

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **213070**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **390097**

(51) Int.Cl.  
**A01N 65/08 (2009.01)**  
**A01N 65/22 (2009.01)**  
**A01P 7/02 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **30.12.2009**

(54)

**Zastosowanie izolatu z orzecha włoskiego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**04.07.2011 BUP 14/11**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**31.01.2013 WUP 01/13**

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT PRZEMYSŁU ORGANICZNEGO,  
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**JERZY KAZIMIERCZAK, Warszawa, PL**  
**WIESŁAW LONDZIN, Zabrzeg, PL**  
**AGNIESZKA ŁYSIK, Warszawa, PL**  
**DANUTA BOMBIŃSKA, Warszawa, PL**  
**SYLWIA SOBERA-MADEJ, Warszawa, PL**  
**SYLWIA PORĘBSKA, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Grażyna Padee**

**PL 213070 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie izolatu z orzecha do wytwarzania preparatu do zwalczania roztoczy u pszczoł.

Roztocza występujące w otoczeniu człowieka, jak i inne występujące w środowisku naturalnym, przenoszą patogenne drobnoustroje, odpowiedzialne za wiele chorób skórnych i ogólnoustrojowych. Odrębną grupę roztoczy stanowią *Varroa destructor*, atakujące owady, zwłaszcza owady użytkowe. Są szczególnie niebezpieczne dla pszczoł, gdyż wywołują warrozę, groźną chorobę niszczącą rodziny pszczele.

Dotychczasowe zwalczanie roztoczy polega głównie na stosowaniu pestycydów. Jako przykłady znanych środków stosowanych przeciwko roztoczom można wymienić fipronil, amikacynę, fluwalinat, kumafos, bromfenwinfos i inne. Preparaty te stosowano do ochrony zwierząt domowych przed kleszczami, jak również do leczenia pszczoł z warrozą. Jednak chemiczne preparaty powinny być stosowane z wyjątkową ostrożnością ze względu na ich wysoką toksyczność.

W ostatnich latach w leczeniu pszczoł zastosowano wiele preparatów pochodzenia roślinnego, np. olejki ekstrahowane z roślin (PL 186883), ekstrakt z piołunu (BG 104676), ekstrakt z melisy lekarskiej (BG 783), cytral i geraniol w połączeniu z amitrazą (US 5230894), izobaty z grzybów (US 2009006880), terpeny (WO 9107875), ekstrakt z chmielu (WO 2008060591) i inne, jednak wiele z nich cechuje stosunkowo niska aktywność.

Od wielu lat w medycynie naturalnej stosuje się orzech włoski (*Juglans regia L.*). Liście i zielone łupiny orzecha włoskiego mają właściwości przeciwbakteryjne i przeciwzapalne, a także przeciwbiegunkowe i przeciwkrwotoczne. Ze względu na dużą ilość garbników polecane są jako środek ściągający w zaburzeniach żołądkowo-jelitowych. Odwar stosuje się w stanach zapalnych gardła i jamy ustnej, oraz do przemywania i okładów przy trądziku, liszajach, oparzeniach. Zielone orzechy niszczą pasożyty układu pokarmowego. Napar z kory jest środkiem łagodnie przeczyszczającym. Owoce ze względu na nienasycone kwasy tłuszczowe zalecane są w diecie przeciwmiażdżycowej. Z oleju z orzecha wyizolowano olej alfa-linolenowy [CN101057661]. Izolacje aktywnych składników prowadzono za pomocą ekstrakcji mieszaniną alkohol - woda w stosunku 1:10 przez 14 dni i następnie alkohol - woda w stosunku 10:1 [RU2258438]; przedstawiono również sposób polegający na wyciskaniu oleju po ogrzaniu owoców [CN1712505]. Olej z orzecha podawano w formie miękkich kapsułek [CN101073343]. Wyizolowany z orzecha (skorupa i jądro) inhibitor alfa-glikozydazy (wodno-alkoholowa ekstrakcja) zastosowano do zwalczania cukrzycy [CN101073596]; stosowany również w leczeniu demencji [CN101049435]; ekstrakt z owoców i liści stosowany był jako dodatek do żywności [KR20030012751]; ekstrakt z łupin i jąder stosowany do zwalczania cukrzycy [JP2005120031] oraz jako antyoksydant [JP2004107314]; stosowany w kosmetyce [JP2004107314]; stosowano w chorobach serca [CN101073631]; ekstrakt z liści i młodych owoców wykazuje działanie przeciwnowotworowe, w ekstrakcie znaleziono odpowiedzialne za to związki diaryloheptanowe [CN101066964]; ekstrakt z owoców liofilizowanych stosowano przeciwko zakażeniom bakteryjnym, grzybowym i wirusowym [W02007141158], [W02006017705], [US2006034956]; ekstrakt z owoców stosowano do leczenia osteoporozy i chorób skórnych [CN1927261]; do monitorowania i zwalczania szkodników drzew owocowych [UA6799U]; ekstrakt stosowano jako pestycyd [CN1781376] oraz do zwalczania należącego do rzędu roztoczy czerwonego pająka będącego szkodnikiem dla drzew chińskiego kasztanowca (CN101352181).

