

INVESTIGATION OF THE BIOCIDAL PROPERTIES OF MIXTURES OF BINARY METAL NANOPARTICLES (SILVER, ZINC, COPPER)

Paliy A. P., Zavgorodniy A. I., Sumakova N. V., Yaroshenko M. O., Kolchuk O. V., Korneikov O. M., Kovalenko L. V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Belikov K. M., Varchenko V. V., Bunina Z. Yu.

Scientific and Technical Center "Institute of Single Crystals" of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

One of the most relevant areas of scientific support in the field of veterinary medicine is the development and comprehensive evaluation of the effectiveness of antimicrobial agents under current requirements and taking into account the spread of antibiotic-resistant strains of pathogens. Today, among the promising ways to expand the range of disinfectants to ensure effective general veterinary and sanitary, and antiepidemiological measures in livestock production is the use of modern chemical and biotechnologies, in particular those based on metal nanoparticles. The study aimed to investigate the spectrum of antimicrobial action of a mixture of binary nanoparticles of Ag, Zn, and Cu metals. The biocidal properties of the nanocomposite with a metal concentration of Ag — 367.2 mg/l, Zn — 287.76 mg/l, and Cu — 4.8 mg/l were studied on the model of cultures of enterobacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, micromycetes *Aspergillus flavus* and larvae of helminths *Toxocara canis* using conventional methods. Microbiological studies have shown that the Ag-Zn-Cu nanocomposite exhibits bactericidal properties against the test cultures of *S. aureus* and *E. coli* and disinfects 100% of the test objects (tile, wood, cambric) contaminated by them at a concentration of 5.0% at an exposure time of 3 h and a concentration of 10.0% at an exposure time of 1 h. The Ag-Zn-Cu nanocomposite at a concentration of 5.0% with an exposure time of 1 h has a bacteriostatic effect on *S. aureus* and *E. coli*: on average, 98.2 and 99.4% of the cells were inactivated on tile, 95.3 and 97.5% on wood, and 98.4 and 99.1% on cambric, respectively. The nanocomposite at experimental concentrations (10.0–75.0% solution) at 20 ± 0.5 °C for 60, 120 and 180 min showed fungicidal properties against the test culture of *A. flavus*. In addition, a significant fungistatic effect against *A. flavus* was found with an 8.0% solution; a slight growth inhibition was observed with a 6.0% solution. The nanocomposite in 3.0 and 5.0% solutions showed neither fungicidal nor fungistatic properties under the above conditions. Treatment of the test culture with 5.0% and 10% solutions for 9, 12, 24, and 48 h affected the development of *T. canis* eggs and caused their death at the larval stage (larvae stopped moving and began to be destroyed). It was found that at an exposure time of 48 h and a concentration of 10.0%, the nanocomposite showed disinfestation activity, delaying the embryogenesis and invasive ability of larvae, and disinfested test objects contaminated with helminth eggs with high efficiency (up to 88.3–95.9%). The Ag-Zn-Cu nanocomposite exhibits bactericidal properties against the test cultures of enterobacteria *S. aureus* and *E. coli* and disinfects the test objects contaminated with them at a concentration of 5% at an exposure of 3 h and a concentration of 10.0% at an exposure of 1 h. The lowest concentration of the nanocomposite ensured complete inactivation of the *A. flavus* test culture at 20 ± 0.5 °C was 10%. The nanocomposite at a concentration of 10.0% for 24 and 48 h disinfects test objects contaminated with *T. canis* eggs and reduces the invasive ability of the larvae. Thus, the new data on the spectrum of biocidal action of metal nanoparticles make it possible to improve the development of innovative directions for controlling the level of pathogenic and opportunistic microorganisms in the environment.

