjał działania farmakologicznego poprzez interakcje z mikrobiotą” [<https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-025-10613-3>]

W artykule „Probiotics and pharmabiotics: Alternative medicine or an accepted pharmacological strategy?” sugeruje się, że termin pharmabiotic ma objąć pełen zakres możliwości terapeutycznych, które oferuje mikrobiota — nie tylko żywe mikroby, ale także ich produkty i komponenty [<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3026447/>]

W publikacji „The Pharmacobiotic Potential of the Gastrointestinal Tract” autorzy omawiają, że probiotyki można rozumieć jako szczególny przypadek farmakobiotyków — a farmakobiotyki mogą być definiowane jako „mikroorganizmy lub ich produkty mające właściwości promujące zdrowie lub zapobiegające/odwracające chorobę” w kontekście przewodu pokarmowego [<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10>]

Sprawdzono funkcjonalność ApiBiotic w kontekście wiedzy naukowej o supresbiotykach

Supresbiotyki to dość nowe i jeszcze nieformalnie ustandaryzowane pojęcie, ale w literaturze branżowej i praktyce rolniczej używa się go w kontekście zaawansowanych, wieloskładnikowych preparatów mikrobiologicznych, których celem jest aktywne tłumienie (supresja) patogenów glebowych lub zwierzęcych i odbudowa zdrowia gleby bądź innych holobiontów.

Co zwykle zawiera supresbiotyki?	Główne funkcje supresbiotyków	Supresbiotyki jako aktywna biologia
Można je rozumieć jako wyższą formę biopreparatów, które działają nie tylko stymulująco, ale również ochronnie i stabilizująco - konsorcja pożytecznych bakterii (np. PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, szczepy killerowe, szczepy o zwiększonej sekrecji metabolitów) grzyby antagonistyczne (np. <i>Trichoderma</i>) metabolity, enzymy i naturalne antybiotyki mikroorganizmów substancje humusowe, poprawiające środowisko dla mikrobiomu czasem ekstrakty fermentowane, które zwiększają ich aktywność	Supresja patogenów holobiontów– działanie antagonistyczne, konkurencja o przestrzeń i zasoby, wytwarzanie enzymów rozkładających struktury patogenów. Odbudowa zniszczonego mikrobiomu holobiontów– przywracanie równowagi biologicznej po nadmiernej chemizacji, przesuszeniu czy degradacji. Wzmacnianie odporności roślin– indukowana odporność (ISR), pobudzanie mechanizmów obronnych. Poprawa struktury i aktywności biologicznej holobiontów – większa aktywność enzymatyczna, lepsza mineralizacja resztek, poprawa agregacji. Stabilizacja całego agroekosystemu– działanie nie doraźne, ale systemowe (nasiono – gleba – korzeń – resztki).	Supresbiotyki to biologiczny „budowniczy i obrońca” środowisk biologicznych, który: odbudowuje mikrobiom, hamuje patogeny — i robi to w sposób zintegrowany, wielokierunkowy.

Sprawdzono funkcjonalność ApiBiotic w kontekście wiedzy naukowej o metabiotykach

Do metabiotyków zalicza się m.in.:	• krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (np. octan, maślan) • biosurfaktanty • enzymy • hormony roślinne (cytokininy, auksyny) • antybiotyki biologiczne • hormony roślinne (cytokininy, auksyny) • siderofory • kwasy organiczne • poliaminy • peptydy i białka sygnałowe
Metabiotyki – biologia zaawansowana	• Metabiotyki to pojęcie stosowane głównie w kontekście mikrobiologii, probiotyków i zdrowia roślin/gleby, choć pierwotnie pojawiło się w naukach medycznych. To nie żywe bakterie, lecz ich produkty/metabolity mające efekt probiotyczny lub biostymulujący. • Metabiotyki to bioaktywne metabolity wytwarzane przez mikroorganizmy, które mają korzystny wpływ na organizm (człowieka, zwierzęcia lub rośliny), mimo że same mikroorganizmy nie muszą być obecne.
Inne funkcje	• Bioaktywne substancje pochodzenia mikrobiologicznego, które wspierają wzrost roślin, poprawiają kondycję gleby, zwiększają odporność na stres, hamują patogeny (bez konieczności stosowania innych inhibitorów)

Wyznaczono parametry MIC i MBC dla wszystkich składników biologicznie czynnych w preparacie

Szczep patogenny:	P. larvae ATCC 9545		P. larvae CCUG 50846		P. larvae CCUG 48973	
Metabolity należące do ekstraktu:	MIC [mg/cm³]	MBC [mg/cm³]	MIC [mg/cm³]	MBC [mg/cm³]	MIC [mg/cm³]	MBC [mg/cm³]
Yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	>1000	>1000	500	500	750	750
Liść laurowy (<i>Laurus nobilis</i>)	1000	500	1000	1000	>1000	>1000
Bylica bożego drzewka (<i>Artemisia abrotanum</i>)	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000
Wierzba biała (<i>Salix alba</i>)	>1000	>1000	250	250	>1000	>1000
Orzech włoski (<i>Juglans regia</i>)	500	500	250	750	>1000	>1000
Sosna zwyczajna (<i>Pinus sylvestris</i>)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Brzoza brodawkowata (<i>Betula pendula</i>)	125	125	1000	1000	1000	1000
Oliwka europejska (<i>Olea europaea</i>)	500	500	500	750	1000	>1000
Dąb szypułkowy (<i>Quercus robur</i>)	>1000	>1000	1000	1000	750	750
Ziele angielskie (<i>Pimenta dioica</i>)	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000
Rukiew wodna (<i>Nasturtium officinale</i>)	10	100	750	750	750	750
Nagietek lekarski (<i>Calendula officinalis</i>)	>1000	>1000	750	750	>1000	>1000
Nasturcja wysoka (<i>Tropaeolum majus</i>)	750	750	250	250	>1000	>1000
Topola czarna (<i>Populus nigra</i>)	250	250	1000	>1000	750	750
Mix	10	10	1000	1000	100	100

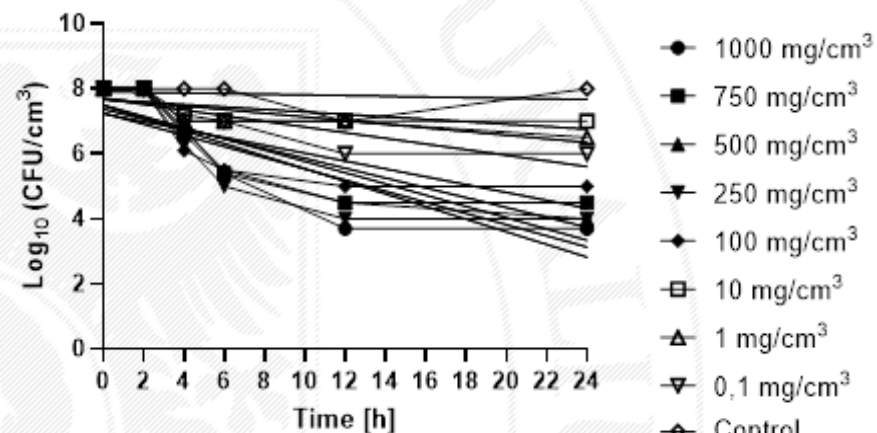
Nazwa szczepu patogennego:	P. larvae ATCC 9545		P. larvae CCUG 50846		P. larvae 48973	
Metabolity należące do szczepu probiotycznego:	MIC [mg/cm³]	MBC [mg/cm³]	MIC [mg/cm³]	MBC [mg/cm³]	MIC [mg/cm³]	MBC [mg/cm³]
<i>Parasaccharibacter apium</i> PBP01	0,100	0,100	500	750	>1000	>1000
<i>Parasaccharibacter apium</i> PBP02	>1000	>1000	1000	1000	>1000	>1000
<i>Lactobacillus amylovorus</i> PBP03	>1000	>1000	750	1000	>1000	>1000
<i>Lactobacillus amylovorus</i> PBP04	100	100	0,100	1,00	100	100
<i>Lactobacillus apis</i> PBP05	>1000	>1000	500	750	100	750
<i>Lactobacillus meliventris</i> PBP06	>1000	>1000	100	100	>1000	>1000
<i>Apilactobacillus apinorum</i> PBP07	1000	1000	500	750	>1000	>1000
<i>Lactobacillus crispatus</i> PBP08	100	1000	>1000	>1000	>1000	>1000
PBP01+PBP03+PBP04+PBP05+PBP06+PBP07	750	750	1000	1000	750	750
PBP01+PBP02+PBP03+PBP04+PBP05+PBP06+PBP07+PBP08	750	750	1000	1000	750	750

Tabela 1. Dane liczbowe z wyznaczonymi parametrami MIC i MBC dla metabolitów poszczególnych czynników probiotycznych wobec 3 genotypów *P. larvae*: ATCC 9545, CCUG 50846, CCUG 48973

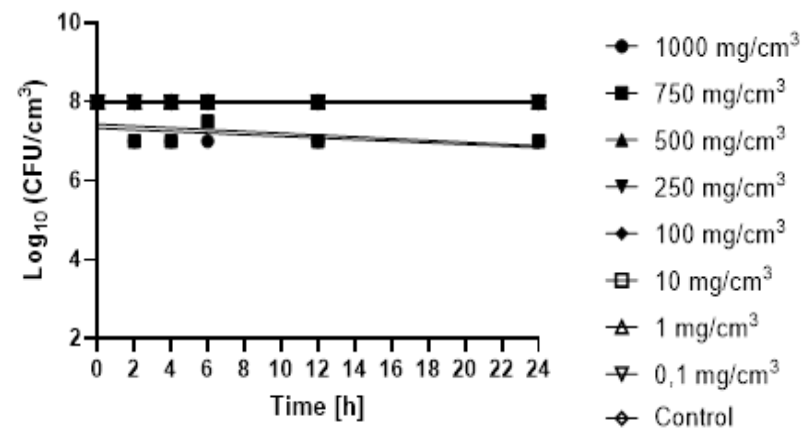
Tabela 2. Dane liczbowe z wyznaczonymi parametrami MIC i MBC dla metabolitów poszczególnych czynników roślinnych wobec 3 genotypów *P. larvae*: ATCC 9545, CCUG 50846, CCUG 48973

Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* dla każdego szczepu probiotycznego

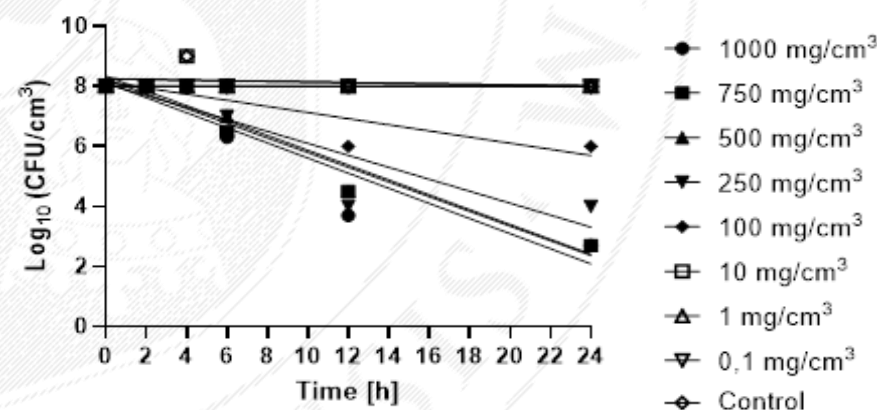
17)



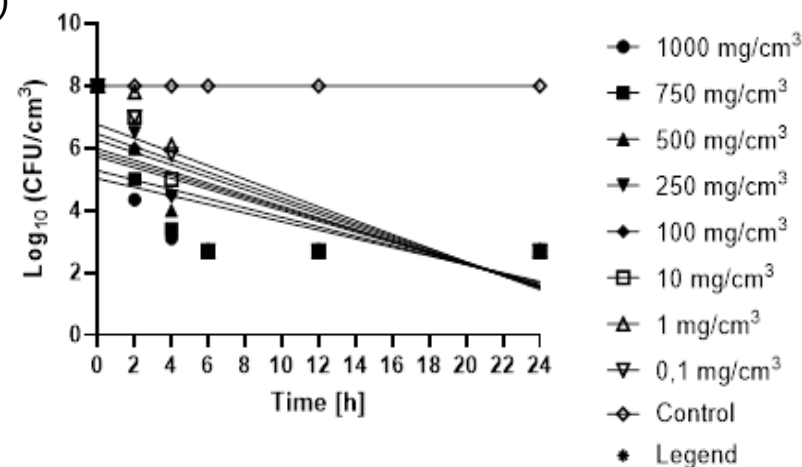
19)



18)



20)

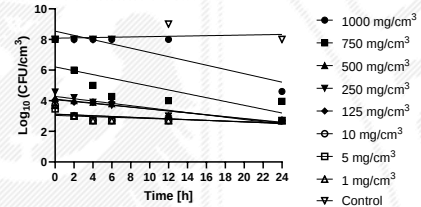


Rysunek 17 – Rysunek 20: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów PBP01 (17), PBP02 (18), PBP03 (19), PBP04 (20) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* CCUG 48973. Na slajdzie przedstawiono tylko przykładowe wyniki dla niektórych szczepów.

Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* dla każdego substratu roślinnego

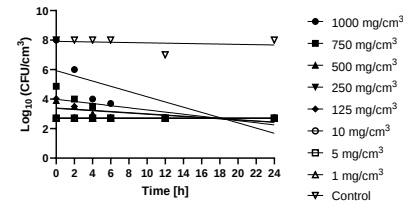
(53)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Watercress bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



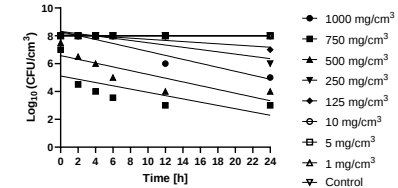
(56)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Silver birch bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



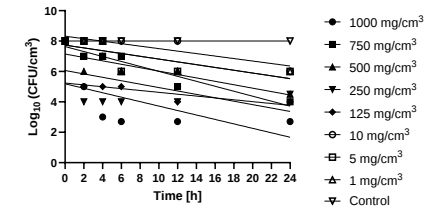
(59)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of European olive bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



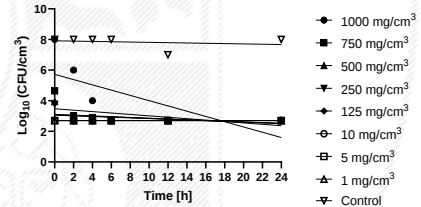
(61)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Nasturtium bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



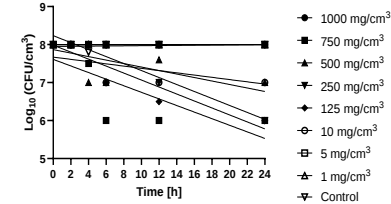
(54)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Yerba mate bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



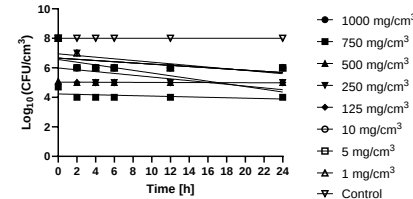
(57)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of White willow bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



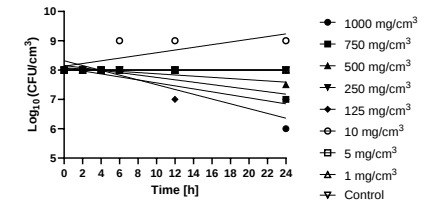
(60)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Laurel bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



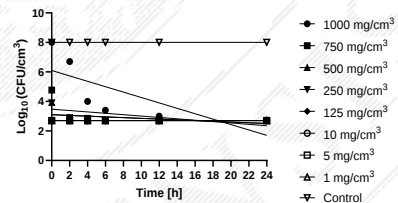
(62)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Walnut bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



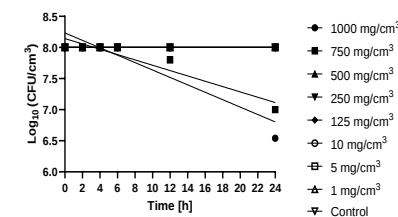
(55)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of English oak bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



(58)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Marigold bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells

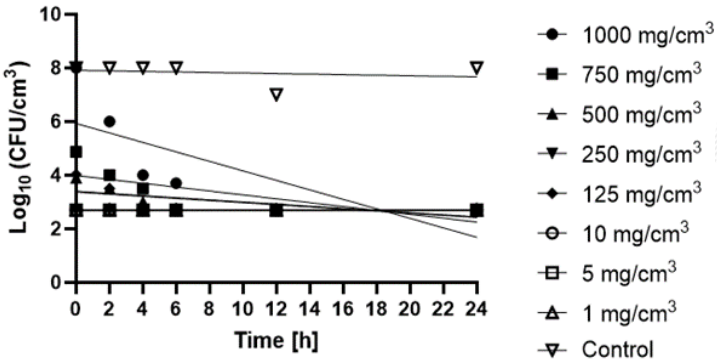


Rysunek 53 - Rysunek 66: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów W (53), YM (54), EO (55), SB (56), WW (57), MD (58), EO (59), L (60), N (61), WT (62), A (63), P (64), M (65), BP (66) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* CCUG 48973. Na slajdzie przedstawiono tylko przykładowe wyniki dla niektórych surowców roślinnych.

