

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ АЛКІЛДИМЕТИЛБЕНЗИЛАМОНІЮ ХЛОРИДУ ТА ДИДЕЦИЛДИМЕТИЛАМОНІЮ ХЛОРИДУ У СКЛАДІ ДЕЗІНФЕКЦІЙНОГО ЗАСОБУ ПРОТИ ПАТОГЕНІВ БДЖІЛ *IN VITRO*

Галатюк О. Є., Романишина Т. О., Лахман А. Р., Бегас В. Л., Застулка М. В.
Поліський національний університет, Житомир, Україна, e-mail: tveterinar@gmail.com

Збільшення кількості інфекційних захворювань медоносних бджіл стимулює практиків, науковців, лікарів ветеринарної медицини до пошуку нових ефективних засобів, які можна буде використовувати для профілактики та лікування заразних хвороб бджіл. Випробування дезінфікуючих засобів *in vitro* дає можливість визначити доцільність подальшого використання препаратів у бджільництві. Мета даної роботи полягала у дослідженні антимікробної активності алкілдиметилбензиламонію хлориду та дидецилдиметиламонію хлориду у складі дезінфекційного засобу «Бровадез-плюс» щодо патогенних бактерій бджіл *in vitro*. Матеріалами для досліджень слугували ізольовані культури бактерій бджіл, які викликають диспептичні розлади та ураження розплоду. Для визначення антимікробної активності «Бровадез-плюс» використовували диско-дифузійний метод. Бактерицидний ефект «Бровадезу-плюс» зареєстровано при дії 1% та 1,5% концентрацій розчину на бактерії виду *Klebsiella pneumoniae* на 1 добу досліджень на рівні $8,2 \pm 0,42$ мм та $9,4 \pm 0,27$ мм, відповідно. Найбільший діаметр бактеріостатичного ефекту зареєстровано на першу і третю добу експерименту при 1,5% концентрації «Бровадез-плюс» ($24,2 \pm 0,22$ мм). При дії даного засобу щодо бактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* спостерігали пропорційно зростаючий бактеріостатичний ефект через 24 години при 0,05%–вій досліджуваній концентрації на рівні від $9,8 \pm 0,42$ мм до $22,2 \pm 0,42$ мм за застосування 1,5%–вої концентрації. Через 120 годин зареєстровано прояв бактерицидної дії «Бровадез-плюс» при контакті з даними досліджуваними патогенними ентеробактеріями. Встановлена бактеріостатична активність «Бровадез-плюс» щодо змішаної культури мікроорганізмів на 24 годину експерименту за концентрацій: 0,5% ($18,2 \pm 0,42$ мм); 1% ($19,2 \pm 0,42$ мм) та 1,5% ($21,6 \pm 0,45$ мм). Причому інгібування росту мікроорганізмів даної культури підвищувалося з часом при культивуванні у термостаті за температури 37,4 °С. Встановлено бактеріостатичний та бактерицидний ефекти, зумовлені комплексним механізмом дії «Бровадез-плюс» у концентраціях 0,05%, 0,1%, 0,25%, 0,5%, 1%, 1,5% на збудники ентеробактеріозів бджіл в лабораторних умовах (*in vitro*)

Ключові слова: дезінфекція, дезінфектант, алкілдиметилбензиламонію хлорид, дидецилдиметиламонію хлорид, *in vitro*, ентеробактеріози бджіл

