
	Wydział Medycyny Weterynaryjnej Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska	Wersja załącznika 2
	RAPORT KOŃCOWY NR 1/2022	Strona 1 z 8

Tytuł raportu	Wykonanie testu skuteczności i bezpieczeństwa mieszanki paszowej uzupełniającej ApiBrassin u pszczół.
Osoba sporządzająca raport	Dr n. wet. Maciej Duda
Data sporządzonego raportu	01.03.2022 r.

Spis treści

Jednostka badawcza.....	2
Lista personelu biorącego udział w badaniu.....	2
1. Cel badania.....	3
2. Metody badań.....	3
2.1. Badane próbki.....	3
2.2. Określenie bezpieczeństwa ApiBrassin w pasiekach	3
2.3. Określenie bezpieczeństwa ApiBrassin w izolacji	4
2.4. Metody określania rozwoju rodziny pszczół podczas stosowania ApiBrassin	4
2.5. Określenie warunków korzystania z produktów pszczelarskich	5
2.6. Metody oznaczania 24-epibrasinolidu w produktach pszczelarskich.....	5
3. Wyniki badań	5
3.1. Ocena bezpieczeństwa ApiBrassin	5
3.2. Wpływ ApiBrassinu na rozwój rodziny pszczół	6
3.3. Wpływ ApiBrassinu na produkcję miodu	7
4. Określenie warunków korzystania z produktów pszczelich po zastosowaniu ApiBrassin	7
5. Wnioski	8

	Wydział Medycyny Weterynaryjnej Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska	Wersja załącznika 2
Nr załącznika Z/PLAB-10/1	RAPORT KOŃCOWY NR 1/2022	Strona 2 z 8


JEDNOSTKA BADAWCZA:

Duda Maciej Lecznica Weterynaryjna

Samsonów-Ciągłe 3
26-050 Samsonów Ciągłe

Lista personelu biorącego udział w badaniu:

Imię i nazwisko	wykonywane zadania
Prof. dr hab. Cezary J. Kowalski	Kierownik badania
Dr n. wet. Maciej Duda	Zebranie i przygotowanie danych źródłowych, przygotowanie mieszanki do podawania pszczołom, pobieranie prób do badań, ocena pobranych prób.

	Wydział Medycyny Weterynaryjnej Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska	Wersja załącznika 2
Nr załącznika Z/PLAB-10/1	RAPORT KOŃCOWY NR 1/2022	Strona 3 z 8

1. Cel badania

Celem badania było ustalenie skuteczności i potwierdzenie bezpieczeństwa stosowania mieszanki uzupełniającej ApiBrassin u pszczoł. ApiBrassin (substancja roślinna z ekstraktu gryki), zawierająca oprócz znanych fitosteroli - 24-epibrassinolid, który jest jednym z fitohormonów pozyskiwanych przez pszczoły w warunkach naturalnych. Stosowanie jej zgodnie z zaleceniami działa stymulująco na rodziny pszczele, czego efektem jest zwiększenie produkcji jaj przez królowe. Powoduje to większą siłę rodziny, dzięki czemu podwyższa się ilość produkowanego miodu. Zawartość 24-epibrassinolidu w miodzie wykonano metodą immunoenzymatyczną. Badanie nie wykazało istotnych zmian we frakcji masowej 24-epibrassinolidu po zastosowaniu ApiBrassin. Uzyskane wyniki pozwalają nam bez ograniczeń polecić stosowanie miodu i produktów pszczelich po zastosowaniu ApiBrassin.

2. Metody badań

2.1. Badane próbki

Do badań wykorzystano mieszankę dla pszczoł ApiBrassin o trzech różnych numerach seryjnych, wyprodukowaną przez Mikonik Technologies Ltd. (Belarus). Produkt został dostarczony przez producenta w opakowaniach po 2 ampułki szklane, każda pojemności 5 ml.


Skład ApiBrassin (jedna ampłka 5 ml):

substancja czynna: wyciąg z gryki zwyczajnej (*Fagopyrum esculentum* Moench) standaryzowany na 0,2 % 24-epibrassinolid; DER (Drug Extract Ratio) 200:1

substancje pomocnicze: woda 92%, alkohol etylowy 8%. Skład analityczny: 24-epibrassinolid 0,2 mg/ml. Nazwa chemiczna substancji czynnej: 24-epibrassinolid, (22R, 23R, 24R)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahydroksy-B-homo-7-oksa-24-metylo-5 α -ergostan-6-on (naturalny 22R, 23R-izomer). Właściwości fizyczne: bezbarwna, przezroczysta ciecz o zapachu alkoholu, rozpuszczalna w wodzie i innych rozpuszczalnikach. Warunki przechowywania: przechowywać w suchym i ciemnym miejscu. Okres ważności: 3 lata.