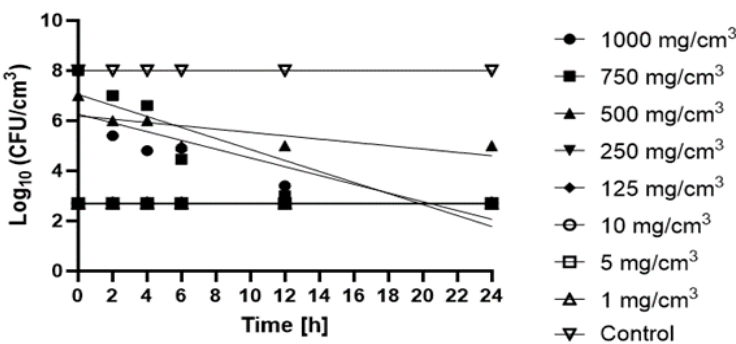
Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* przez kompleksowy skład ApiBiotic

Szczepy patogenne:	<i>P. larvae</i> ATCC 9545 (Eric 1)		<i>P. larvae</i> CCUG 50846 (Eric 2)		<i>P. larvae</i> CCUG 48973 (Eric 3)	
	MIC [mg/cm ³]	MBC [mg/cm ³]	MIC [mg/cm ³]	MBC [mg/cm ³]	MIC [mg/cm ³]	MBC [mg/cm ³]
Metabolity należące do:						
ApiBiotic I (production: 07/2024)	125	250	10	100	100	100
ApiBiotic II (production: 10/2024)	125	250	10	10	125	125
ApiBiotic III (production: 12/2024)	100	125	10	10	100	100

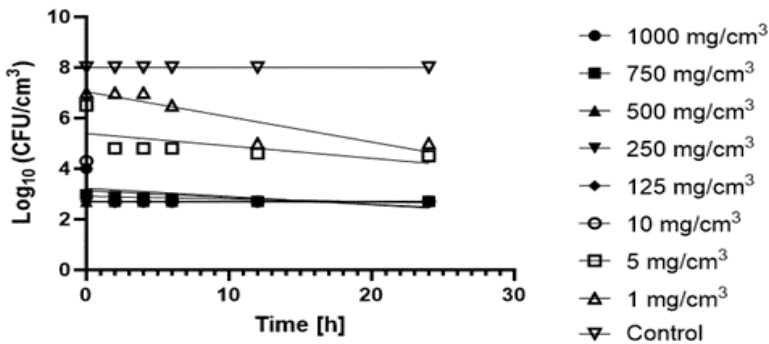
Tabela 3. Dane liczbowe z wyznaczonymi parametrami MIC i MBC dla metabolitów synbiotyku ApiBiotic wobec 3 genotypów *P. larvae*: ATCC 9545, CCUG 50846, CCUG 48973



Rysunek 67. Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów ApiBiotic a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* ATCC 9545.



Rysunek 68. Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów ApiBiotic a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* CCUG 50846



Rysunek 69. Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów ApiBiotic a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* CCUG 48973

Określono aktywność przeciwdrobnoustrojową dla każdego substratu roślinnego i szczepu probiotycznego

Genotyp patogenu	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa, metoda studzienkowo-dyfuzyjna [mm] wobec <i>P. larvae</i>																
	Kontrola (+)	Kontrola (-)	Mix roślinny	Topola	Nagietek	Nasturcja	Dąb	Oliwka	Bylica	Wierzba	Rukiew	Orzech	Laur	Brzoza	Yerba	Sosna	Ziele angielskie
ATCC 9545	0	5	10	1	6	7	8	1	6	2	4	4	6	3	4	10	3
CCUG 50846	0	15	10	5	10	10	15	5	15	5	11	13	13	12	7	12	12
CCUG 48973	0	8	7	7	9	12	8	3	15	8	11	10	12	8	9	7	11

Tabela 4. Wyniki wartości uśrednionych z 4 serii powtórzeniowych aktywności przeciwdrobnoustrojowej z efektem tzw. heat-mapy, przedstawiające aktywność przeciwdrobnoustrojową metabolitów pochodzenia roślinnego wobec genotypów ATCC 9545, CCUG 50846, CCUG 48973, uzyskane metodą studzienkowo-dyfuzyjną według zmodyfikowanych standardów EUCAST.

Genotyp patogenu	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa, metoda studzienkowo-dyfuzyjna [mm] wobec <i>P. larvae</i>											
	Kontrola (+)	Kontrola (-)	Mix probiotyczny	<i>P. apium</i> PPBP01	<i>L. amylovorus</i> PBP03	<i>L. amylovorus</i> PBP04	<i>L. apis</i> PBP05	<i>L. meliventris</i> PBP06	<i>A. apinorum</i> PBP07	<i>P. apium</i> PBP83 (dodatkowo)	<i>L. crispatus</i> PBP70 (dodatkowo)	Odchylenie standardowe SD ± 1.0000
ATCC 9545	0	5	0	0	0	3	1	2	0	0	1	1,1260
CCUG 50846	0	15	11	5	11	10	15	3	5	7	0	4,8107
CCUG 48973	0	8	4	8	2	13	4	6	4	0	3	4,0356

Tabela 5. Wyniki wartości uśrednionych z 4 serii powtórzeniowych aktywności przeciwdrobnoustrojowej z efektem tzw. heat-mapy, przedstawiające aktywność przeciwdrobnoustrojową metabolitów pochodzenia bakteryjnego wobec genotypów ATCC 9545, CCUG 50846, CCUG 48973, uzyskane metodą studzienkowo-dyfuzyjną według zmodyfikowanych standardów EUCAST.

Określono aktywność przeciwdrobnoustrojową dla ApiBiotic

ApiBiotic wobec <i>Paenibacillus larvae</i> ATCC 9545 (Eric 1)	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa, metoda studzienkowo-dyfuzyjna [mm]			Odchylenie standardowe SD ± 1.0000
	Stężenie [%]	Woda	50% sacharoza	60% sacharoza
Kontrola (+)		0	0	0
Kontrola (-)		5	3	3
1		4	4	4
5		5	5	3
10		6	6	6
12,5		10	10	9
25		12	12	12
50		15	15	14
75		21	21	21
100		25	25	25

Tabela 6. Wyniki wartości uśrednionych z 4 serii powtórzeniowych aktywności przeciwdrobnoustrojowej z efektem tzw. heat-mapy, przedstawiające aktywność przeciwdrobnoustrojową metabolitów wyrobu ApiBiotic wobec genotypu ATCC 9545, uzyskane metodą studzienkowo-dyfuzyjną według zmodyfikowanych standardów EUCAST.

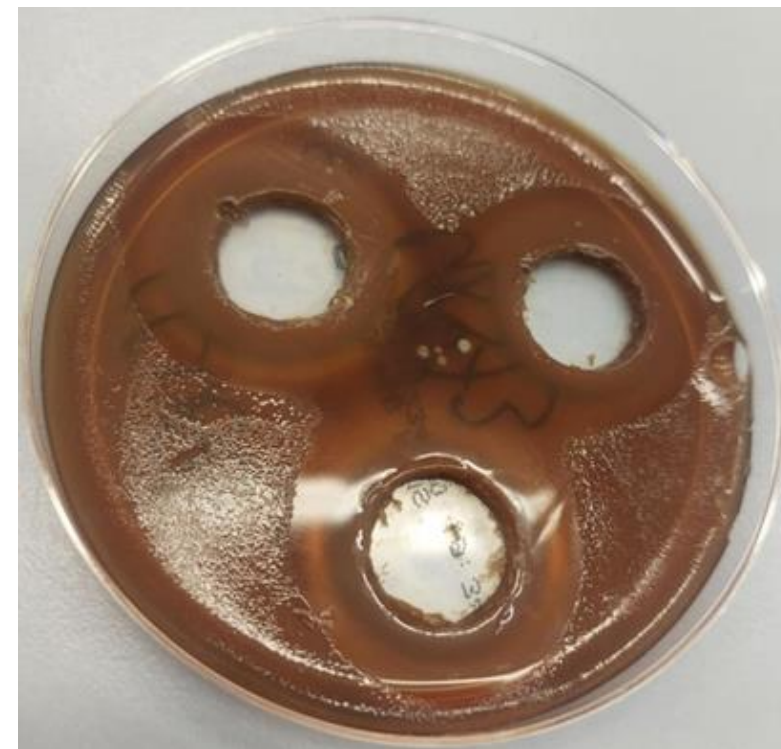
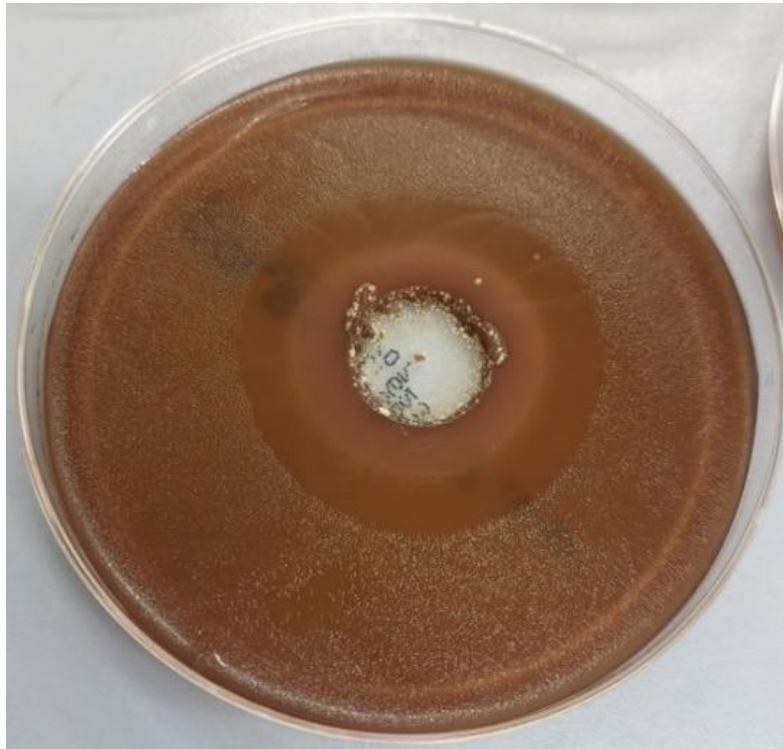
ApiBiotic wobec <i>Paenibacillus larvae</i> CCUG 50846 (Eric 2)	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa, metoda studzienkowo-dyfuzyjna [mm]			Odchylenie standardowe SD ± 1.0000
	Stężenie [%]	woda	50% sacharoza	60% sacharoza
Kontrola (+)		0	0	0
Kontrola (-)		15	7	6
1		3	3	3
5		4	3	4
10		5	5	4
12,5		8	8	8
25		10	9	9
50		13	12	12
75		18	18	18
100		20	20	20

Tabela 7. Wyniki wartości uśrednionych z 4 serii powtórzeniowych aktywności przeciwdrobnoustrojowej z efektem tzw. heat-mapy, przedstawiające aktywność przeciwdrobnoustrojową metabolitów wyrobu ApiBiotic wobec genotypu CCUG 50846, uzyskane metodą studzienkowo-dyfuzyjną według zmodyfikowanych standardów EUCAST.

ApiBiotic wobec <i>Paenibacillus larvae</i> CCUG 48973 (Eric 3)	Aktywność przeciwdrobnoustrojowa, metoda studzienkowo-dyfuzyjna [mm]			Odchylenie standardowe SD ± 1.0000
	Stężenie [%]	woda	50% sacharoza	60% sacharoza
Kontrola (+)		0	0	0
Kontrola (-)		9	5	4
1		2	2	2
5		3	4	4
10		5	5	4
12,5		7	7	6
25		9	9	9
50		11	12	12
75		12	12	11
100		16	17	16

Tabela 8. Wyniki wartości uśrednionych z 4 serii powtórzeniowych aktywności przeciwdrobnoustrojowej z efektem tzw. heat-mapy, przedstawiające aktywność przeciwdrobnoustrojową metabolitów wyrobu ApiBiotic wobec genotypu CCUG 48973, uzyskane metodą studzienkowo-dyfuzyjną według zmodyfikowanych standardów EUCAST.