Бджоли — запилювачі сільськогосподарських культур і дикорослих рослин, проте їх популяція зазнає значних втрат внаслідок впливу патогенних агентів, таких як пестициди, кліщі, бактерії, гриби та віруси [2, 8, 16, 18, 23]. Зростання кількості інфекційних захворювань серед медоносних бджіл сприяє пошуку ефективних, нових засобів, які можуть бути використані з лікувально-профілактичною метою. Зважаючи на зростаючий інтерес до екологічно безпечних методів контролю захворювань бджіл, дослідження антимікробної активності цих речовин *in vitro* не лише дає можливість оцінити їх ефективність, але й допомагає встановити оптимальні концентрації для безпечного використання у бджільництві [6, 8, 19]. Випробування дезінфікуючих засобів *in vitro* дає можливість об'єктивно оцінити їх ефективність та безпечність при подальшому використанні у бджільництві. Лабораторні дослідження дозволяють не лише перевірити активність дезінфектанту проти конкретних збудників інфекцій бджіл, але й визначити можливий вплив на самих комах, їх продукцію та навколишнє середовище [3, 5, 10]. Завдяки лабораторним експериментам можна визначити оптимальні концентрації та методи застосування дезінфектантів, що мінімізує ризик розвитку резистентності у патогенів та дозволяє уникнути негативних наслідків для здоров'я бджіл. Таким чином, лабораторні

випробування *in vitro* є обов'язковим етапом сертифікації та подальшого використання будь-якого біологічного препарату у бджільництві [6, 8, 10, 26].

Використання хімічних дезінфектантів для боротьби з патогенами бджіл набуває дедалі більшого значення [22, 26]. Алкілдиметилбензиламонію хлорид та дидецилдиметиламонію хлорид ефективні проти широкого спектра мікроорганізмів, однак їхня специфічна дія на патогени бджіл досі недостатньо вивчена [14, 21, 28]. Тому, дослідження впливу четвертинних амонієвих сполук у складі дезінфектанту важливе для розробки нових схем дезінфекції та профілактики хвороб бджіл з метою забезпечення стабільності екосистем та підвищення ефективності сільськогосподарського виробництва [17].

Мета роботи. Дослідити антимікробну активність алкілдиметилбензиламонію хлориду та дидецилдиметиламонію хлориду у складі дезінфекційного засобу «Бровадез-плюс» щодо патогенних бактерій бджіл *in vitro*.

Матеріали і методи. Для досліджень використовували змішану мікробну асоціацію, виділену від бджіл, які мали ознаки диспептичних розладів. Також використовували виділені нами ізольовані культури ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella pneumoniae* та *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. Лабораторні штами ентеробактерій (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*) остаточно ідентифіковані на базі Державної установи «Житомирський обласний лабораторний центр міністерства охорони здоров'я України». Досліджувані культури зберігаються за температури 5–7 °С на кафедрі мікробіології, фармакології та ветеринарної епідеміології факультету ветеринарної медицини Поліського університету. Методика вивчення дії дезінфектанту щодо патогенних ентеробактерій бджіл ґрунтувалася на використанні диско-дифузійного методу (експозиція просочення дисків становила 30 хв). «Бровадез-плюс» вивчали в таких водних концентраціях — 0,05 %; 0,1 %; 0,25 %; 0,5 %; 1 %; 1,5 %. Висіви досліджуваних тест-культур здійснювали на середовище АМХ (агар Мюллера-Хінтона). Для розведення використовували дистильовану воду [1]. Дослідження проводили у п'яти повторюваностях для кожної концентрації та культури. Облік результатів здійснювали на 24, 72 і 120 години експерименту. Обробку даних проводили з використанням програмного пакета *Statistica*.

Результати роботи. Для вивчення активності препарату проводили лабораторні дослідження на вже відомих збудниках, здатних спричиняти патології. Дезінфектант «Бровадез-плюс» представляє собою перспективний засіб, який у своєму складі містить такі активні компоненти як алкілдиметилбензиламонію хлорид (АДБАХ) та дидецилдиметиламонію хлорид (ДДАК). Дані речовини належать до класу четвертинних амонієвих сполук (ЧАС), які, згідно з дослідженнями вітчизняних та закордонних науковців, проявляють активний вплив на бактерії, віруси, гриби [13, 14, 25, 26]. Тому, нами проведені лабораторні експерименти щодо дії активних сполук «Бровадез-плюс» щодо бактерій, які викликають патологічні прояви у бджіл.

Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях активності препарату «Бровадез-плюс» на середовищі АМХ щодо культури ентеробактерій виду *Klebsiella pneumoniae* представлені на рисунку 1. Статистичні обрахунки результатів висівів представлені в таблиці 1.