2.2. Określanie bezpieczeństwa Apibrassin w pasiekach

Badania bezpieczeństwa mieszanki dla pszczoł ApiBrassin przeprowadzono w pasiekach na terenie gminy Zagańsk w dniach 21. 09. - 09. 10. 2020r. Przedmiotem badań były pszczoły rasy karpackiej. Obserwacje prowadzono dla 6 kolonii kontrolnych (I) i 6 doświadczalnych (II), które posiadały średnio 6 uliczek. Rodzinom pszczelim, w zależności od siły rodziny, podawano syrop cukrowy w ilości 18-20 kg podczas karmienia na zimę.

	Wydział Medycyny Weterynaryjnej Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska	Wersja załącznika 2
Nr załącznika Z/PLAB-10/1	RAPORT KOŃCOWY NR 1/2022	Strona 4 z 8


W grupie doświadczalnej rodzin pszczelich (II) do syropu dodano 1 ml mieszanki dla pszczół ApiBrassin w ilości 1 ml na 1 litr syropu. Jako szacunkowe wskaźniki bezpieczeństwa żywienia wybrano liczbę zniesionych czerwiu i jaj.

2.3. Oznaczanie bezpieczeństwa Apibrassin w izolacji

Dwie ramki z pszczołami umieszczono w izolatorach w temperaturze pokojowej i wilgotności względnej nie większej niż 65%. W celu określenia nieszkodliwości pszczołom z jednej z odsłoniętych ramek (II) podawano syrop cukrowy w ilości 300 ml zawierający 0,3 ml ApiBrassin. Pszczoły z odsłoniętej ramy kontrolnej (I) karmiono syropem cukrowym w tej samej ilości bez dodatku dla pszczół ApiBrassin. Pszczoły obserwowano przez 6-8 dni. Pod koniec okresu obserwacji zliczono martwe pszczoły z obu ramek.

2.4. Metody określenia rozwoju rodziny pszczół podczas stosowania Apibrassin

W zależności od siły kolonii podczas dokarmiania jesiennego, we wrześniu 2020 r. rodzinom pszczelim podawano syrop cukrowy w ilości 18-20 kg. Dla grupy doświadczalnej do syropu dodano dodatek dla pszczół ApiBrassin w ilości 1 ml na 1 litr syropu. W celu zwiększenia siły rodzin pszczelich wiosną 2021 roku ApiBrassin zastosowano 3 razy w odstępie 4-5 dni w ilości 1,5-1,6 litra na rodzinę pszczół 6-7 uliczek. Następnie w okresie letnim, taką samą ilość okresu męskiej produktywności pszczół podano 2 razy w odstępie 6 dni. Ocenę rozwoju rodzin pszczelich przy użyciu mieszanki dla pszczół ApiBrassin, przeprowadzono w pasiekach na terenie gminy Zagańsk w okresie marzec-sierpień 2021 r. Przedmiotem badań były pszczoły rasy karpackiej. Obserwacje prowadzono dla 6 kontrolnych (I) i 6 doświadczalnych (II) rodzin pszczelich, które posiadały średnio 6 uliczek. Rozwój rodzin pszczelich oceniano na podstawie wyników miesięcznych zliczeń, biorąc pod uwagę następujące wskaźniki: siła rodzin pszczelich - poprzez policzenie liczby pełnych uliczek zajętych przez pszczoły oraz liczbę wyprodukowanego czerwiu. Liczbę czerwiu określano za pomocą ramki, wewnątrz której naciągnięto drut, tworząc kwadraty o powierzchni 25 cm², na których znajduje się 100 komórek pszczół. Uwzględniono tylko wytworzony czerw. Na podstawie tych danych obliczono średnią dobową produkcję jaj matek pszczelich. Aktywność lotną pszczół określano, licząc pszczoły powracające do ula w ciągu 3 minut, codziennie od 10.00 do 12.00 przez 3 dni w okresie niskiego przepływu. Wydajność miodu determinowana była ilością miodu wyselekcjonowanego z rodzin pszczelich pod koniec pożytku.

	Wydział Medycyny Weterynaryjnej Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska	Wersja załącznika 2
	RAPORT KOŃCOWY NR 1/2022	Strona 5 z 8

2.5. Określenie warunków korzystania z produktów pszczelarskich.

Obiektem badań były 4 rodziny pszczoły linii karpackiej, z czego 2 rodziny pszczoły (II) otrzymały ApiBrassin jako dodatek do syropu cukrowego. Dokarmianie rodzin pszczelich przeprowadzono 30 czerwca 2021 r. W trakcie badań pszczołom podawano 2 litry syropu cukrowego z ApiBrassin w ilości 1 ml na 1 litr syropu cukrowego. Kolonie kontrolne (I) otrzymywały tylko syrop cukrowy. W odstępie 5-10 dni po rozpoczęciu dokarmiania pozyskiwano martwe pszczoły, a miód zbierano do plastrów.