Keywords: metal nanoparticles, concentration, exposure, test culture, antimicrobial properties

УДК 619:615.28:638.143.11

DOI [10.36016/VM-2024-110-23](https://doi.org/10.36016/VM-2024-110-23)

ЕФЕКТИВНІСТЬ ДЕЗІНФЕКЦІЇ ЗА УМОВ ЕКОЛОГІЧНОГО ВИРОБНИЦТВА ПРОДУКЦІЇ БДЖІЛЬНИЦТВА

Руденко Є. В., Сумакова Н. В., Руденко О. П., Санін Ю. К., Ємельянов А. В., Коваленко О. А.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: rud.ev.v@gmail.com

Метою роботи було дослідження ефективності дезінфікуючих засобів з різними активніючими речовинами за екологічного виробництва продукції бджільництва на пасіках різних регіонів України. Дослідження проводили у виробничих умовах Харківської, Дніпропетровської та Полтавської областей у період з 2012 по 2022 рр. Усього в

дослідженнях було задіяно 1 400 бджолиних сімей карпатської і сірої української порід бджіл. Бджоли утримувались в типових вуликах, пасіки були медово-запилувального напрямку діяльності. Пасіки, протягом періоду досліджень, в активний сезон вивозили на кочівлю в межах указаних регіонів. Проведення постійного епізоотологічного моніторингу на пасіках дозволило контролювати і профілакувати виникнення та перебіг інфекційних хвороб бджіл, які були задіяні в досліді протягом вказаного періоду. Для клінічного дослідження бджолиних сімей проводили їх періодичні обстеження для виявлення характерних ознак перебігу інфекційних хвороб бджіл — строкатість розплоду, характерні зміни печатного та відкритого розплоду бджіл, наявність загублених личинок чи лялечок, які характерні для інфекційних хвороб, таких як американський та європейський гнилець, парагнилець, аскофероз тощо. Протягом досліду було виявлено близько 2 % бджолиних сімей, у яких проявлялись певні клінічні ознаки захворювань та особливості їх перебігу у вигляді змішаних інфекційних хвороб. Для профілактики розповсюдження та виникнення нових випадків захворювань було впроваджено і здійснювався комплекс ветеринарно-санітарних заходів, який включає проведення вимушеної і планової дезінфекції стільників і вуликів, обробки проти інфекційних хвороб бджіл. З урахуванням сучасних вимог до якості і безпечності продукції бджільництва було досліджено кілька комерційних препаратів з різною активною речовиною — надацтова кислота, перекис водню та комбіновані препарати з цими діючими речовинами

Ключові слова: бджоли, дезінфекція, інфекційні хвороби, перекисні сполуки

Бджоли є активною складовою екосистемою, вони виконують важливу функцію в запиленні багатьох рослин, що забезпечує їх існування і збереження біорізноманіття. Завдяки активній участі бджіл у природі, здійснюється адаптація до змін клімату і підвищення виробництва продукції сільськогосподарського виробництва. У нашому житті 75 % сільськогосподарських культур потребують запилення бджолами та іншими комахами для стійкого виробництва продукції і врожайності культур. Медоносні бджоли дають можливість забезпечувати людей цінними продуктами харчування та сировиною для багатьох переробних галузей.

Одним із головних правил збереження бджіл у природі є недопущення виникнення інфекційних хвороб та їх розповсюдження на пасіках. Заборона застосування в бджільництві антибіотиків та інших лікувальних препаратів (сульфаніламідів, фуранових сполук тощо) вивела на перший план дезінфекцію в боротьбі з заразними хворобами бджіл. Тому, дезінфекція є основою ефективною профілактикою і боротьби з інфекційними хворобами бджіл. Крім того, дезінфекція є універсальним заходом у ліквідації хвороб тварин та бджіл. У бджільництві цей спосіб боротьби з заразними хворобами має головне, універсальне значення, так як є ефективним методом боротьби при захворюваннях бактеріальної, вірусної, грибної чи змішаної етіології. Проведення дезінфекції спрямовано на розрив епізоотичного ланцюга при інфекційному захворюванні за рахунок знезараження факторів передачі збудників інфекційних хвороб бджіл [1].