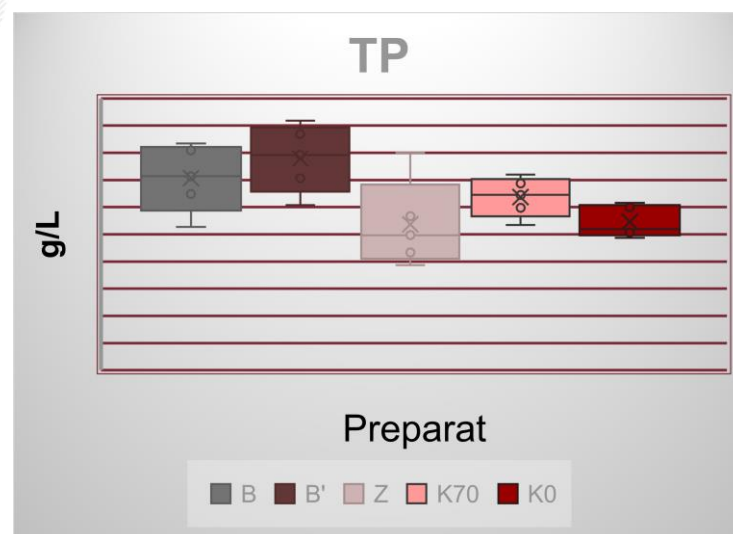
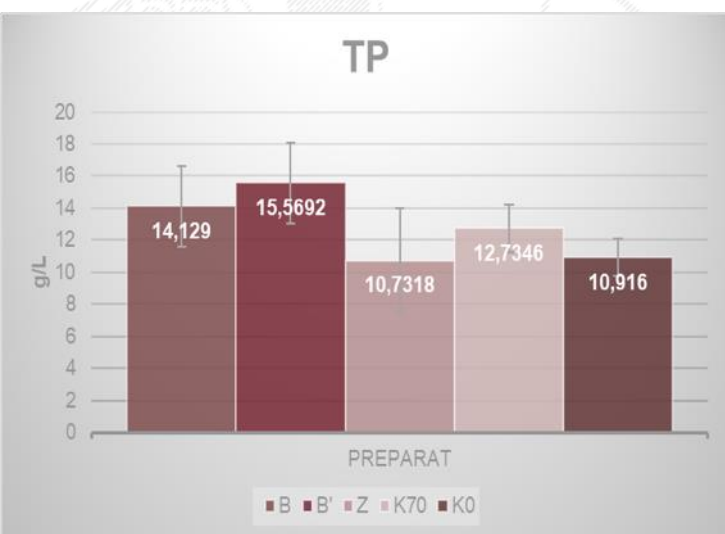
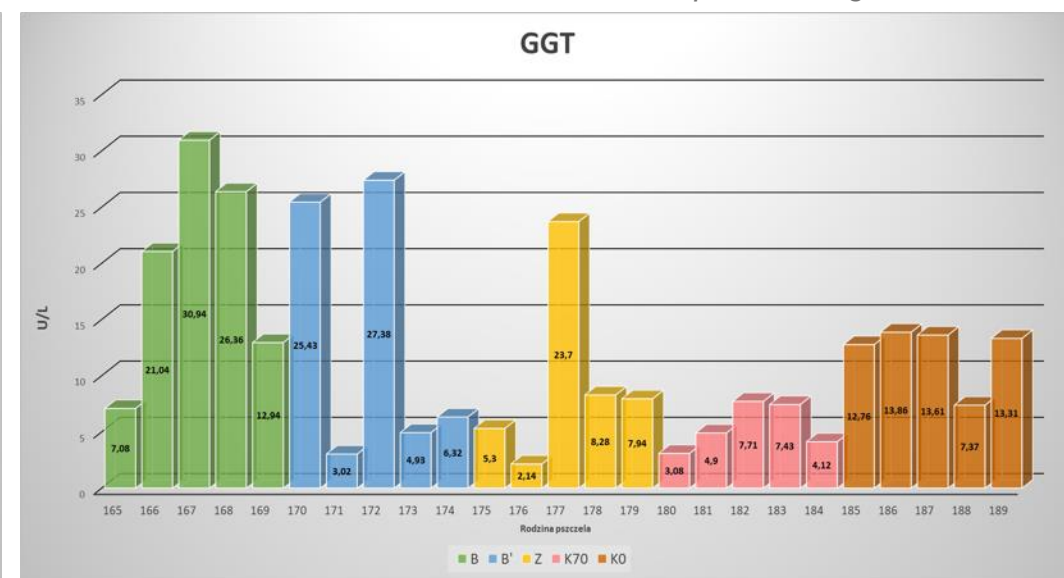
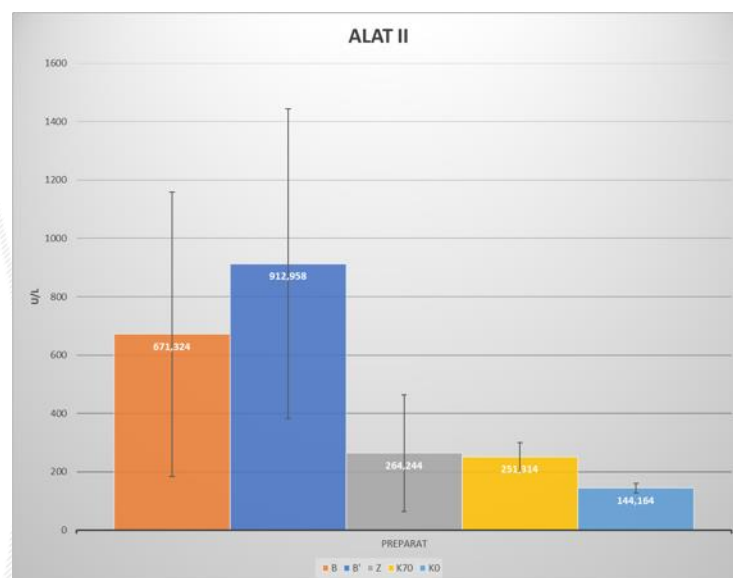
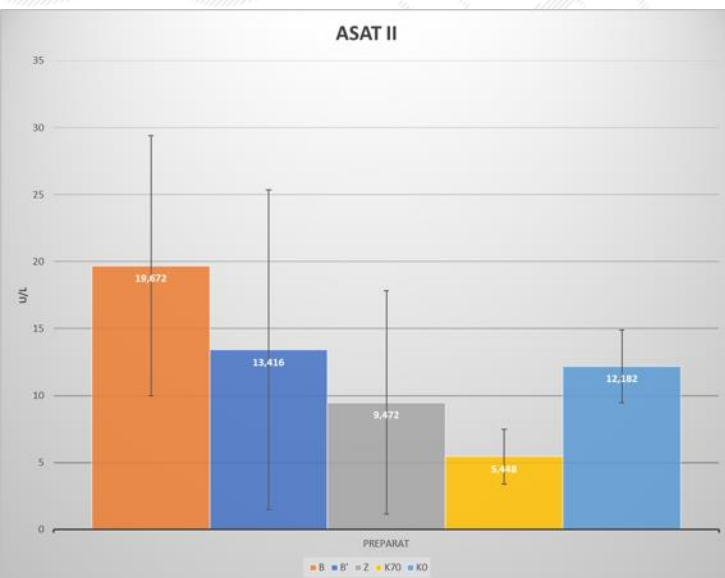
Określono aktywność przeciwdrobnoustrojową dla ApiBiotic



Rysunek 71 – Rysunek 73: Płytki Petriego z podłożem Columbia (agarem krwawym) w czasie testów studzienkowo-dyfuzyjnych według EUCAST z użyciem różnych stężeń preparatu ApiBiotic w kompozycji z nośnikiem cukrowym (50 i 60% sacharoza) wobec *P. larvae* Eric I, Eric II i Eric III po inkubacji (od lewej Rysunek 71, Rysunek 72, Rysunek 73), archiwum własne, fot. Piotr Nowotnik

Udokumentowano znaczący wpływ ApiBiotic na reakcję układu odpornościowego pszczół

Oprac. Remigiusz Błaszczak



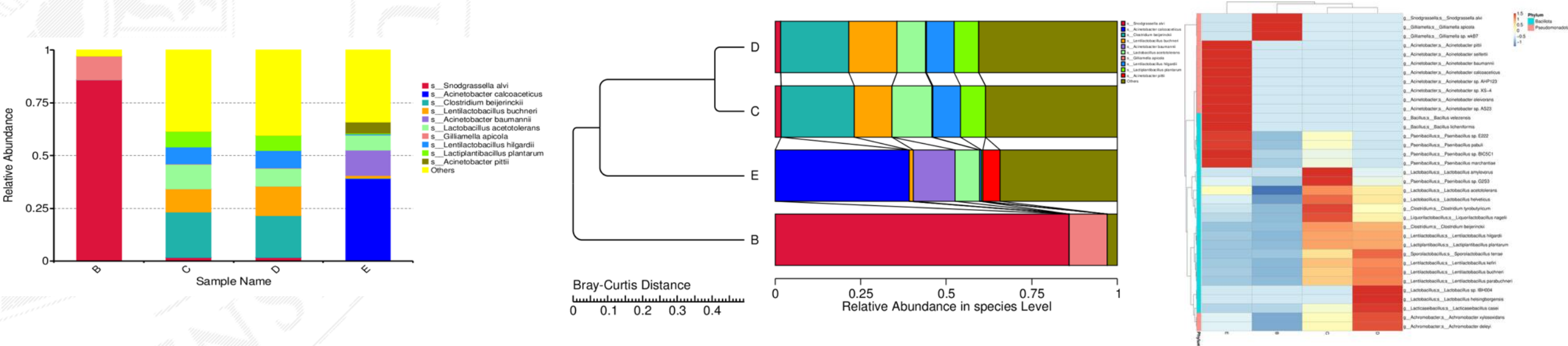
Wykres 2 – Wykres 6. Wartości liczbowe ASAT, TP, ALAT II i GGT w hemolimfie pszczół z grupy testowej i kontrolnej po 3-krotnej aplikacji produktu ApiBiotic do pokarmu.

Preparat ApiBiotic oznaczony symbolami oraz <B'> wyraźnie zwiększa produkcję aminotransferazy asparaginianowej (ASAT) i alaninowej (ALAT) jak również przyczynia się do wzrostu Gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT) i białka całkowitego (TP) a więc może zwiększać produkowanie peptydów odpornościowych u pszczół

Wykluczono negatywny wpływ ApiBiotic na rodzimą mikroflorę pszczół

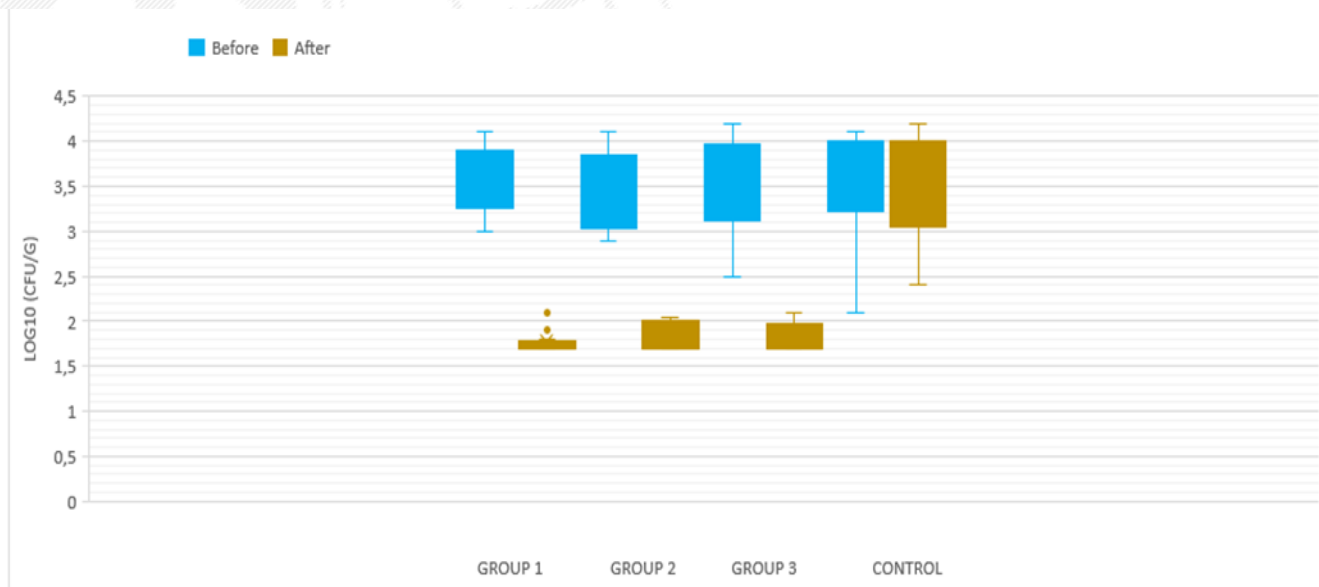
g_Wielerella;s_Wielerella bovis	945.00000	0.0	141.27341	0.0	k_Bacteria;p_Pseudomonadota;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_Neisseriaceae;g_Wielerella;s_Wielerella bovis			
g_Acinetobacter;s_Acinetobacter sp. Y	0.0	0.0	944.96647		k_Bacteria;p_Pseudomonadota;c_Gammaproteobacteria;o_Moraxellales;f_Moraxellaceae;g_Acinetobacter;s_Acinetobacter sp. YH12138			
g_Psychrobacillus;s_Psychrobacillus gla	0.0	934.51823	943.50456	128.91766	k_Bacteria;p_Bacillota;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Bacillaceae;g_Psychrobacillus;s_Psychrobacillus glaciei			
g_Campylobacter;s_Campylobacter co	0.0	871.16106	943.50456	118.60425	k_Bacteria;p_Campylobacterota;c_Epsilonproteobacteria;o_Campylobacteriales;f_Campylobacteraceae;g_Campylobacter;s_Campylobacter coli			
g_Paenibacillus;s_Paenibacillus larvae	0.0	807.80389	938.45908	113.44754	k_Bacteria;p_Bacillota;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_Paenibacillus;s_Paenibacillus larvae			
g_Paenibacillus;s_Paenibacillus sp. FSL	0.0	522.69664	232.09203	934.65305	k_Bacteria;p_Bacillota;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_Paenibacillus;s_Paenibacillus sp. FSL K6-1122			
g_Halalkalibacterium (ex Joshi et al. 202	0.0	934.51823	686.18513	59.302125	k_Bacteria;p_Bacillota;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Bacillaceae;g_Halalkalibacterium (ex Joshi et al. 2022);s_Halalkalibacterium halodurans			
g_Paenibacillus;s_Paenibacillus sp. MN	0.0	934.51823	782.04923	216.58167	k_Bacteria;p_Bacillota;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_Paenibacillus;s_Paenibacillus sp. MMS20-IR301			
g_Monoglobus;s_Monoglobus pectinily	0.0	934.51823	867.82237	60.591301	k_Bacteria;p_Bacillota;c_Clostridia;o_Monoglobales;f_Monoglobaceae;g_Monoglobus;s_Monoglobus pectinilyticus			
g_Evansella;s_Evansella sp. LMS18	0.0	934.51823	802.23115	83.796481	k_Bacteria;p_Bacillota;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Bacillaceae;g_Evansella;s_Evansella sp. LMS18			
g_Paenibacillus;s_Paenibacillus yongine	0.0	934.51823	565.09364	238.49767	k_Bacteria;p_Bacillota;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Paenibacillaceae;g_Paenibacillus;s_Paenibacillus yonginensis			

Rycina 1. Przykładowe wyniki screeningu mikrobiologicznego qPCR celem wytypowania pasiek najbardziej obciążonych presją ze strony *P. larvae*

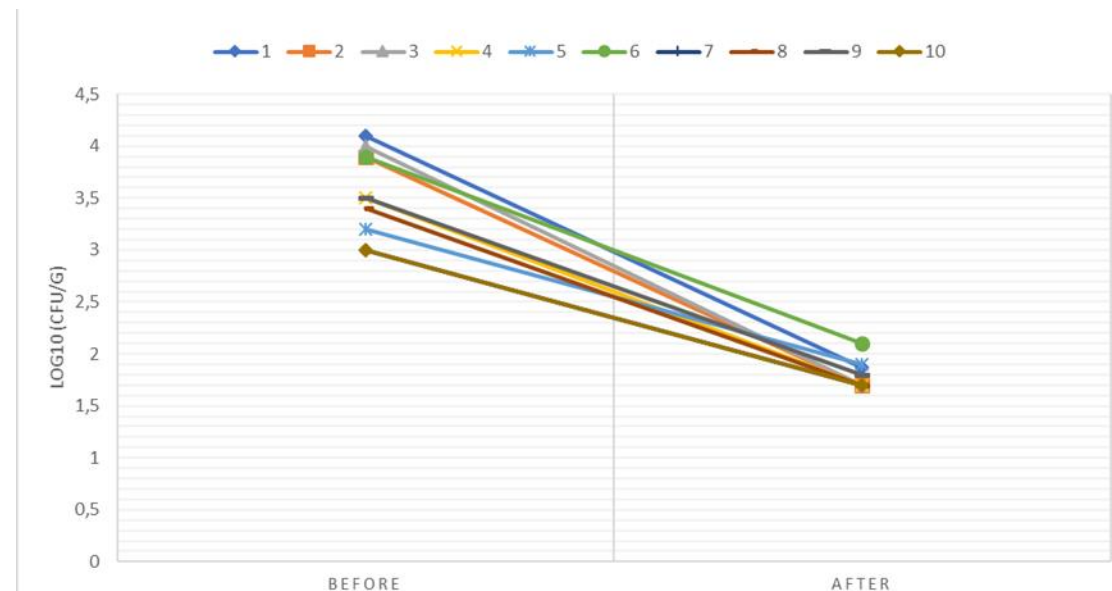


Rycina 2. Przykładowy wynik analizy shotgun obrazujący drzewo filogenetyczne w celu sprawdzenia czy preparat nie zaburza w sposób istotny pierwotnego mikrobiomu larw pszczoły miodnej