2.6. Metody oznaczania 24-epibrasinolidu w produktach pszczelarskich

Udział masowy zawartości 24-epibrasinolidu w miodzie, piance miodowej, pyłku pszczelim, a także w ekstrakcie pszczelim oznaczono metodą immunoenzymatycznego testu z użyciem zestawu do oznaczania 24-epibrasinolidu (Instytut Chemii Bioorganicznej Narodowej Akademii Nauk Białoruś, Białoruś). Ekstrakt pszczoły przygotowano w roztworze alkoholowym. Wyniki badań przedstawiono jako wartości średnie z tych analiz.


3. Wyniki badań

3.1. Ocena bezpieczeństwa Apibrassin

W okresie badań bezpieczeństwa dla pszczoły ApiBrassin w pasiekach na terenie gminy Zagańsk w okresie od 21.09 do 09.10.2020 r. nie nastąpiła masowa śmierć pszczoły oraz spadek liczby ulic w porównaniu z kontrolą. Ponadto stwierdzono wzrost średniej liczebności czerwiu w rodzinach, którym podawano ApiBrassin wraz z syropem cukrowym. Matki w rodzinach pszczelich grupy doświadczalnej (II), pomimo warunków pogodowych i odpowiadającej im pory roku (jesień), zaczęły składać jaja. Wskazuje to na stymulację funkcji rozrodczych macicy pod wpływem bioaktywnego opatrunku górnego z ApiBrassin. Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie ilości lęgów i ilości jaj w koloniach kontrolnych i koloniach doświadczalnych pszczoły.

	Ilość lęgów	Ilość jajek
Kolonie kontrolne (I)	3,66±1,60	-
Kolonie pszczoły z ApiBrassin (II)	7,00±2,04	19,17±7,01

	Wydział Medycyny Weterynaryjnej Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska	Wersja załącznika 2
	RAPORT KOŃCOWY NR 1/2022	Strona 6 z 8

Przy określaniu bezpieczeństwa ApiBrassin na ramkach pszczół w izolatorach nie stwierdzono istotnych różnic między liczbą martwych pszczół w izolatorze z ramką kontrolną pszczół (I) a pszczołami, które otrzymały syrop cukrowy (II) w ilości 300 ml zawierający 0,3 ml ApiBrassin. Wyniki kontroli liczebności padłych pszczół w okresie obserwacji przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Porównanie ilości martwych pszczół w ramkach z kolonii kontrolnych i doświadczalnych.

Dni rejestracji po wylądowaniu w izolacji	Liczba martwych pszczół, szt.	
	Ramka kontrolna (I)	Ramka pszczół z ApiBrassin (II)
3	146	89
6	367	177
8	544	343


3.2. Wpływ Apibrassinu na rozwój rodziny pszczół

Wyniki badań wskazują (Tab. 3), że po zastosowaniu wiosennego dokarmiania stymulującego nieśność matek kontrolnych (I) utrzymywała się na poziomie 460-842 jaj na dobę w marcu i kwietniu 2021 r. W rodzinach, które otrzymały ApiBrassin w ramach dokarmiania wiosennego (II), liczba ta wzrosła 1,4-1,7 razy i wyniosła 779-1137 jaj dziennie. W całym okresie obserwacji (marzec-lipiec) odnotowano wyższą produkcję jaj matek w rodzinach pszczelich z ApiBrassin (II) w porównaniu z kontrolą (I). W połowie lipca liczba ta osiągnęła maksimum i wyniosła 2008 jaj/dobę w grupie rodzin pszczelich (II) wobec 1443 jaj/dobę w grupie kontrolnej (I).

Tabela 3. Porównanie produkcji jaj w koloniach kontrolnych i doświadczalnych.

Daty rejestracji	Produkcja jaj matek pszczelich, jaja/dobę	
	Kolonie kontrolne (I)	Kolonie pszczół z ApiBrassin (II)
18.03.2021r	460±30	779±46
16.04.2021r	842±33	1137±49
17.05.2021r	1474±79	1876±24
17.06.2021r	1544±68	1927±32
15.07.2021r	1443±52	2008±20

Należy również zauważyć, że żywienie rodzin pszczelich ApiBrassinem nie zwiększało ich agresywności. Zgodnie z naszymi obserwacjami liczba wylaniających się kolonii w eksperymentalnych i kontrolnych koloniach pszczół była w przybliżeniu taka sama.