У бджільництві, одним із основних факторів передачі збудників інфекційних хвороб є стільники, в яких формуються розплід та кормові запаси. У стільниках відмічають найбільше накопичення різної мікрофлори, у тому числі і патогенної. На пасіки, які є благополучними щодо інфекційних хвороб, збудників захворювань часто заносять із забрудненими стільниками, вошиною, продуктами бджільництва, льотними бджолами, роями або бджолопакетами та матками, які закупають в інших господарствах. У результаті життєдіяльності бджіл безпосередньо в стільниках накопичуються залишки коконів, контамінована перга та мед, залишки загублених личинок тощо. Бджоли здатні самі очищати гніздо, але не завжди це буває достатньо ефективно. І якщо не проводити планову профілактичну дезінфекцію, то в бджолиній сім'ї накопичується критичний рівень патогенної мікрофлори, який здатний викликати інфекційні хвороби [2, 3, 4].

Згідно з останніми нормативними документами Європейської Комісії, у відповідності з впровадження системи безпечності при виробництві, переробці, зберіганні і споживанні продукції тваринництва, в тому числі і меду, чітко регламентуються правила виробництва органічної продукції, а також речовини і методи, які застосовуються для цього виробництва. Використання засобів для очищення та дезінфекції в бджільництві при органічному виробництві

регулюється за регламентом 2092/91, де були перелічені речовини дозволені для застосування для дезінфекції у бджільництві. Але з часом, вимоги до якості і безпечності продукції бджільництва зростали і за останні 10 років суттєво змінились [5, 6].

Екологічно обґрунтований підхід до очистки та дезінфекції у бджільництві полягає в тому, щоб визначити паритет між досягненням ефективності дезінфекції і негативним впливом на якість продуктів бджільництва та екологію [2, 5].

Враховуючи високу стійкість збудників інфекційних хвороб бджіл у зовнішньому середовищі і в продуктах бджільництва, багатьма дослідниками розроблялися санітарні заходи, спрямовані на нейтралізацію механізму передачі збудників інфекційних хвороб.

Найбільш практичним виявився хімічний спосіб знезараження бджолярського інвентарю, стільників та вуликів. За багаторічну практику досліджень у цьому напрямку було вивчено безліч дезінфікуючих речовин, які належать до різних груп хімічних сполук [1, 3, 4].

У сучасних умовах розвитку бджільництва, при екологізації технологічних процесів виробництва продуктів бджільництва, при зростаючих вимогах до якості і безпечності цих продуктів, — зростає значення дезінфекції, в основі якої полягають принципи здоров'я людей, екології та економічна ефективність [5, 6].

Мета роботи — дослідити ефективність дезінфікуючих засобів за умов екологічного виробництва продукції бджільництва при змішаних інфекційних хворобах бджіл.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на пасіках різних регіонів України у період 2012–2022 рр., де реєстрували змішану форму перебігу інфекційних хвороб бджіл, що підтверджено виділенням культур збудників інфекційних хвороб розплоду бджіл: американського гнильцю — *Paenibacillus larvae* ssp. *larvae*, європейського — *Paenibacillus alvei*, парагнильцю — *Paenibacillus paraalvei*, а також міцелій і спори патогенних грибів — *Asc. apis*, *Asp. niger*, *Asp. flavus*. Всього в дослідженнях було задіяно 1 400 бджолиних сімей карпатської і сірої української порід бджіл із трьох областей України — Харківської, Дніпропетровської та Полтавської.