Udokumentowano działanie przeciwdrobnoustrojowe preparatu w warunkach *in-vivo*

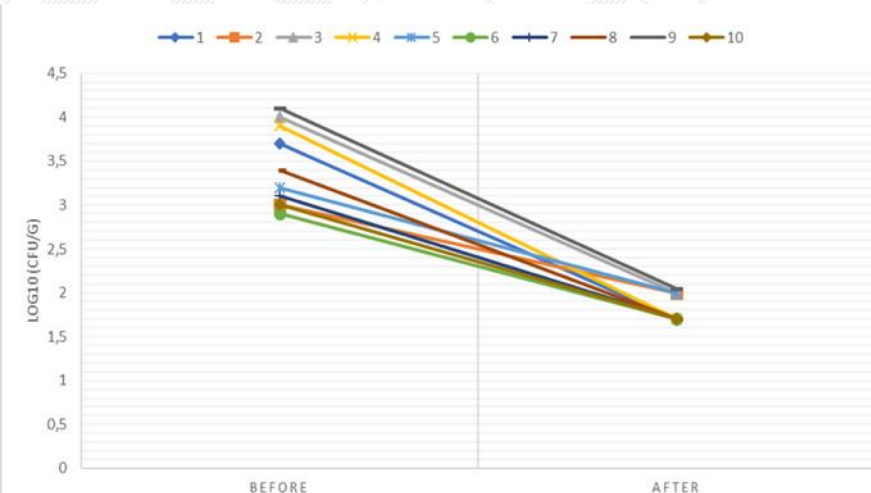


Rysunek 75. Porównanie liczebności *P. larvae* **przed** i **po** zastosowaniu preparatu ApiBiotic w grupach doświadczalnych – przedstawienie w formie wykresu typu boxplot. Widoczne są zmiany liczbowe na osi o-y gdzie po podaniu preparatu liczba bakterii zgnilca amerykańskiego spada we wszystkich trzech grupach 1-3 oznaczających 1-preparat w pokarmie, 2- preparat w formie nakraplania uliczek międzyramkowych i 3-preparat w formie oprysku plastrów gniazdowych.

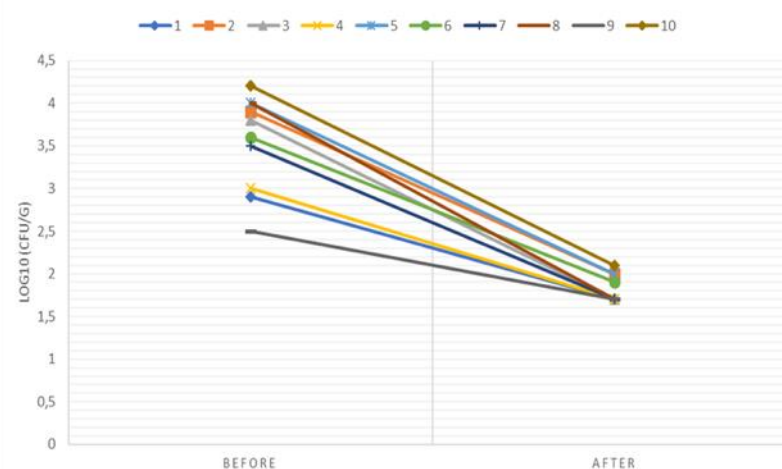


Rysunek 76. Indywidualne reakcje mikrobiomów larw pszczelich z rodzin pszczelich w grupie 1 na aplikację preparatu ApiBiotic przedstawione za pomocą wykresu spaghetti. Widoczne są zmiany liczbowe na osi o-y gdzie po podaniu preparatu liczba bakterii zgnilca amerykańskiego spada we wszystkich ulach 1-10 oznaczających numer kolejny rodzin pszczelich dla grupy przyjmującej preparat w pokarmie.

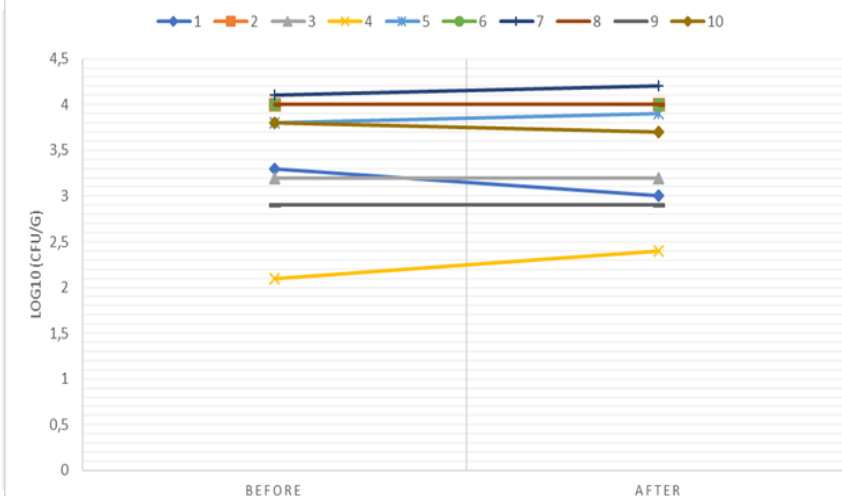
Udokumentowano działanie przeciwdrobnoustrojowe preparatu w warunkach *in-vivo*



Rysunek 77. Indywidualne reakcje mikrobiomów larw pszczoł z rodzin pszczoł w grupie 2 na aplikację preparatu ApiBiotic przedstawione za pomocą wykresu spaghetti. Widoczne są zmiany liczbowe na osi o-y gdzie po podaniu preparatu liczba bakterii zgnilca amerykańskiego spada we wszystkich ulach 1-10 oznaczających numer kolejny rodzin pszczoł dla grupy przyjmującej preparat w formie nakraplania uliczek międzyramkowych.

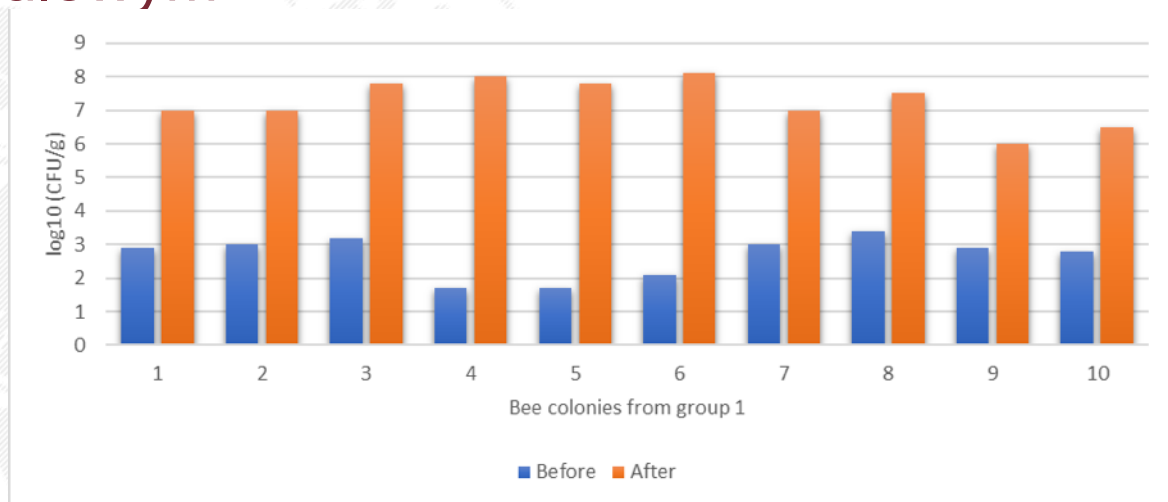


Rysunek 78. Indywidualne odpowiedzi mikrobiomów larw rodzin pszczoł z grupy 3 na aplikację preparatu ApiBiotic przedstawione za pomocą wykresu spaghetti. Widoczne są zmiany liczbowe na osi o-y gdzie po podaniu preparatu liczba bakterii zgnilca amerykańskiego spada we wszystkich ulach 1-10 oznaczających numer kolejny rodzin pszczoł dla grupy przyjmującej preparat w oprysku plastrów gniazdowych.

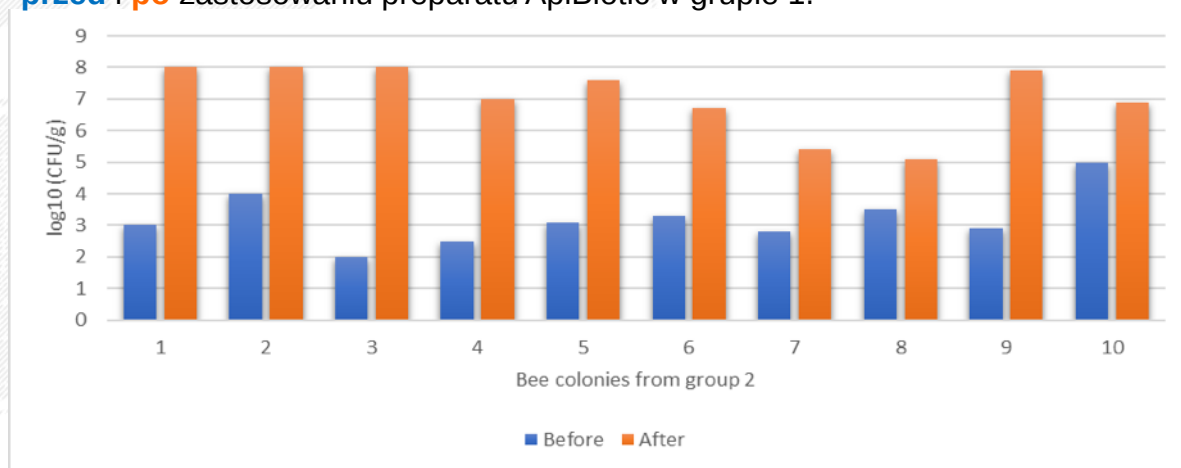


Rysunek 79. Indywidualne odpowiedzi mikrobiomów larw w rodzinach pszczoł z grupy 4, które nie otrzymały preparatu ApiBiotic, przedstawione przy użyciu wykresu spaghetti. Brak zmian liczbowych w obrębie bakterii zgnilca amerykańskiego.

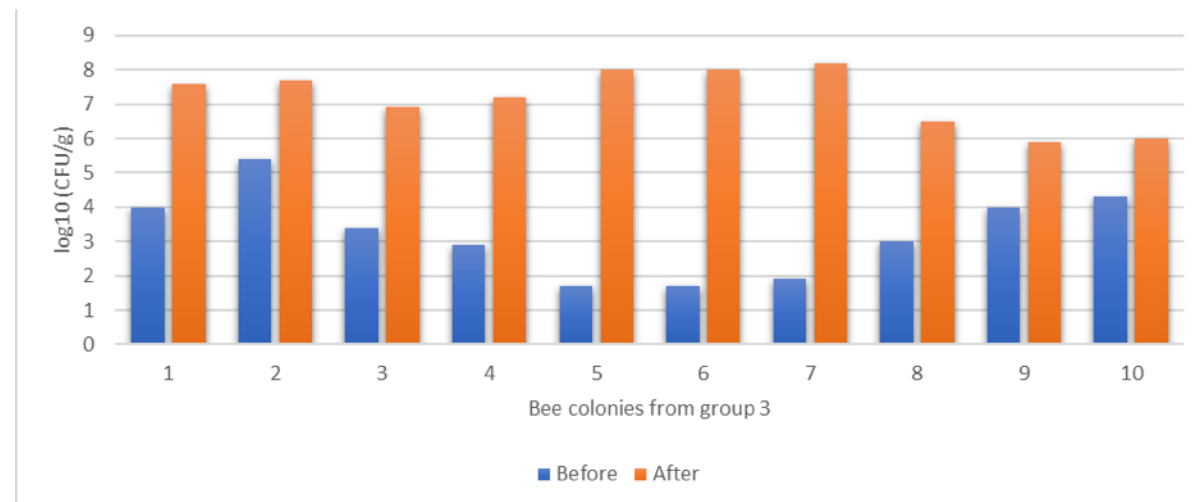
Udokumentowano zagnieżdżenie się komórek bakterii kwasu mlekowego w środowisku ulowym



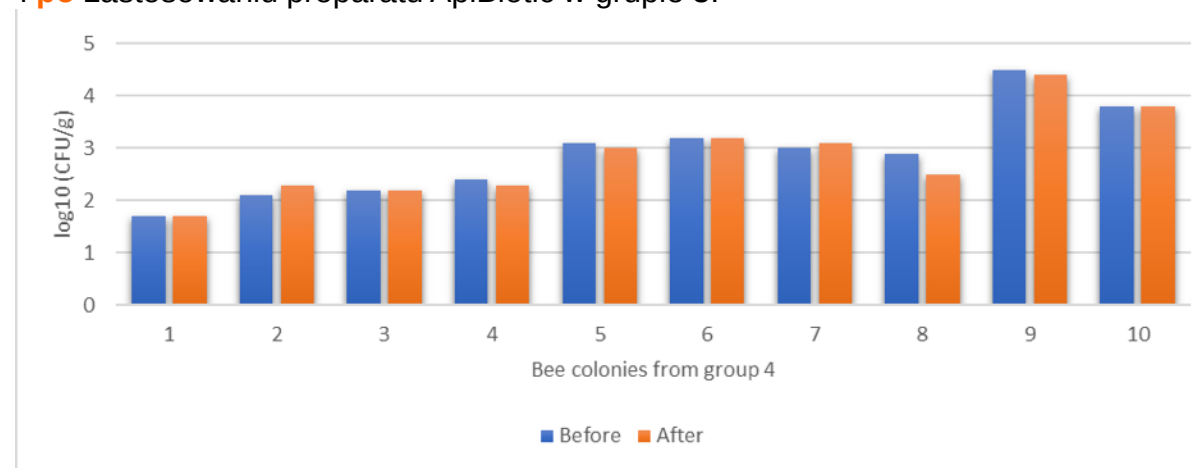
Rysunek 80. Zmiany liczebności bakterii kwasu mlekowego (LAB) w larwach **przed** i **po** zastosowaniu preparatu ApiBiotic w grupie 1.



Rysunek 81. Zmiany liczebności bakterii kwasu mlekowego (LAB) w larwach **przed** i **po** zastosowaniu preparatu ApiBiotic w grupie 2.



Rysunek 82. Zmiany liczebności bakterii kwasu mlekowego (LAB) w czerwiu **przed** i **po** zastosowaniu preparatu ApiBiotic w grupie 3.