Рис. 1. Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях активності «Бровадез-плюс» на культуру *Klebsiella pneumoniae* на середовищі АМХ: А — 1 доба експерименту; Б — 3 доба експерименту

Таблиця 1 — Особливості взаємодії «Бровадез-плюс» на середовищі АМХ на культуру *Klebsiella pneumoniae* (n=5)

Термін дослідження		Досліджувані концентрації					
		0,05 %	0,1 %	0,25 %	0,5 %	1 %	1,5 %
Зона взаємодії, мм (M ± m)	24 год	13,4 ± 0,27 БС	15,2 ± 0,42 БС	20,8 ± 0,55 БС	22,2 ± 0,42 БС	23,8 ± 0,42 БС; 8,2 ± 0,42 БЦ	24,4 ± 0,27 БС; 9,4 ± 0,27 БЦ
	72 год	13,2 ± 0,22 БС	16,4 ± 0,27 БС	21,8 ± 0,42 БС	21,8 ± 0,42 БС	23,6 ± 0,27 БС	24,2 ± 0,22 БС

Примітка: БС — бактеріостатична дія, мм; БЦ — бактерицидна дія, мм.

Згідно з таблицею 1, бактерицидний ефект зареєстровано при дії 1 % та 1,5 % розчину «Бровадезу-плюс» на бактерії виду *Klebsiella pneumoniae* на 1 добу досліджень на рівні 8,2 ± 0,42 мм та 9,4 ± 0,27 мм, відповідно (рис. 1–А). Зони просвітлення, але з бактеріостатичним ефектом, при концентраціях 0,5%–1,5 % в цей період обліку результатів достовірно не відрізнялись між собою (22,2 ± 0,42мм — 24,4 ± 0,27).

На 3 добу експерименту (72 год) реєстрували затримку росту мікроорганізмів після контактної взаємодії «Бровадез плюс» та бактеріальних клітин тест-культури *Klebsiella pneumoniae* на рівні 13,2 ± 0,22 мм (0,05 %) — 24,2 ± 0,22 мм (1,5 %) (рис. 2–Б). Найбільший діаметр бактеріостатичного ефекту зареєстровано на першу і на третю добу експерименту при концентрації «Бровадез-плюс» 1,5 % (24,2 ± 0,22 мм). На п'яту добу експерименту всі колонії в зоні пригнічення росту зазнали лізису, тобто бактеріостатичний ефект перейшов у бактерицидний, що можна пояснити тривалим контактом дезінфекційного засобу з мікробними клітинами.

Активні компоненти «Бровадез-плюс» мали вплив і на ізольовані культури клітин бактерій виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*. Так, згідно з таблицею 2, бактеріостатичний ефект даного дезінфектанту зареєстрований через 24 години при всіх досліджуваних концентраціях на рівні 9,8 ± 0,42 мм (0,05 %) — 22,2 ± 0,42 мм (1,5 %) (рис. 2–А).

Таблиця 2 — Особливості взаємодії «Бровадез-плюс» на середовищі АМХ на культуру *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* (n=5)

Термін дослідження		Досліджувані концентрації					
		0,05 %	0,1 %	0,25 %	0,5 %	1 %	1,5 %
Зона взаємодії, мм (M ± m)	24 год	9,8 ± 0,42	13,2 ± 0,42	17,8 ± 0,42	19,4 ± 0,27	21,6 ± 0,45	22,2 ± 0,42
	72 год	10,2 ± 0,42	13,4 ± 0,45	17,8 ± 0,42	19,6 ± 0,27	21,8 ± 0,42	22,6 ± 0,27

Примітка: БС — бактеріостатична дія, мм; БЦ — бактерицидна дія, мм.

Причому, на прозорих зонах лізису бактерій реєстрували поодинокі дрібні колонії мікроорганізмів виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* (рис. 3), що візуально проявляється ефектом «розплавлення» на п'яту добу експерименту.