Бджоли утримувались у типових вуликах, пасіки були медово-запилувального напрямку діяльності. Пасіки, протягом періоду досліджень, в активний сезон вивозили на кочівлю в межах указаних регіонів. Проведення постійного епізоотологічного моніторингу на пасіках дозволило контролювати і профілакувати виникнення та перебіг інфекційних хвороб бджіл, які були задіяні в досліді протягом вказаного періоду. Для клінічного дослідження бджолиних сімей проводили їх періодичні обстеження для виявлення характерних ознак перебігу інфекційних хвороб бджіл — строкатість розплоду, характерні зміни печатного та відкритого розплоду бджіл, наявність загиблих личинок чи лялечок, які характерні для інфекційних хвороб, таких як американський та європейський гнилець, парагнилець, аскофероз тощо. Протягом досліду було виявлено близько 2 % бджолиних сімей, у яких проявлялись певні клінічні ознаки захворювань та особливості їх перебігу у вигляді змішаних інфекційних хвороб.

При вивченні активності дезінфектантів у виробничих умовах використовували готові препаративні форми, дозволені для ветеринарної та медичної практики, які показали високу ефективність бактерицидних, мікоцидних, спороцидних властивостей на тест-культурах, вказаних вище хвороб бджіл. У даних дослідженнях використовували дезінфікуючі засоби із групи окислювачів, які були попередньо протестовані і показали високу ефективність. Було відібрані комерційні препарати, які зареєстровані в Україні на основі діючих речовин: перекису водню (ПЗ-оксонія, перекис водню 30 %); надоцтової кислоти (НОК) (Дивозан форте); комбіновані препарати на основі НОК та перекису водню (Дезосепт форте, ПЗ-оксонія актив С, ПЗо-ксонія актив 150).

Дезінфікуючі розчини готували на пасіках безпосередньо перед застосуванням. Температурний режим робочих розчинів був 20–25 °С, температурні параметри повітря були в залежності від періоду проведення досліді: від 14 ± 2 °С до 20 ± 2 °С. У досліді готували робочі розчини дезінфектантів, які мали температуру 20–25 °С. Досліджувані дезінфікуючі засоби наносили на об'єкти із дрібнодисперсних розпилювачів, до їх рясного зволоження. Стільники обробляли дезрозчинами з розрахунку 100–150 см³ на сторону рамки.

Для досліджень було задіяно технологічно придатні гніздові стільники не більше трьох років експлуатації у вуликах. Стільники мали темно-коричневий та коричневий колір, в окремих випадках з залишками загиблого розплоду.

Результати досліджень. Результати вивчення активності дезінфікуючих розчинів у виробничих умовах пасік при профілактичних та планових санітарних заходах показали, що всі препарати проявили високу ефективність. Протягом кожного активного бджоловодного сезону на жодній пасіці, де проводили ці санітарні заходи, не відмічали рецидивів інфекційних хвороб. Відмічали високу технологічну якість стільників після проведення дезінфекції, а саме — суттєве освітлення стільників з темно-коричневого до світлого кольору, видалення залишків перги.

Робочі розчини усіх препаратів у 0,5 %-й концентрації за мінімальної експозиції (6 год) виявляли активну дію.

У якості контрольного препарату при порівнянні ефективності дезінфікуючих засобів використовували 10 %-й розчин перекису водню, який затверджений у ветеринарії для дезінфекції стільників і бджолярського інвентарю. Розчин перекису водню в концентрації 10 %, активізований додаванням 0,5 %-ї оцтової кислоти, володіє широким спектром активності проти збудників американського, європейського гнильців, парагнильцю і мікозів.