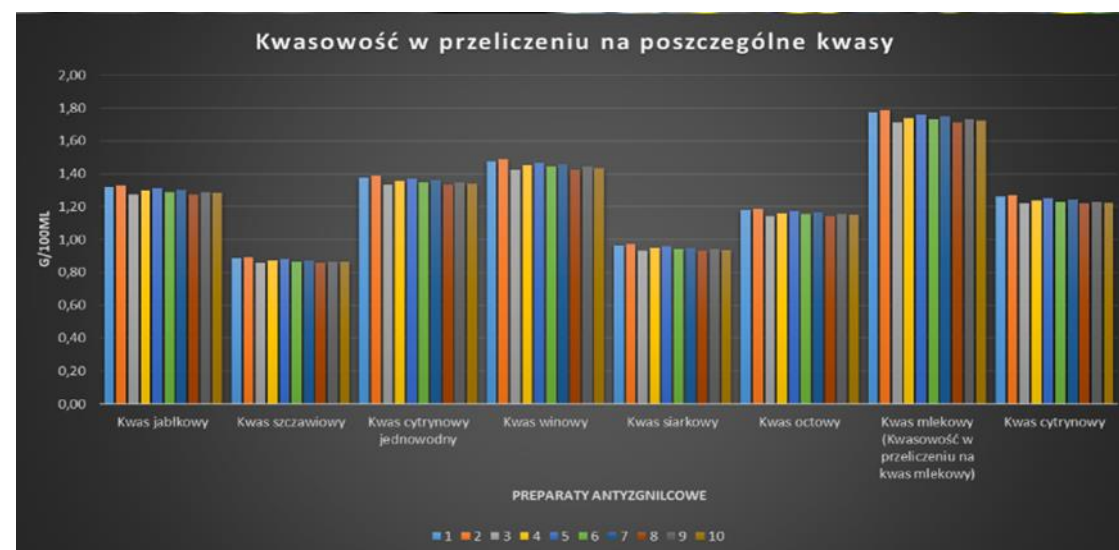
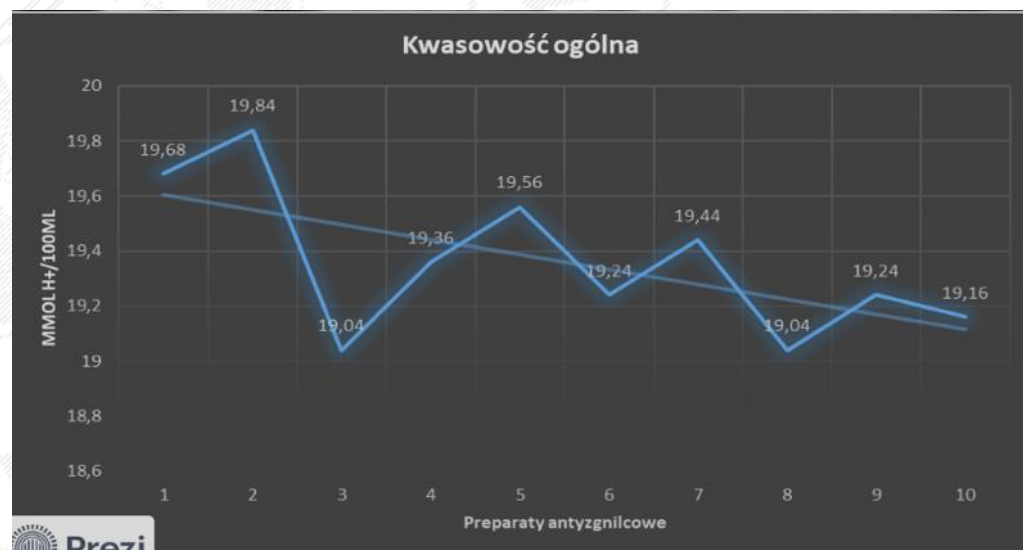


Rysunek 83. Zmiany liczebności bakterii kwasu mlekowego (LAB) w czerwiu bez zastosowania preparatu ApiBiotic w grupie 4.

Zidentyfikowano ilościowo profil kwasów organicznych obecnych w ApiBiotic

Próbki	Lp.	pH średnie	Kwasowość ogólna	Kwas jabłkowy	Kwas szczawiowy	Kwas cytrynowy jednowodny	Kwas winowy	Kwas siarkowy	Kwas octowy	Kwas mlekowy	Kwas cytrynowy
Preparaty antyzgnilcowe	1	3,49	19,68	1,32	0,89	1,38	1,48	0,96	1,18	1,77	1,26
	2	3,50	19,84	1,33	0,89	1,39	1,49	0,97	1,19	1,79	1,27
	3	3,47	19,04	1,28	0,86	1,33	1,43	0,93	1,14	1,71	1,22
	4	3,46	19,36	1,30	0,87	1,36	1,45	0,95	1,16	1,74	1,24
	5	3,50	19,56	1,31	0,88	1,37	1,47	0,96	1,17	1,76	1,25
	6	3,51	19,24	1,29	0,87	1,35	1,44	0,94	1,15	1,73	1,23
	7	3,50	19,44	1,30	0,87	1,36	1,46	0,95	1,17	1,75	1,24
	8	3,51	19,04	1,28	0,86	1,33	1,43	0,93	1,14	1,71	1,22
	9	3,49	19,24	1,29	0,87	1,35	1,44	0,94	1,15	1,73	1,23
	10	3,49	19,16	1,28	0,86	1,34	1,44	0,94	1,15	1,72	1,23
Probiotyk - suplement	1	3,21	6,32	0,42	0,28	0,44	0,47	0,31	0,38	0,57	0,40
	2	3,21	6,34	0,42	0,29	0,44	0,48	0,31	0,38	0,57	0,41

Tabela 10., Rycina 3 – Rycina 4. Kwasowość synbiotyku ApiBiotic z profilem kwasów organicznych



Produkt finalnie wdrożono na rynek

Preparat powstał we współpracy z
Uniwersytetem Przyrodniczym we
Wrocławiu



UNIwersytet
Przyrodniczy
we Wrocławiu

[illegible]

The image shows the front cover of the journal 'Microbiology Research'. The top half of the cover has a solid orange background. On the left, there is a circular logo containing a stylized globe with three dots. To its right, the journal title 'microbiology research' is written in a white, lowercase, sans-serif font. On the right side of the orange section, three horizontal white lines separate the following information: 'Impact Factor 2.1', 'CiteScore 1.9', and 'ISSN 2036-7481'. The main title of the issue, 'Bacterial Agents for Biocontrol of American Foulbrood (AFB) of Larvae Honey Bee', is centered in a large, white, sans-serif font. Below the orange section, the cover transitions into a full-page photograph of a honey bee on a yellow flower. The bee is covered in yellow pollen. In the bottom left corner of the photograph, the MDPI logo is visible, consisting of the letters 'MDPI' inside a white hexagonal frame.

Apibiotic

MPU - synbiotyki przeciwdrobnoustrojowy

synbiotyki odbudowujący i wspierający fizjologiczny mikrobiom larw pszczoły miodnej o wysokim potencjale przeciwdrobnoustrojowym do stosowania w profilaktyce względem bakterii *Paenibacillus larvae* wywołującej zgnilec amerykański w rodzinach pszczelich.

KORZYŚCI ZE STOSOWANIA Apibiotic:

- poprawia parametry odporności i wzmacnia bariery przeciwdrobnoustrojowe robotnic i larw pszczoł przed zakażeniem *Paenibacillus larvae* Eric I, II, III i IV,
- pozwala zniżyć presję zgnilia amerykańskiego na fizjologicznie mikrobiom larw rodzin pszczoł,
- wspiera i wzmacnia i odbudowę mikrobiomu larw i dorosłych osobników pszczoły miodnej, eliminując ryzyko nowych zakażeń bakteryjnych,
- wykazuje potencjał przeciwdrobnoustrojowy i blokuje wytwarzanie endospor *Paenibacillus larvae*,
- a przez synergiczny skład preparatu tworzy biologiczną ochronę psasieki przed zoonozami amerykańskimi.

Dodatek do syropu:

- przed ziniową: odkłady, pakiety i słabsze rodziny: 5 ml Apibiotic/1 L syropu cukrowego lub inwertu, silne rodziny produkcyjne: 20 ml Apibiotic/1 L syropu cukrowego lub inwertu;
- w trakcie sezonu, pazu przytłoczych i w okresie zwiększonej presji zgnila amerykańskiego: odkłady, pakiety i słabsze rodziny: 10 ml Apibiotic/1 L syropu cukrowego lub inwertu, silne rodziny produkcyjne: 30 ml Apibiotic/1 L syropu cukrowego lub inwertu. Dokładnie wymieszać.

Dodatek do ciasta:

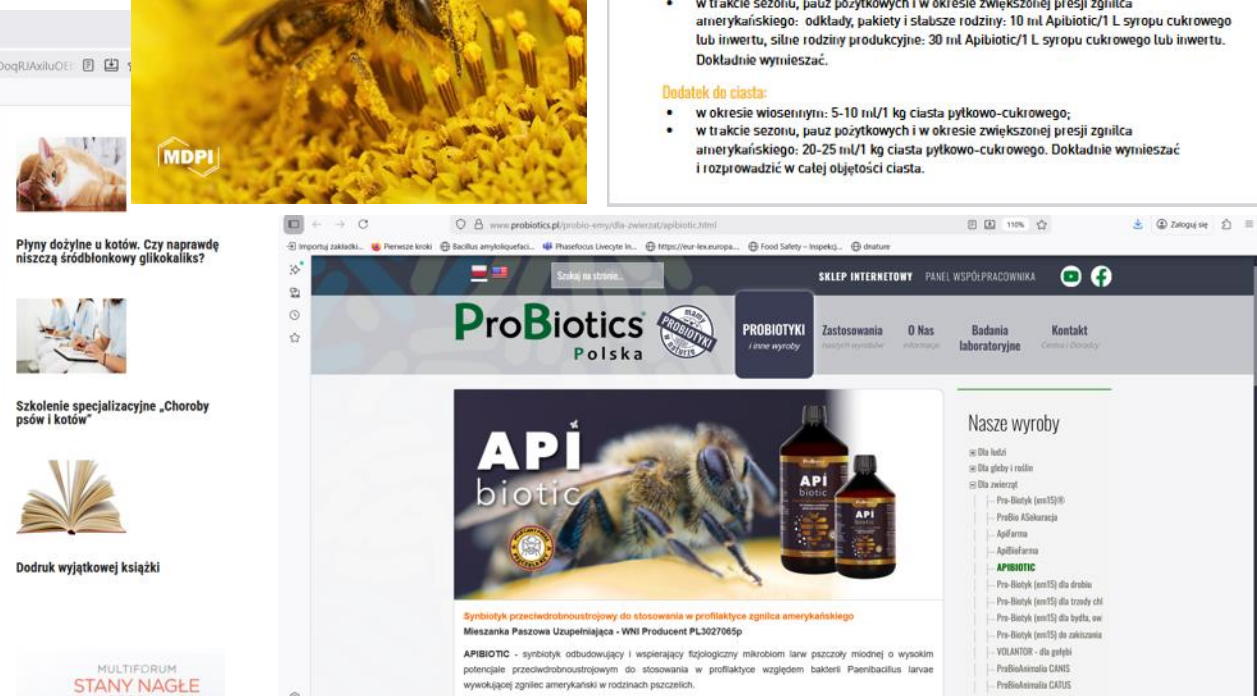
- w okresie wiosennym: 5-10 ml/1 kg ciasta pyłkowo-cukrowego;
- w trakcie sezonu, pauz pożytkowych i w okresie zwiększonej presji zgnilała amerykańskiego: 20-25 ml/1 kg ciasta pyłkowo-cukrowego. Dokładnie wymieszać i rozpuścić w całej objętości ciasta.

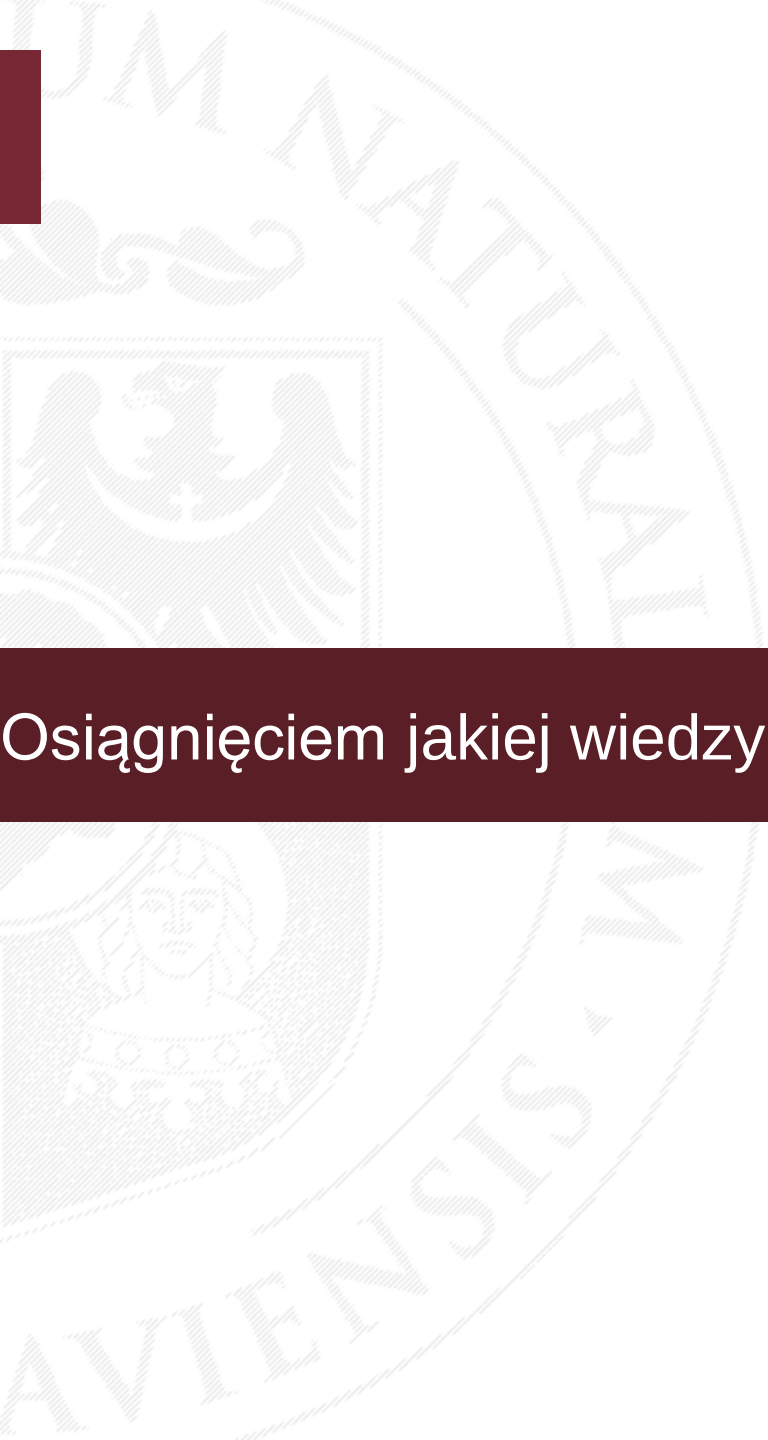


Czy biotechnologia może zrewolucjonizować profilaktykę chorób zakaźnych u zwierząt gospodarskich? Piotr Robert Nowotnik, doktorant Szkoły Doktorskiej UPWr, udowadnia, że tak. Łącząc wiedzę z zakresu mikrobiologii i biotechnologii z realnymi wyzwaniami w weterynarii, prowadzi badania, które mogą nie tylko podnieść dobrostan zwierząt, ale też znacząco ograniczyć stosowanie antybiotyków i ich hodowli.