W literaturze nie znaleziono informacji o zastosowaniu ekstraktu z orzecha włoskiego do zwalczania roztoczy atakujących pszczoły. Tymczasem roztocza występują w około 30 tysiącach gatunków, dostosowanych do różnych środowisk, a w konsekwencji o odmiennych cechach gatunkowych. Ich wspólną cechą jest tylko zlanie głowotułowia z odwłokiem i brak śladów segmentacji na zewnątrz. W dostępnych publikacjach brak jest jakiegokolwiek sugestii o możliwości zastosowania ekstraktu z orzecha włoskiego do zwalczania szczególnego rodzaju roztoczy atakujących pszczoły.

Istotą wynalazku jest zastosowanie izolatu z orzecha włoskiego do wytwarzania preparatu do zwalczania roztoczy u pszczoł, korzystnie roztoczy *Varroa destructor* lub *Typhlodromus pyri* Sch.

Korzystnie izolat z orzecha włoskiego stosuje się w mieszaninie z olejkim eterycznym i/lub z chemicznym środkiem roztoczebójczym, takim jak fipronil, amikacyna, fluwalinat, kumafos, bromfenwinfos, amitraza.

Korzystnie stosuje się mieszaninę izolatu z orzecha włoskiego z olejkiem rozmarynowym i/lub tymolem.

Korzystnie izolat z orzecha włoskiego stosuje się naprzemiennie z chemicznymi środkami zwalczającymi roztocza, takim jak fipronil, amikacyna, fluwalinat, kumafos, bromfenwinfos, amitraza.

Korzystnie izolat z orzecha włoskiego wprowadza się do ula z wykorzystaniem kształtki nasączonej izolatem lub kształtki pokrytej izolatem. Korzystnie kształtka jest wykonana z materiału naturalnego lub z tworzywa sztucznego.

Korzystnie izolat z orzecha włoskiego stosuje się do wylewania lub opryskiwania ula.

Korzystnie stosuje się izolat z orzecha włoskiego uzyskany za pomocą rozdrabniania części roślin orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.), ekstrahowania rozdrobnionych części rozpuszczalnikiem organicznym i usuwania rozpuszczalnika z ekstraktu. Częściami orzecha włoskiego, z których prowadzi się ekstrakcję są liście, owoce lub łupiny.

Korzystnie jako rozpuszczalniki organiczne do ekstrakcji stosuje się węglowodory, estry organicznych kwasów, alkohole, etery, najkorzystniej octan etylu lub etanol.

Korzystnie ekstrakcję prowadzi przy użyciu metody działania ultradźwiękami.

Korzystnie jest również, gdy izolat z orzecha włoskiego uzyskany się za pomocą wymywania z kolumny wypełnionej rozdrobnionymi częściami orzecha włoskiego, takimi jak, liście, owoce lub łupiny.

Liście zbierano w okresie późnej wiosny (maj, czerwiec), gdy były w pełni wykształcone, odrywano je z łodyżek, mielono, by otrzymać cząstki nie większe niż 1-2 mm. W tej postaci wprowadzano je do etapu ekstrakcji.

Młode owoce orzecha włoskiego zbierano w okresie lata przed utwardzeniem się skorupy owocu. Owoce mielono na śrutę o wielkości ok. 2 mm. W tej postaci wprowadzano je do etapu ekstrakcji.