	Wydział Medycyny Weterynaryjnej Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska	Wersja załącznika 2
	RAPORT KOŃCOWY NR 1/2022	Strona 7 z 8

Aktywność lotną pszczół oceniano w okresie 17-19 maja 2021 r. w godzinach od 10.00 do 12.00 (tab. 4). W wyniku 3-minutowego liczenia pszczół powracających do ula stwierdzono, że w rodzinach pszczelich, które otrzymały preparat ApiBrassin (II) liczba ta wynosiła 137 ± 15 pszczół (od 98 do 189 pszczół w ciągu 3 minut), a w grupie kontrolnej kolonie (I) 68 ± 13 pszczół (od 25 do 98 pszczół). W konsekwencji rodziny, które otrzymały preparat ApiBrassin (II) charakteryzowały się istotnie większą aktywnością lotniczą, co można tłumaczyć intensywniejszym rozwojem w porównaniu z rodzinami kontrolnymi, a także lepszym stanem fizjologicznym.

Tabela 4. Zestawienie aktywności lotniczej pszczół w koloniach kontrolnych i doświadczalnych.

Daty rejestracji	Aktywność lotnicza, pszczoły/3 minuty	
	Kolonie kontrolne (I)	Kolonie pszczół z ApiBrassin (II)
17-19.05.2021	68 ± 13	137 ± 15

3.3. Wpływ Apibrassinu na produkcję miodu


Wzrost siły rodzin pszczelich oraz aktywność lotna pszczół robotnic miały istotny wpływ na ich wydajność miodną. Z rodzin pszczelich, które otrzymały ApiBrassin (II) jako dodatek do syropów cukrowych, w sezonie 2021 uzyskano średnio $24,9 \pm 2,0$ kg miodu, czyli o 49% więcej niż w rodzinach kontrolnych (I) - $16,7 \pm 1,3$ kg .

4. Określenie warunków korzystania z produktów pszczelich po zastosowaniu Apibrassin

Dane dotyczące zawartości 24-epibrasinolidu w martwych pszczołach, a także produktach pszczelarskich po karmieniu ApiBrassin przedstawiono w tabeli 5. Jako typowy wskaźnik zawartości 24-epibrasinolidu w roślinach przyjęto ekstrakt z nasion ostropestu plamistego, gdzie według danych z badań udział masowy 24-epibrasinolidu wynosił $1,5 \cdot 10^{-6}$ %.

Tabela 5. Porównanie udziału % 24-epibrasinolidu w produktach pszczelich uzyskanych z kolonii kontrolnych i doświadczalnych.

Nazwa przedmiotu badań	Udział masowy 24-epibrasinolidu, %	
	Kolonie kontrolne (I)	Kolonie pszczół z ApiBrassin (II)
Pianka z miodu	$8,6 \cdot 10^{-6}$	$8,2 \cdot 10^{-6}$
Pyłek pszczeli	$5,2 \cdot 10^{-6}$	$5,9 \cdot 10^{-6}$
Plaster miodu	$3,2 \cdot 10^{-6}$	$5,3 \cdot 10^{-6}$
Ekstrakt pszczeli	$0,5 \cdot 10^{-6}$	$5,8 \cdot 10^{-6}$

	Wydział Medycyny Weterynaryjnej Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska	Wersja załącznika 2
Nr załącznika Z/PLAB-10/1	RAPORT KOŃCOWY NR 1/2022	Strona 8 z 8

Tym samym udział procentowy 24-epibrasinolidu w miodzie i produktach pszczelich w rodzinach pszczelich po zastosowaniu ApiBrassin (II) utrzymywał się na bardzo niskim poziomie, porównywalnym z jego naturalną zawartością w różnych produktach roślinnych przyjmowanych przez ludzi. Uzyskane dane dotyczące udziału masowego 24-epibrasinolidu w ekstrakcie pszczoł po zastosowaniu ApiBrassin (II) okazały się nieco wyższe niż w kontroli, ale na mniej więcej takim samym poziomie jak w pianie miodowej pobranej od pszczoł, które nie otrzymywały ApiBrassin (I) i w granicach błędów w tej metodzie pomiaru.

5. Wnioski

Mieszanka paszowa uzupełniająca dla pszczoł ApiBrassin jest dla pszczoł nieszkodliwa. Stosowanie ApiBrassin zgodnie z zaleceniami producenta stymuluje rozwój rodzin pszczelich i skutecznie zwiększa wydajność miodową pszczoł. Produkty pszczelarskie po zastosowaniu ApiBrassin można stosować bez ograniczeń.

Data i podpis Kierownika badań

Data i podpis