W ramach doktoratu wdrożeniowego, realizowanego we współpracy z firmą ProBiotics Polska, w której kieruje działem badań i rozwoju, opracował pierwszy w Europie metaboliczny preparat synbiotyyczny o wysokim potencjale przeciwdrobnoustrojowym. Jego celem jest ograniczenie presji bakterii *Paenibacillus larvae*, odpowiedzialnej za wysoce zakaźną chorobę pszczół, jaką jest zgnielec amerykański. Preparat ma wspierać mikrobiom larw pszczół miodnych, konkurując z patogenem i blokując jego namnażanie, a tym samym przerywać łańcuch zarazki.

Doktorant UPWr opracował nową broń w walce ze zgnilcem amerykańskim / Aktualności / Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu





Osiągnięciem jakiej wiedzy zakończył się projekt badawczo-rozwojowy?

Wnioski końcowe i podsumowanie prac B+R

W wyniku przeprowadzonych prac badawczo-rozwojowych sformułowano następujące wnioski:

- [1] wykazano wysoką wrażliwość komórek wegetatywnych *P. larvae* (Eric I, Eric II, Eric III) na antagonistycznie działające w stosunku do tych patogenów substancje biologicznie aktywne, obecne w użytych komponentach mikrobiologicznych i roślinnych w składzie preparatu, wyrażoną wyznaczonymi stężeniami MIC i MBC oraz krótkim czasem przeżywalności po zastosowaniu określonych stężeń synbiotyku;
- [2] opracowano metodę z rozwiązaniem biologicznym, zintegrowaną z praktyką pszczelarską, do zmniejszania presji występowania zgnilca amerykańskiego w rodzinach pszczelich przez wspieranie rozwoju mikrobiomu fizjologicznego pszczół i ich larw, konkurującego z *Paenibacillus larvae*, umożliwiając w ten sposób blokowanie nadmiernego namnażania się i wytwarzania endospor tego patogenu;
- [3] wykazano, że jest możliwe zastosowanie farmakobiotyku ApiBiotic w ramach szybkiej, celowanej ochrony rodzin pszczelich przed nabyciem i rozwinięciem się zakażenia, co potwierdziła próba środowiskowego ograniczenia wzrastającej liczby obszarów zapowietrzonych i rozszerzających się ognisk zakaźnych, podlegających eradykacji przez służby weterynaryjne;
- [4] ApiBiotic jako synteza technologii, know-how i zasobów mikrobiologii oraz biotechnologii jest preparatem wykorzystującym mikroorganizmy, rośliny i ich metabolity do biokontroli bakterii *P. larvae*, skutecznie redukującym ryzyko powstania terenowych ognisk chorobowych;
- [5] synbiotyki wykazują pełne bezpieczeństwo dla pszczół oraz produktów pszczelich przeznaczonych do spożycia i wykorzystania przez człowieka gdyż w jego składzie znajdują się naturalne czynniki pochodzenia roślinnego i mikrobiologicznego, niewymagające określania parametru MRL, ponadto stosowany będzie po za okresie produkcyjnym w pasiekach.

Gdzie poszukiwać informacji naukowej o ApiBiotic?

I. Publikacje omawiające część wyników z prac laboratoryjnych:

1. DOI: 10.3390/microbiolres15040161, znajduje się pod adresem: <https://www.mdpi.com/2036-7481/15/4/161>
2. DOI: 10.2139/ssrn.5529821, znajduje się pod adresem: https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=5529821
3. **Rozprawa doktorska:** <https://bip.upwr.edu.pl/uniwersytet/doktoraty-habilitacje/postepowania-doktorskie/piotr-nowotnik-130.html> ;

II. Publikacje omawiające część wyników z prac terenowych:

1. DOI: [10.20944/preprints202509.0803.v1](https://www.preprints.org/manuscript/202509.0803), znajduje się pod adresem: <https://www.preprints.org/manuscript/202509.0803> ;
2. DOI: [10.13140/RG.2.2.10981.67040](https://www.researchgate.net/publication/398600667_Development_of_a_metabolic_preparation_with_high_antimicrobial_potential_for_use_in_the_prophylaxis_against_Paenibacillus_larvae_causing_American_foulbrood_in_bee_colonies?channel=doi&linkId=693b646f06a9ab54f84668b0&showFulltext=true), znajduje się pod adresem: https://www.researchgate.net/publication/398600667_Development_of_a_metabolic_preparation_with_high_antimicrobial_potential_for_use_in_the_prophylaxis_against_Paenibacillus_larvae_causing_American_foulbrood_in_bee_colonies?channel=doi&linkId=693b646f06a9ab54f84668b0&showFulltext=true
3. **Rozprawa doktorska:** <https://bip.upwr.edu.pl/uniwersytet/doktoraty-habilitacje/postepowania-doktorskie/piotr-nowotnik-130.html> ;

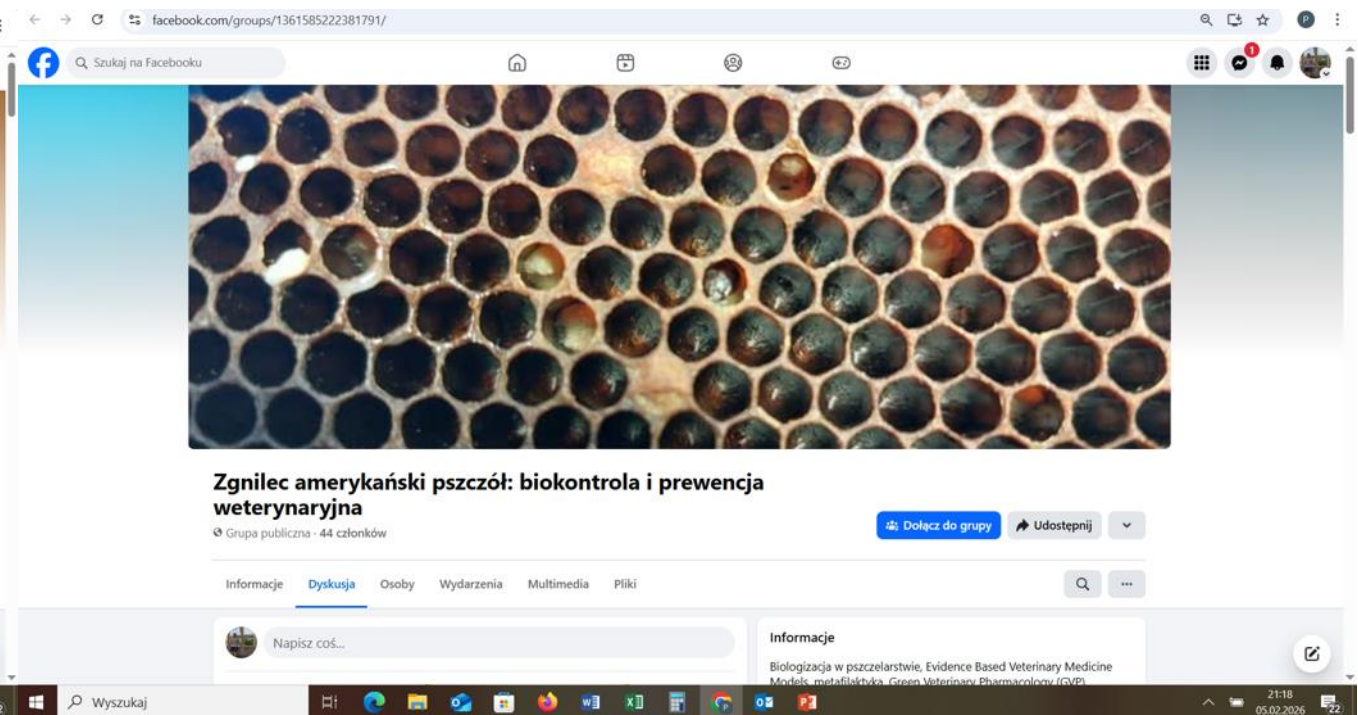
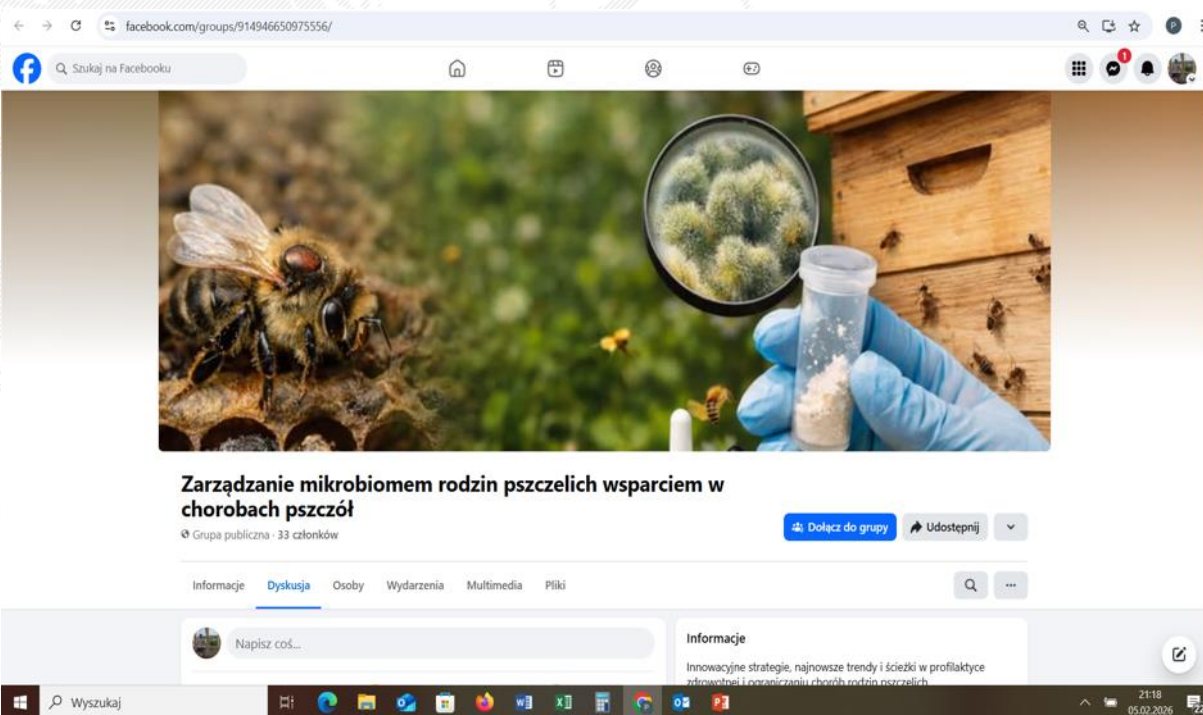
III. Dodatkowe wyniki można odnaleźć pod linkiem: <https://orcid.org/0000-0002-9682-5570> tudzież pod linkiem: <https://www.researchgate.net/profile/Piotr-Nowotnik>

- ✓ Preparat, w oparciu o zgodę wydaną przez Głównego Lekarza Weterynarii i pozytywną opinię Instytutu Weterynarii w Puławach został przebadany w warunkach polowych „in – vivo”;
- ✓ Preparat powstał we współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu, który rekomenduje nasze rozwiązanie;
- ✓ W naszych zasobach posiadamy też liczne listy intencyjne, w których wyrażano już od roku 2019 pełne poparcie dla opracowania takiego rozwiązania produktowego, technologii i know-how.

Zapraszamy do śledzenia aktualnych trendów i komunikatów naukowych z wykorzystaniem probiotechnologii w pszczelarskiej prewencji weterynaryjnej