Łupiny zielone pozostające po usunięciu skorupy orzecha zbierano w okresie jesieni. Łupiny mielono na śrutę o wielkości ok. 2 mm. W tej postaci wprowadzano je do etapu ekstrakcji.

Ekstrakcję prowadzono rozpuszczalnikami organicznymi w temperaturze pokojowej w czasie kilkudziesięciu godzin. W tym czasie korzystnie prowadzono naświetlanie ultradźwiękami w czasie 20 minut i sporadycznie mieszano mechanicznie. Następnie odsączano części stałe, przemywano rozpuszczalnikiem organicznym i po połączeniu przesącze zatężano do sucha. Otrzymywano produkt w postaci gęstego ciemnobrązowego oleju.

Badania biologiczne obejmowały próby na dwóch bioindykatorach: roztoczu drapieżnym *Typhlodromus pyri* Sch. oraz na *Varroa destructor*.

Do oceny aktywności roztoczebójczej naturalnych ekstraktów na roztocza *V. destructor* zastosowano zmodyfikowaną metodę opracowaną przez Milaniego (Milani N., 1995. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie* 26, s. 415-429; Milani N., 2001. Activity of oxalic and citric acids on the mite *Varroa destructor* in laboratory assays. *Sciences*, s. 127-138, 1995, 2001). W metodzie tej badane izobaty nanoszono na szklane płytki pokryte woskiem, płytki umieszczano w komorach nanoszono na nie pasożyty i komory zamykano. Ocenę wykonywano po 24 godzinach. Stosowano po 3 x 10 osobników w 3 powtórzeniach dla każdego izolatu. Kontrolę również prowadzono na 3 x 10 osobników.

Do obserwacji wykorzystano mikroskop stereoskopowy. Używając pędzelka klasyfikowano je w następujące kategorie:

- roztocza żywe - kiedy poruszały się spontanicznie, nie wykazując oznak porażenia;
- roztocza porażone - kiedy wykazywały oznaki zmniejszonej koordynacji w porównaniu do kontroli;
- roztocza w stanie agonii - kiedy wciąż drgały, lecz były niezdolne do ruchu;
- roztocza martwe - kiedy nie reagowały na trzykrotną stymulację.

Śmiertelność roztoczy obliczono dodając osobniki w stanie agonii do osobników martwych. Obserwacje śmiertelności w grupach badanych odnoszono odpowiednio do grupy kontrolnej.

Roztocza *Typhlodromus pyri* Sch., zamknięte w szczelnych urządzeniach testowych, narażane są na kontaktowe działanie badanej substancji. Ocena aktywności roztoczebójczej badanych substancji polega na określeniu procentu śmiertelności oraz nietypowego zachowania roztoczy, poddanych działaniu ekstraktów z orzecha włoskiego. Badania wykazały wysoką aktywność izolatów z orzecha, sięgającą do 100% (np. etanolowe ekstrakty z liści i łupin stężeniu poniżej 1%).

Izolaty z orzecha włoskiego mogą stanowić doskonałe uzupełnienie lub mogą zastąpić chemiczne środki ochrony pszczoł.

Na podstawie uzyskanych wyników badań można zaproponować zastąpienie terapii chemicznymi środkami pestycydowymi terapią przy użyciu izolatów z orzecha włoskiego samych lub w mie-

szaninie z tymolem lub olejkami eterycznymi, na przykład, olejkim rozmarynowym. Możliwe jest również stosowanie terapii zamiennej, np. stosowanie w jednym roku jednego z chemioterapeutyków, na przykład, amitrazu, zaś w następnym izolatów z orzecha włoskiego, co pozwoli na zmniejszenie zagrożeń spowodowanych np. narastaniem oporności lub innym związanym z gromadzeniem produktów aktywnych lub produktów rozkładu w miodzie lub w wosku. Możliwa jest też do zastosowania strategia stosowania bezpieczniejszych izolatów z orzecha włoskiego w czasie małego lub średniego nasilenia warrozy, zaś dopiero w przypadkach bardzo silnego porażenia wykorzystania chemioterapeutyków.