Після встановлення оптимальної експозиції дезінфікуючих розчинів, вивчали температурний режим проведення дезінфекції. Всі дослідження, описані вище, проводили за температури розчинів 20–25 °С, але при виробничих випробуваннях відмічали зниження температури повітря, внаслідок чого спостерігалось зниження температури дезінфікуючих розчинів. Вивчення температурних режимів дезінфекції пов'язано з тим, що у виробничих умовах проведення знезараження стільників і бджолярського інвентарю відбувалося на відкритому просторі за температури повітря 14–18 °С. Проводячи дезінфекції стільників на відкритому просторі відзначали зниження температури робочих розчинів протягом першої години, яка досягала температури навколишнього повітря. З метою досягнення термостатичного ефекту, рамки після обприскування дезінфікуючим розчином складали в вулики і накривали плівкою. При використанні такого прийому зниження температури робочих розчинів дезінфективних відбувалося поступово, протягом 2,5–3 год, а за сонячної погоди температура взагалі не знижувалася і зберігалася на рівні початкової 20–25 °С. Поступове зниження температури водних розчинів дезінфікуючих препаратів до 15 °С не викликало зниження активності дезінфективних або збільшення експозиції їх розчинів на об'єктах. Застосування поліетиленової плівки дозволило досягти термостатичного ефекту для підтримки температури робочих розчинів дезінфікуючих препаратів при знезараженні стільників, бджолярського інвентарю, вуликів.

Результати досліджень свідчать, що досліджувані дезінфікуючі препарати на основі перекисних сполук (надоцтової кислоти, перекису водню та їх комбінації) показали високу ефективність при проведенні дезінфекції стільників у виробничих умовах.

Контроль ефективності дезінфекції проводили шляхом клінічного огляду бджолиних сімей та дослідження змивів з оброблених об'єктів, згідно із загальноприйнятими методами. У всіх випадках результати лабораторних досліджень контрольних змивів були негативними — культур патогенних мікроорганізмів не виділили протягом майже всього періоду досліджень.

В окремі роки на дослідних пасіках відмічали поодинокі випадки клінічного прояву інфекційних хвороб (аскосфероз, американський гнилець), але кількість таких сімей не перевищила 2 % за весь період проведення моніторингу.

Багаторічний моніторинг ефективності застосування екологічних засобів дезінфекції для обробки стільників та іншого реманенту свідчить про високу ефективність цього санітарного заходу в системі профілактики і ліквідації інфекційних хвороб змішаної етіології. Крім того, висока екологічність вказаних хімічних сполук, гарантувала високу якість отриманої продукції бджільництва.

У літературних джерелах зустрічаються дані щодо невисокої ефективності застосування хімічних методів дезінфекції за американського гнильцю, але наші дослідження свідчать, що застосування перекисних сполук при знезараженні стільників виявили високу ефективність при змішаних формах перебігу інфекційних хвороб на пасіках трьох областей України. Що повністю збігається з даними попередніх дослідів у лабораторних умовах на тест-культурах збудників змішаних хвороб бджіл.

Крім того, ризики забруднення продукції бджільництва залишками хімічних сполук дезінфікуючих засобів перекисної групи дуже низькі. Так як, у результаті хімічної реакції цих

хімічних сполук виділяється атомарний кисень, який не виявляє токсичності, що вкрай важливо за екологічних умов виробництва продукції бджільництва.

Висновки. В умовах значного навантаження забруднюючих факторів на навколишнє середовище, і в тому числі мікробіологічного, бджоли стикаються з загрозами виникнення заразних хвороб, які викликають їх ослаблення і загибель. Особливо це стосується змішаних форм прояву інфекційних хвороб бджіл. Щоб попередити виникнення і розповсюдження цих хвороб у бджільництві можливо лише застосування ветеринарно-санітарних і гігієнічних заходів, із застосуванням певного переліку хімічних засобів, які мають високу ефективність і екологічність. І саме дезінфекція є тим дієвим заходом, який дозволяє ефективно знезаразити збудників хвороб бджіл і не контамінувати продукти бджільництва залишками хімічних сполук дезінфікуючих речовин. І, як показали багаторічні дослідження, високу санітарну ефективність і гігієнічні властивості виявили дезінфікуючі засоби на основі перекисних сполук — надоцтової кислоти, перекису водню та їх комбіновані препаративні форми.