<https://www.facebook.com/groups/914946650975556/>

<https://www.facebook.com/groups/1361585222381791/>





UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU



Imię i nazwisko Prelegenta/Prelegentki

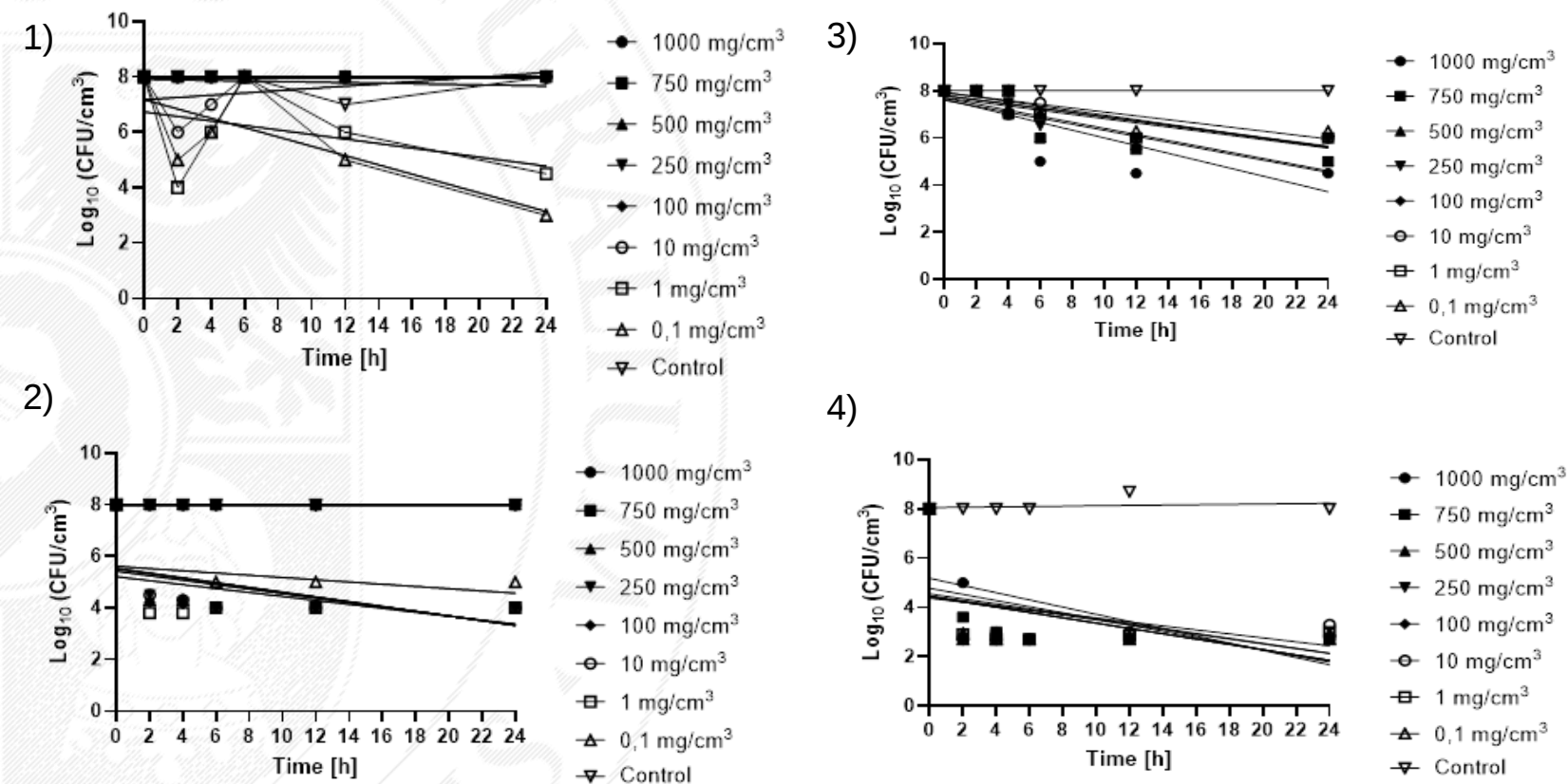
Dane teleadresowe - kontaktowe

Dziękuję za uwagę



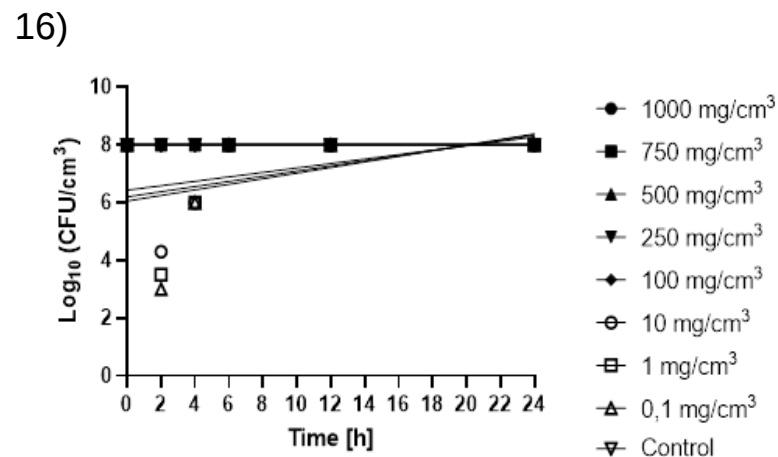
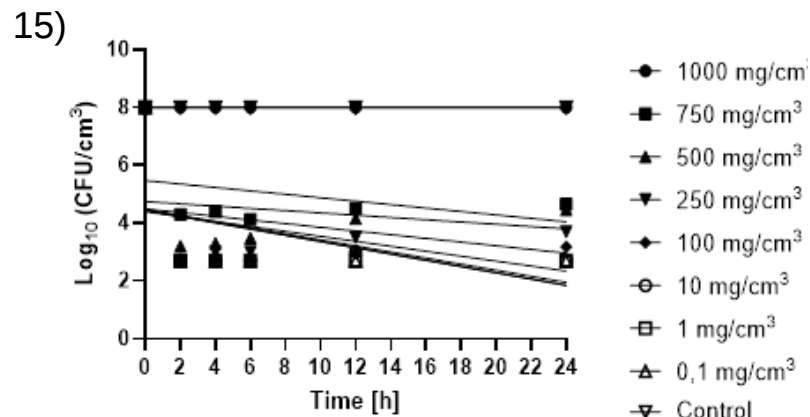
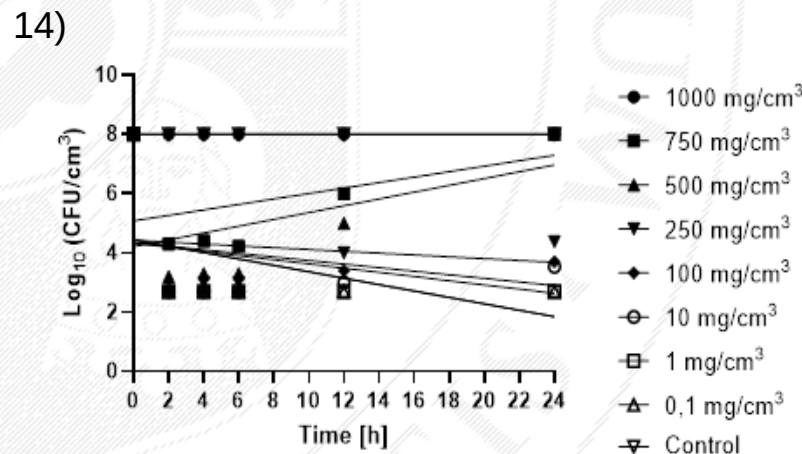
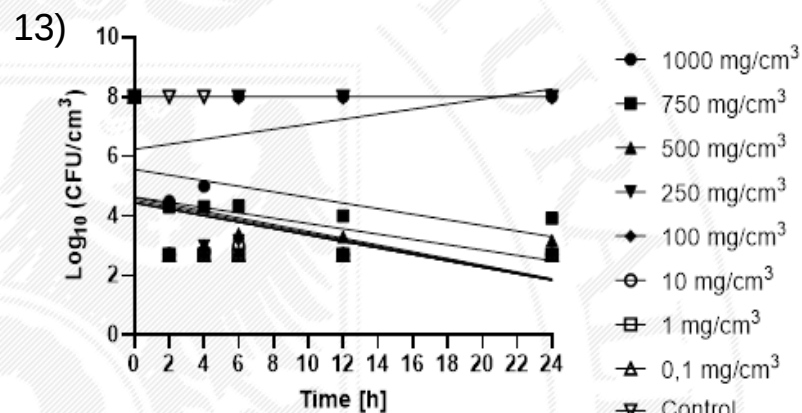
DODATKOWE, SZCZEGÓŁOWE WYNIKI BADAŃ

Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* dla każdego szczepu probiotycznego



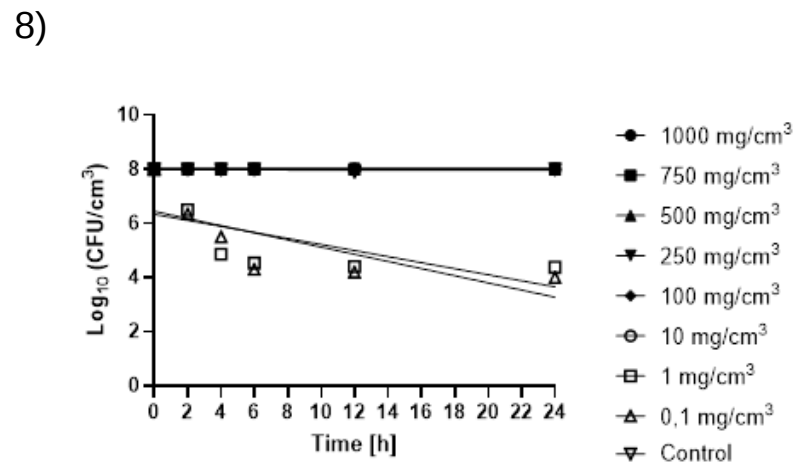
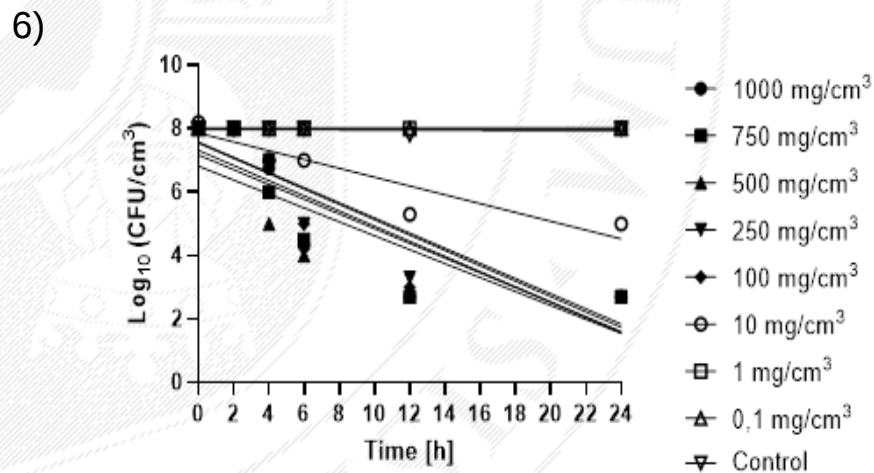
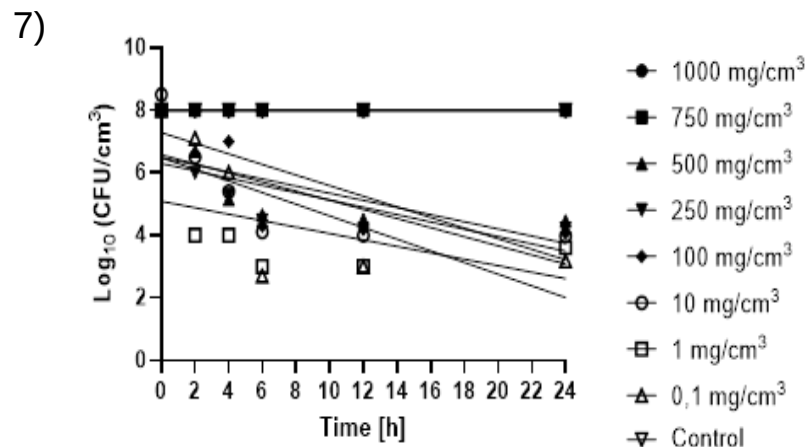
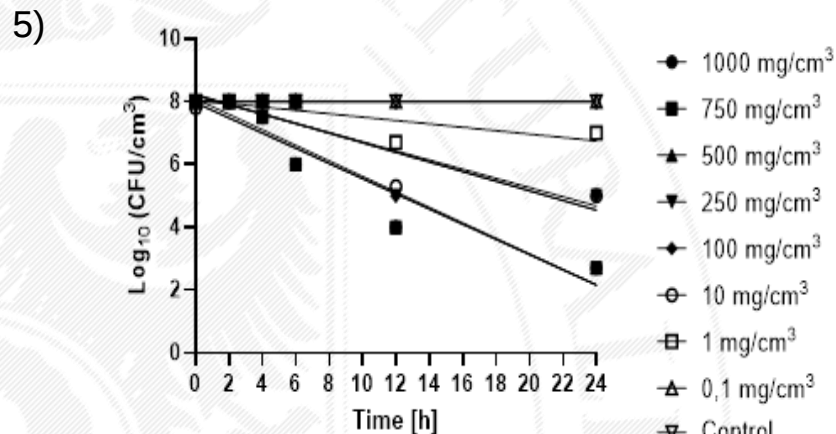
Rysunek 1 - Rysunek 4: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów PBP01 (1), PBP02 (2), PBP03 (3), PBP04 (4) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* ATCC 9545

Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* dla każdego szczepu probiotycznego



Rysunek 13 – Rysunek 16: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów PBP05 (13), PBP06 (14), PBP07 (15), PBP08 (16) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* CCUG 50846.

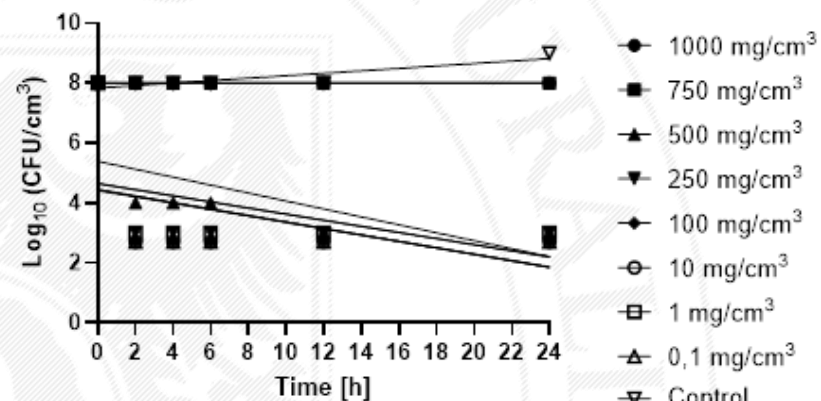
Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* dla każdego szczepu probiotycznego



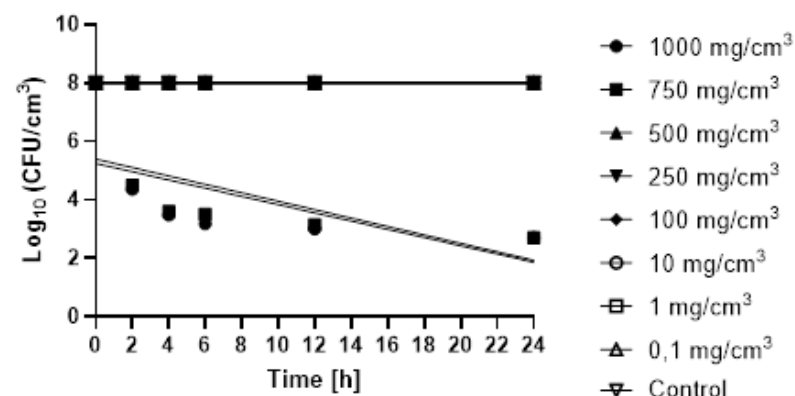
Rysunek 5 – Rysunek 8: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów PBP05 (1), PBP06 (6), PBP07 (7), PBP08 (8) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* ATCC 9545

Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* dla każdego szczepu probiotycznego

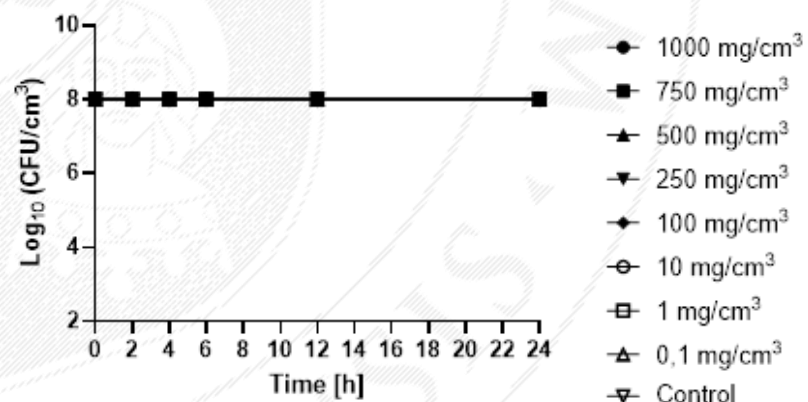
9)



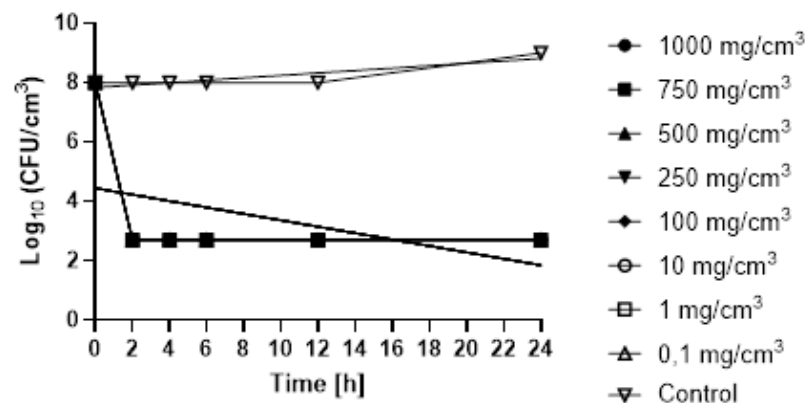
11)



10)



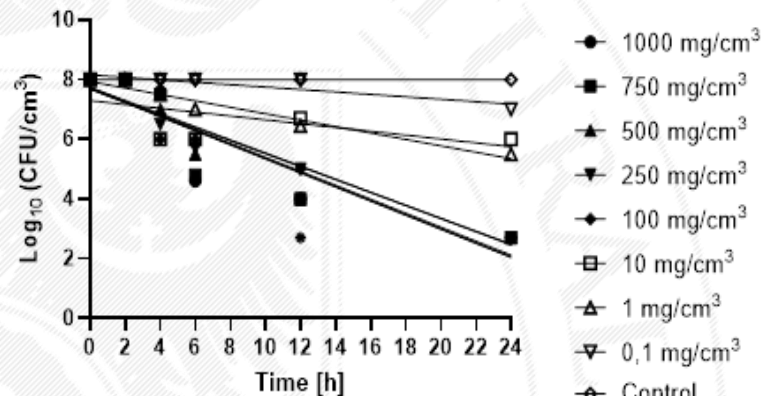
12)



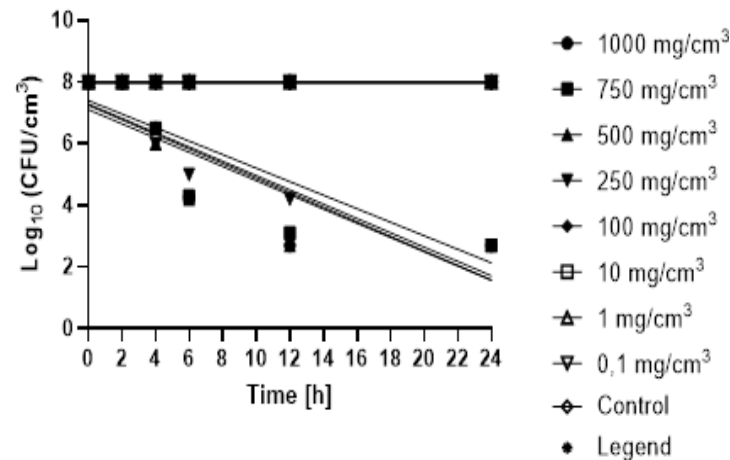
Rysunek 9 – Rysunek 12: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów PBP01 (9), PBP02 (10), PBP03 (11), PBP04 (12) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* CCUG 50846.

Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* dla każdego szczepu probiotycznego

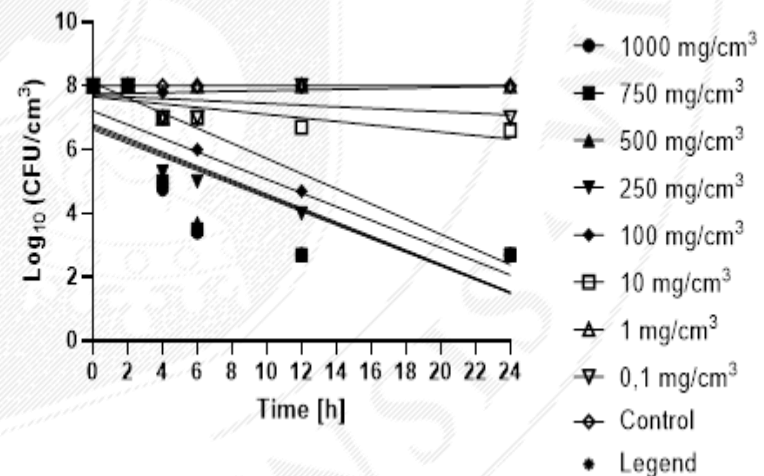
21)



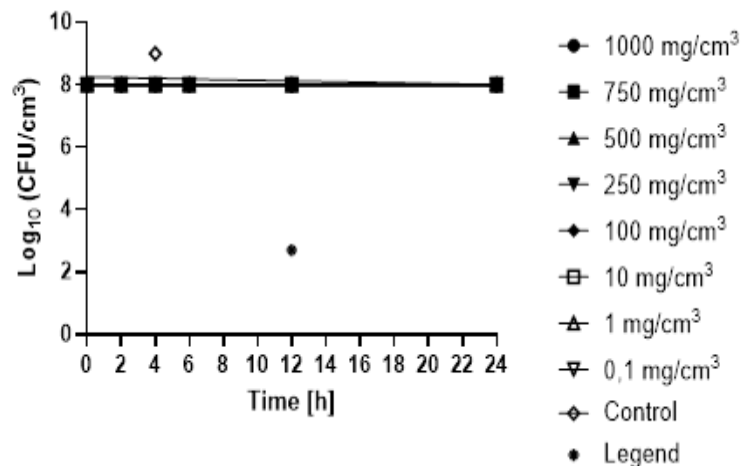
23)



22)



24)



Rysunek 21 – Rysunek 24: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów PBP05 (21), PBP06 (22), PBP07 (23), PBP08 (24) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* CCUG 48973.

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of White willow bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Laurel bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Allspice bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Mugwort bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Marigold bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus* larvae ATCC 9545 bacterial cells



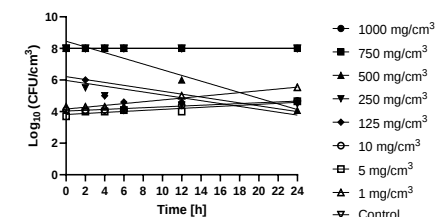
Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of *Nasturtium* bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Scots pine bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Black poplar bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus* larvae ATCC 9545 bacterial cells

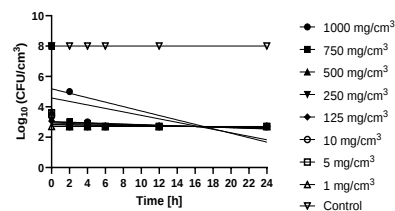


(31)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of European olive bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



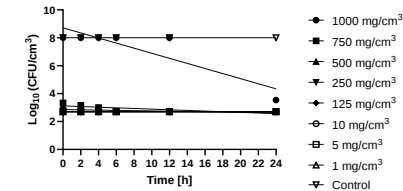
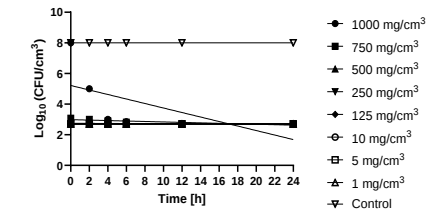
Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Walnut bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



Rysunek 29 – Rysunek 38: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów WW (29), MD (30), EO (31), L (32), N (33), WT (34), A (35), P (36), M (37), BP (38) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* ATCC 9545.

(44)

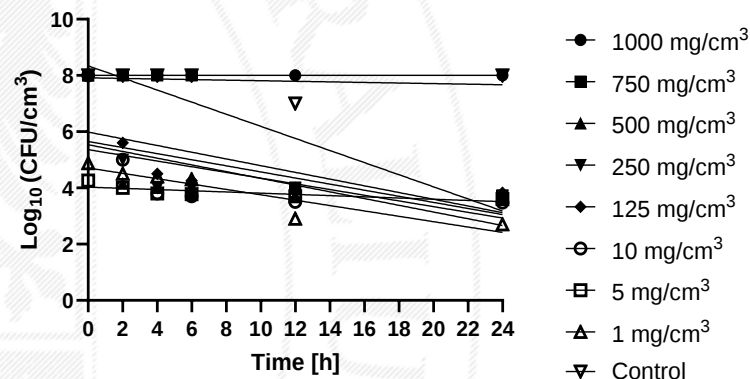
Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Walnut bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 50846 bacterial cells



Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* dla każdego substratu roślinnego

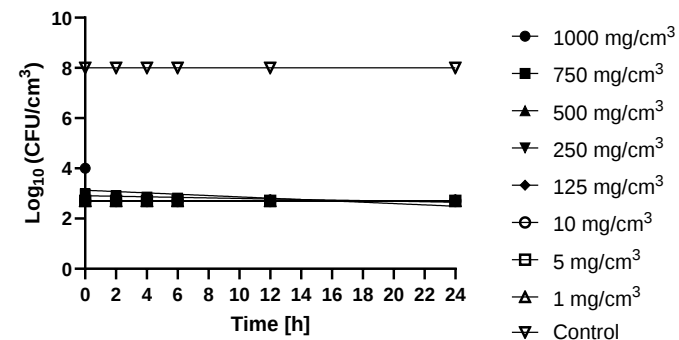
25)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Watercress bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



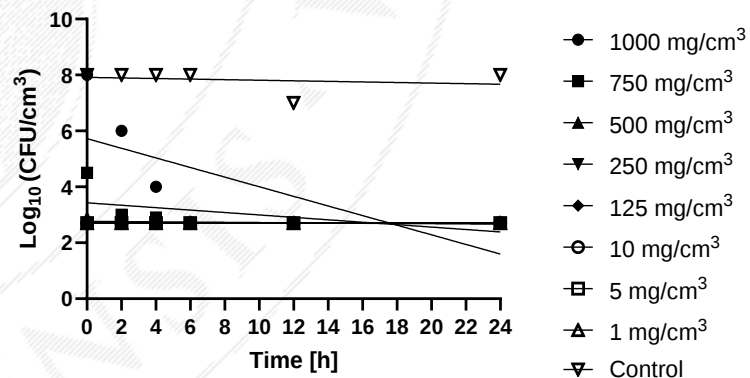
27)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of English oak bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



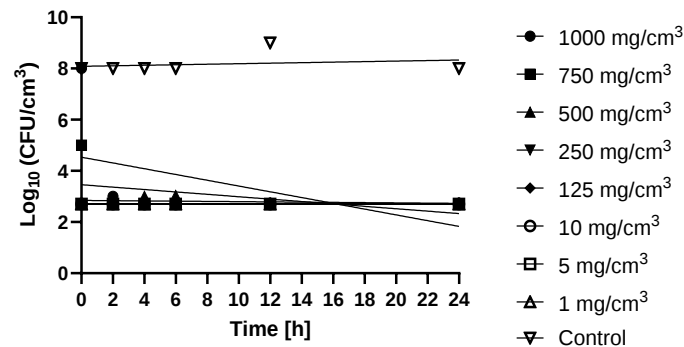
26)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Yerba mate bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells



28)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Silver birch bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* ATCC 9545 bacterial cells

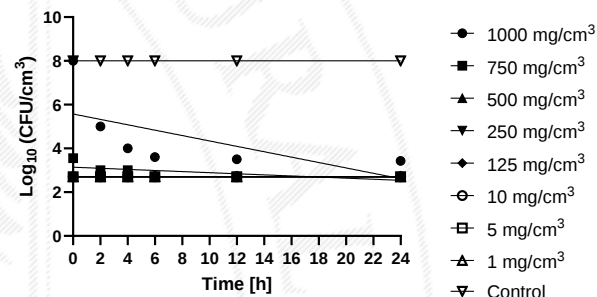


Rysunek 25 – Rysunek 28: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów W (25), YM (26), EO (27), SB (28) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* ATCC 9545.

Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* dla każdego substratu roślinnego

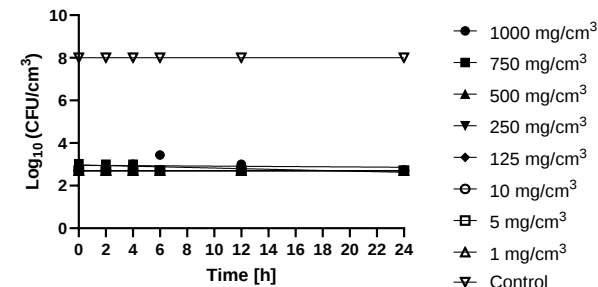
(49)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Allspice bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 50846 bacterial cells



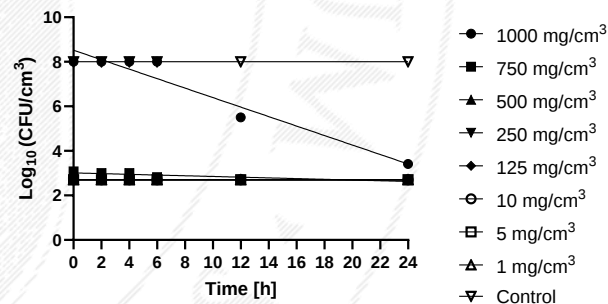
(51)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Mugwort bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 50846 bacterial cells



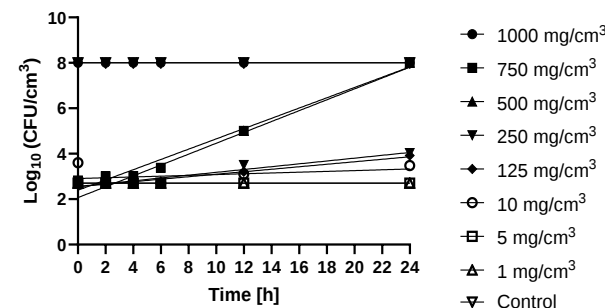
(50)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Scots pine bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 50846 bacterial cells



(52)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Black poplar bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 50846 bacterial cells

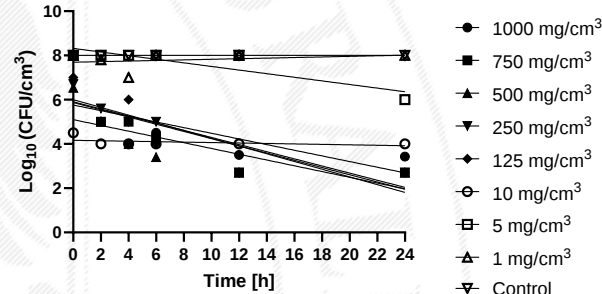


Rysunek 39 – Rysunek 52: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów W (39), YM (40), EO (41), SB (42), WW (43), MD (44), EO (45), L (46), N (47), WT (48), A (49), P (50), M (51), BP (52) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* CCUG 50846.

Wyznaczono czas i stężenie potrzebne do zabicia komórek *P. larvae* dla każdego substratu roślinnego

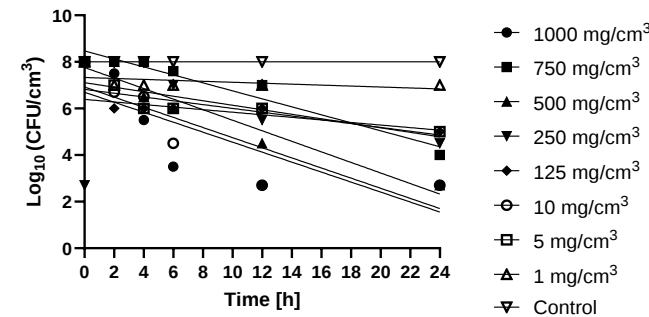
(63)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Allspice bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



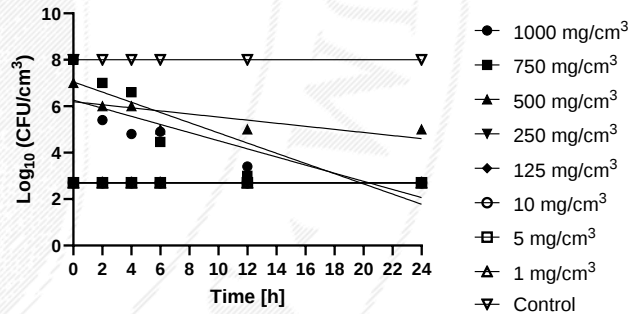
(65)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Mugwort bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



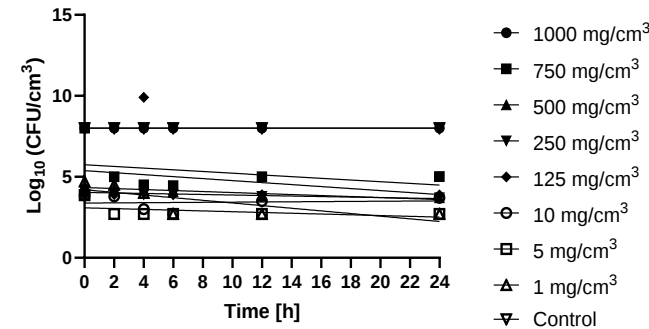
(64)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Scots pine bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



(66)

Killing curve showing the relationship between metabolite concentration of Black poplar bioferment and the time of its effect on the viability of *Paenibacillus larvae* CCUG 48973 bacterial cells



Rysunek 53 - Rysunek 66: Krzywa zabijania ilustrująca zależność między stężeniem metabolitów W (53), YM (54), EO (55), SB (56), WW (57), MD (58), EO (59), L (60), N (61), WT (62), A (63), P (64), M (65), BP (66) a czasem ich działania na żywotność komórek bakterii *Paenibacillus larvae* CCUG 48973.