Poniżej, aktywność izolatów z orzecha włoskiego będzie zilustrowana w przykładach.

#### Przykład 1

Przygotowanie octanowego izolatu (ekstraktu) z liści orzecha włoskiego

Liście orzecha (zebrane w sezonie wiosennym) oderwano od łodyg i zmielono. Porcję o masie 300 g zalano 0,5 l octanu etylu. Mieszaninę poddawano działaniu ultradźwięków w czasie 20 minut. Następnie pozostawiono w czasie 24 godzin i rozpuszczalnik zdekantowało. Dodano nową porcję 350 ml octanu etylu. Ponownie poddawano działaniu ultradźwięków w czasie 20 minut. Pozostawiono na 24 godziny i odsączono. Połączono dekantat i przesącz, i oddestylowano rozpuszczalnik. Otrzymano 7,4 g pozostałości.

#### Przykład 2

Przygotowanie etanolowego izolatu (ekstraktu) z liści orzecha włoskiego

Liście orzecha (zebrane w sezonie wiosennym) oderwano od łodyg i zmielono. Porcję o masie 314 g zalano 0,5 l etanolu. Poddano działaniu ultradźwięków w czasie 20 minut. Następnie pozostawiono w czasie 24 godzin, rozpuszczalnik zdekantowano i dodano 500 ml etanolu. Ponownie poddawano działaniu ultradźwięków w czasie 20 minut. Pozostawiono w czasie 24 godzin i przesączono. Połączono dekantat i przesącz, i oddestylowano rozpuszczalnik. Otrzymano 19,2 g pozostałości, którą przekazano do badań biologicznych.

#### Przykład 3

Przygotowanie octanowego izolatu (ekstraktu) z owoców orzecha włoskiego

Orzechy rozdrobniono i porcję o masie 200 g zalano 200 ml octanu etylu. Poddano działaniu ultradźwięków w czasie 20 minut i pozostawiono na 24 godziny. Następnie odsączono części stałe, zaś z przesączu oddestylowano rozpuszczalnik i otrzymano 3,5 g pozostałości w postaci gęstego oleju o barwie jasnobrązowej.

#### Przykład 4

Przygotowanie etanolowego izolatu (ekstraktu) z owoców orzecha włoskiego

Orzechy młode (bez wykształconej twardej skorupy) rozdrobniono i porcję o masie 200 g zalano 200 ml etanolu. Poddano działaniu ultradźwięków w czasie 20 minut i pozostawiono na 24 godziny. Następnie odsączono części stałe, zaś z przesączu oddestylowano rozpuszczalnik i otrzymano 25,3 g pozostałości w postaci oleju o barwie jasnobrązowej.

#### Przykład 5

Przygotowanie octanowego izolatu (ekstraktu) z zielonych łupin z owoców orzecha włoskiego

Zielone łupiny po wyluskaniu owoców orzechy rozdrobniono i porcję o masie 1384 g zalano 0,5 l octanu etylu. Poddano działaniu ultradźwięków w czasie 20 minut i pozostawiono na 24 godziny. Następnie odsączono części stałe, przemyto na sączku 1000 ml octanu etylu, przesącze połączono i oddestylowano z nich rozpuszczalnik. Otrzymano 18,8 g pozostałości w postaci oleju o barwie brązowej.

#### Przykład 6

Przygotowanie etanolowego izolatu (ekstraktu) z łupin owoców orzecha włoskiego

Porcję zmielonych łupin o masie 1025 g umieszczono w szklanej kolumnie zaopatrzonej w kranik. Zalano 1000 ml etanolu. Po 24 godzinach zlano ekstrakt o ciemno brązowej barwie. Dodano kolejną porcję 500 ml etanolu i postępowanie powtarzano dwukrotnie, do uzyskania ekstraktu o jasno brązowej barwie. Zużyto łącznie 2500 ml etanolu. Po oddestylowaniu etanolu otrzymano 55,7 g pozostałości w postaci oleju o barwie brązowej.