Перспективи подальших досліджень: у зв'язку зі значним розповсюдженням змішаних інфекційних хвороб бджіл необхідно постійно проводити профілактичні заходи, які ґрунтуються на комплексі ветеринарно-санітарних заходів. Проведення планової дезінфекції стільників та іншого бджолярського реманенту ефективно профілакує виникнення та розвиток інфекційних хвороб бджіл і гарантує високі гігієнічні якості продукції бджільництва, що робить цей прийом необхідною складовою комплексних заходів у профілактиці хвороб бджіл.

Список літератури

1. OIE. Chapter 4.14. General recommendations on disinfection and disinsection [most recent update adopted in 2014] // Terrestrial Animal Health Code. Paris: OIE, 2014. 2 pp. URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2023/chapitre_disinfect_disinsect.pdf.
2. Guidelines on sustainable management of honey bee diseases in Europe / ed. by G. Formato. ERA-Net SusAn, 2020. 68 p. URL: <https://www.izslt.it/bpractices/wp-content/uploads/sites/11/2020/03/bpractices-guidelines.pdf>.
3. Руденко Є. В. Основи ветеринарної санітарії на пасіках. Харків, 2012. 163 с.
4. APHA. National Bee Unit. Disinfecting a hive after disease. York Biotech Campus, 2024. 8 pp. URL: https://www.nationalbeeunit.com/assets/PDFs/3_Resources_for_beekeepers/Fact_Sheets/Fact_16_Hive_Cleaning_and_Sterilisation_english.pdf.
5. European Commission, Directorate-General For Agriculture and Rural Development, B.4. Organics, EGTOP, Final report on cleaning and disinfection. 2016. 54 pp. URL: https://agriculture.ec.europa.eu/document/download/4ff119b1-b95a-48af-bbff-0830027e337c_en?filename=final_report_egtop_on_cleaning_disinfectant_en.pdf.
6. Bednář M. et al. Hygiene in the apiary (A manual for hygienic beekeeping) / ed. by D. Titěra. BeeShop The research project «Bees in Europe and Sustainable Honey Production», 2009. 30 pp. URL: <https://pershyryk.blogspot.com/2019/02/hygiene-in-apiary-manual-for-hygienic.html>.

DISINFECTATION EFFICIENCY UNDER CONDITIONS OF ECOLOGICAL PRODUCTION OF BEE PRODUCTS

Rudenko Ye. V., Sumakova N. V., Rudenko O. P., Sanin Yu. K., Yemelianov A. V., Kovalenko O. A.
National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

The aim of the study was to investigate the effectiveness of disinfectants with different active ingredients in the ecological production of bee products in apiaries of different regions of Ukraine. The study was conducted in the production conditions of Kharkiv, Dnipro and Poltava regions in the period from 2012 to 2022. A total of 1,400 bee colonies of Carpathian and grey Ukrainian bee breeds were involved in the research. The bees were kept in standard hives, and the apiaries were of the honey-pollination type. During the research period, the apiaries were taken out for nomadic work within the specified regions during the active season. Continuous epizootic monitoring at apiaries allowed us to control and prevent the occurrence and course of infectious diseases of bees involved in the experiments during this period. For the clinical study of bee colonies, periodic examinations were carried out to identify the characteristic signs of infectious bee diseases, such as brood variegation, characteristic changes in the sealed and open brood of bees, the presence of dead larvae or pupae, which are characteristic of infectious diseases such as American and European rot, parasitic rot, ascospheerosis, etc. During the experiment, about 2% of bee colonies were found to have certain clinical signs of diseases and peculiarities of their course in the form of mixed infectious diseases. To prevent the spread and emergence of new cases of diseases, a set of veterinary and sanitary measures was introduced and implemented, including forced and planned disinfection of honeycombs and hives, and treatment against infectious diseases of bees. Taking into account the modern requirements for the quality and safety of beekeeping products, several commercial preparations with different active ingredients were investigated — succinic acid, hydrogen peroxide and combined preparations with these active ingredients

Keywords: honeybees, disinfection, infectious diseases, peroxide compounds