#### Przykład 7

Rozdział chromatograficzny ekstraktu octanowego z liści orzecha włoskiego

Ekstrakt octanowy z orzecha (6,6 g) rozpuszczono w mieszaninie octan etylu - acetonitryl (70 ml), oddzielono od nierozpuszczonej pozostałości i zatężono z 1 g żelu krzemionkowego. Pozostałość o masie 1,4 g naniesiono na kolumnę chromatograficzną wypełnioną 20 g żelu krzemionkowego. Kolumnę eluowano heksanem (50 ml), heksan-octan etylu 8:1 (90 ml), heksan-octan etylu 6:1 (35 ml), heksan-octan etylu 2:1 (90 ml), octan etylu (80 ml), metanol (50 ml). Zbierano porcje po 20 ml roztworu. Roz-

twory badano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach Merck - Kieselgel 60 F<sub>254</sub>. Płytki rozwijano przy pomocy mieszaniny heksan - octan etylu w stosunku 3:2.

Połączono frakcje o podobnej zawartości składników. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymano następujące frakcje pozostałości:

frakcja I	0,045 g
frakcja II	0,024 g
frakcja III	0,037 g
frakcja IV	0,213 g

#### Przykład 8

Badanie aktywności roztoczobójczej izolatów z orzecha włoskiego

Do oceny aktywności roztoczobójczej naturalnych ekstraktów z orzecha włoskiego na roztocza *V. destructor* zastosowano zmodyfikowaną metodę opracowaną przez Milaniego (1995, 2001). Modelowe urządzenia badawcze tej metody to komory składające się z dwóch szklanych płytek pokrytych woskiem i łączącej je gumowej uszczelki. Roztwory preparatów наносzono poprzez oprysk za pomocą wieży Pottera na szklane płytki pokryte woskiem, a po wyschnięciu opryskaną powierzchnią skierowaną do środka montowano w zamknięte komory. Kontakt *V. destructor* z traktowanym podłożem trwał nieprzerwanie 24 h od momentu opuszczenia roztoczy do komór testowych. W doświadczeniach stosowano 3 powtórzenia po 10 dorosłych osobników dla każdej badanej substancji. Równolegle z serią badaną prowadzono kontrolę (3 x 10 sztuk roztoczy w jednym powtórzeniu), która nie miała kontaktu z badanym materiałem. Śmiertelność roztoczy oceniano po 24 h od momentu przeniesienia roztoczy do urządzeń testowych. Do obserwacji wykorzystano mikroskop stereoskopowy. Używając pędzelka klasyfikowano je w następujące kategorie:

- roztocza żywe - kiedy poruszały się spontanicznie, nie wykazując oznak porażenia;
- roztocza porażone - kiedy wykazywały oznaki zmniejszonej koordynacji w porównaniu do kontroli;
- roztocza w stanie agonii - kiedy wciąż drgały, lecz były niezdolne do ruchu;
- roztocza martwe - kiedy nie reagowały na trzykrotną stymulację.

Śmiertelność roztoczy obliczono dodając osobniki w stanie agonii do osobników martwych. Obserwacje śmiertelności w grupach badanych odnoszono odpowiednio do grupy kontrolnej. Śmiertelność skorygowaną obliczono wg wzoru Schneider-Orelli.

Wyniki zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1  
Wpływ izolatów z orzecha włoskiego na śmiertelność roztoczy *Varroa destructor*

Izolat	Dawka	Śmiertelność [%]	Śmiertelność skorygowana kontrolą* [%]	Śmiertelność skorygowana z kontrolą DMF** [%]
Etanolowy z liści	0,4 g + 8 ml DMF	90,00	88,89	89,20
Octanowy z liści	0,4 g + 8 ml DMF	43,33	37,03	38,80
Etanolowy z owoców	0,35 g + 8 ml DMF	40,00	28,06	35,21
Octanowy z owoców	0,35 g + 8 ml MF	30,00	16,07	24,41
Kontrola DMF		16,66	7,40	-
Kontrola		10,00	-	-

\* śmiertelność skorygowaną obliczono według wzoru Schneider-Orelli.

\*\* wartość obliczona według wzoru Schneider-Orelli.

#### Przykład 9

Do oceny aktywności roztoczobójczej izolatów (ekstraktów) z naturalnych źródeł na drapieżne roztocza *Typhlodromus pyri* Sch. zastosowano „metodę wyspowa”: "Laboratory residual contact test with the predatory mite *Typhlodromus pyri* Scheuten (Acari: Phytoseiidae) for regulatory testing of plant protection products" Blümel S. *et al.*, 2000.

Modelowe urządzenie składa się ze szklanej tacy napelnionej do odpowiedniego poziomu wodą, mieszczącej 5 stanowisk badawczych. Podstawowy zestaw, to krążki o średnicy 45 mm i grubości 0,1 mm (tzw. „szkiełka wyspowa”), pływające w szalkach Petriego o średnicy 54 mm na powierzchni wody. Płytki Petriego z krążkami umieszcza się na szklanym statywie wyposażonym w odpowiednie korki do montowania naczyń badawczych, a statyw wstawia się do tacy z wodą. Woda w zestawie badawczym jest zabezpieczeniem przed ucieczką roztoczy oraz służy im do picia. Badany materiał

nanoszony jest na krążki podczas oprysku, które po wyschnięciu przenosi się do szalek Petriego, a całość do skonstruowanego urządzenia badawczego. Kontakt roztoczy z opryskanym podłożem trwa nieprzerwanie 4 dni od momentu przełożenia osobników na krążki.

Opryskiwanie „szkiełek wyspowych” wykonano za pomocą wieży Pottera, składającej się z dwóch rozpylaczy do pośredniego i końcowego oprysku, po uprzedniej kalibracji urządzenia. Przed opryskaniem, szkiełka odtłuszczono, zważono, a sprzęt do spryskiwania wykalibrowano wodą destylowaną, w celu uzyskania odpowiedniej ilości cieczy roboczej na szklanych płytkach. Do przeprowadzenia kalibracji użyto 0,7 ml wody destylowanej na jedno szkiełko o powierzchni 16 cm<sup>2</sup>. Kalibrację przeprowadzono w 3 powtórzeniach. Ciśnienie podczas oprysku wynosiło 0,4 bar. Urządzenie wykalibrowano tak, aby na 1 cm<sup>2</sup> szkiełka padało 2 mg cieczy roboczej ( ± 0,2 mg/1 cm<sup>2</sup> szkiełka). Po oprysku szkiełka ponownie zważono, celem obliczenia ilości cieczy opryskowej.

W doświadczeniu stosowano 3 powtórzenia po 10 dorosłych osobników w każdym.

Równoległe z serią badaną prowadzono kontrolę (3 x 10 sztuk roztoczy w jednym powtórzeniu), która nie miała kontaktu z badanym materiałem. Kontrolne „szkiełka wyspowe” opryskiwano rozpuszczalnikiem użytym do przygotowania roztworów badanego materiału.

Po opryskaniu szkiełek i wyschnięciu cieczy na ich powierzchni (1-1,5 godziny), dodawano na każde pokarm w postaci pyłku sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*), a następnie przekładano delikatnym pędzelkiem dorosłe roztocza, umieszczając całość w naczyniach badawczych, gdzie odbywał się ich dalszy rozwój. W czasie doświadczenia, roztocza miały stały dostęp do wody, a pokarm uzupełniano w miarę potrzeby. Obserwacje śmiertelności prowadzono po 4 dniach narażenia.

Badanie śmiertelności przeprowadzono w kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, wymaganych dla badanego organizmu. Monitoring temperatury i wilgotności rejestrowano w sposób ciągły za pomocą termohigrografu, typ TZ-18 td. Temperatura wynosiła 23-29°C, wilgotność względna powietrza 55-87%, cykl świetlny 16h dzień: 8h noc, natężenie światła 766-768 lx.

Obserwacje śmiertelności w grupach badanych odnoszono odpowiednio do grupy kontrolnej i zapisywano w karcie odczytu wyników.

Śmiertelność roztoczy obliczono dodając osobniki martwe do osobników zaginionych. Wartość tę porównano do liczby roztoczy, występujących na początku doświadczenia. Za martwe przyjmowano te organizmy, które były wysuszone i pomarszczone oraz te, które były nieruchome nawet po dotknięciu ich delikatnym pędzelkiem. Osobniki zaginione to roztocza, które nie można odnaleźć w obszarze badawczym lub utopione w obszarze płytek Petriego.

W tabeli 2 przedstawiono wyniki badań wrażliwości roztoczy *T. pyri* na naturalne ekstrakty z orzecha włoskiego.

Tabela 2  
Aktywność roztoczebójcza ekstraktów z orzecha włoskiego

Izolat według przykładu	Stężenie, [%] rozpuszczalnik	Śmiertelność roztoczy po czasie, [%]			
		1 dzień	2 dni	3 dni	4 dni
1	2	3	4	5	6
1	1,0 / DMF	3,3	6,6	10,0	13,3
	2,0 / DMF	15,0	25,0	50,0	65,0
2	1,3 / DMF+woda	13,3	16,6	20,0	26,6
	2,55/ DMF+woda	16,6	20,0	30,0	46,6
3	1,0 / DMF	0	0	0	3,3
	2,7 / DMF	33,3	33,3	40,0	46,6
4	1,0 / DMF	0	3,3	6,6	13,3
	2,0 / DMF	3,3	6,6	13,3	26,6
5	1,0 / DMF	0	0	3,3	6,6
	2,0 / DMF	0	0	6,6	20,0
6	1,0 / DMF	13,3	26,6	26,6	46,6
	2,0 / DMF	66,6	100	100	100

cd. tabeli

1	2	3	4	5	6
7	Fr.I-0,97/ aceton	100	100	100	100
	Fr.II-1,2/ DMF	20	20	25	35
	Fr.III-1,9 /DMF	15	25	40	50
	Fr.IV-1,8 /DMF	15	35	35	35
Kontrola	0,0	0	10	10	10
DMF	0,0	0	12	12	15
Aceton	0,0	0	10	10	10

### Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie izolatu z orzecha włoskiego do wytwarzania preparatu do zwalczania roztoczy u pszczoł.

2. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że preparat stosuje się do zwalczania roztoczy *Varroa destructor* lub *Typhlodromus pyri* Sch.

3. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że izolat z orzecha włoskiego stosuje się w mieszaninie z olejkiem eterycznym i/lub z chemicznym środkiem roztoczobójczym, takim jak fipronil, amikacyna, fluwalinat, kumafos, bromfenwinfos, amitraza.

4. Zastosowanie według zastrz. 3, **znamiennie tym**, że stosuje się mieszaninę izolatu z orzecha włoskiego z olejkiem rozmarynowym i/lub tymolem.

5. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że izolat z orzecha włoskiego stosuje się naprzemiennie z chemicznymi środkami zwalczającymi roztocza, takim jak fipronil, amikacyna, fluwalinat, kumafos, bromfenwinfos, amitraza.

6. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że izolat z orzecha włoskiego wprowadza się do ula z wykorzystaniem kształtki nasączonej izolatem lub kształtki pokrytej izolatem.

7. Zastosowanie według zastrz. 6, **znamiennie tym**, że kształtka jest wykonana z materiału naturalnego lub z tworzywa sztucznego.

8. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że izolat z orzecha włoskiego stosuje się do wylewania lub opryskiwania ula.

9. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że stosuje się izolat z orzecha włoskiego uzyskany za pomocą rozdrabniania części roślin orzecha włoskiego *Juglans regia* L., ekstrahowania rozdrobnionych części rozpuszczalnikiem organicznym i usuwania rozpuszczalnika z ekstraktu.

10. Zastosowanie według zastrz. 9, **znamiennie tym**, że częściami orzecha włoskiego, z których prowadzi się ekstrakcję są liście, owoce lub łupiny.

11. Zastosowanie według zastrz. 9 albo 10, **znamiennie tym**, że jako rozpuszczalniki organiczne do ekstrakcji stosuje się węglowodory, estry organicznych kwasów, alkohole, etery.

12. Zastosowanie według zastrz. 11, **znamiennie tym**, że jako rozpuszczalniki stosuje się octan etylu lub etanol.

13. Zastosowanie według zastrz. 9 albo 10, albo 11, albo 12, **znamiennie tym**, że ekstrakcję prowadzi przy użyciu metody działania ultradźwiękami.

14. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że stosuje się izolat z orzecha włoskiego uzyskany się za pomocą wymywania z kolumny wypełnionej rozdrobnionymi częściami orzecha włoskiego, takimi jak, liście, owoce lub łupiny.