Такий вплив засвідчує поступову бактерицидну дію «Бровадез-плюс» при контакті з досліджуваними патогенними ентеробактеріями бджіл не менше 120 годин.

На 3 добу досліджень (рис. 2–Б) не відмічали достовірної різниці між зонами затримки росту *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*, як при концентраціях 0,5 %; 1 %; 1,5 % — 19,6 ± 0,27 мм, 21,8 ± 0,42 мм, 22,6 ± 0,27 мм відповідно, так і в різні періоди обліку результатів – 1 і 3 доба (табл. 2).

Змішана культура, виділена від вуликів, де бджоли мали ознаки диспепсії, включає декілька груп бактерій різних видів. Дія дезінфектанту «Бровадез-плюс» зареєстрована на 24 годину експерименту (рис. 4–А), причому дана бактеріостатична активність «Бровадез-плюс» підвищувалася з часом і проявлялася інгібуванням росту колоній при культивуванні у термостаті за температури 37,4 °C (табл. 3).

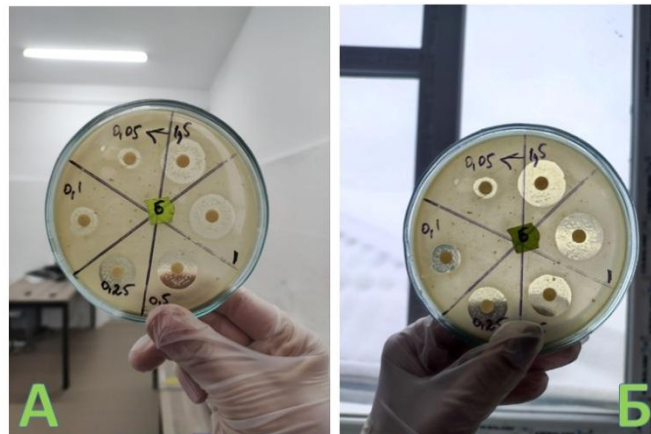


Рис. 2. Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях активності «Бровадез-плюс» на культуру *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* на середовищі АМХ: А — 1 доба експерименту; Б — 3 доба експерименту



Рис. 3. Поодинокі дрібні колонії мікроорганізмів виду *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* при дії «Бровадез-плюс»



Рис. 4. Візуальні зміни при бактеріологічних дослідженнях активності «Бровадез-плюс» щодо змішаної мікробної асоціації, виділеної при бджолиних дисбіозах на середовищі АМХ: А — 1 доба експерименту; Б — 3 доба експерименту

У свою чергу, найкращі прояви бактеріостатичної дії «Бровадез-плюс» щодо змішаної мікробної асоціації, виділеної при бджолиних дисбіозах, реєструвалася за концентрації 0,5 % ($18,2 \pm 0,42$); 1 % ($19,2 \pm 0,42$ мм) та 1,5 % ($21,6 \pm 0,45$ мм) через добу після початку експерименту, і достовірно не змінилися впродовж усього періоду досліджень.

Таблиця 3 — Особливості взаємодії «Бровадез-плюс» на середовищі АМХ щодо змішаної мікробної асоціації, виділеної при бджолиних дисбіозах (n=5)

Термін дослідження		Досліджувані концентрації					
		0,05 %	0,1 %	0,25 %	0,5 %	1 %	1,5 %
Зона взаємодії, мм (M ± m)	24 год	9,8 ± 0,22 БС	13,8 ± 0,22 БС	17,8 ± 0,42 БС	18,2 ± 0,42 БС	19,2 ± 0,42 БС	21,6 ± 0,45 БС
	72 год	10,4 ± 0,27 БС	14,2 ± 0,22 БС	17,6 ± 0,27 БС	18,4 ± 0,45 БС	19,6 ± 0,27 БС	21,8 ± 0,42 БС

Примітка: БС — бактериостатична дія, мм; БЦ — бактерицидна дія, мм.

Обговорення. Препарат «Бровадез-плюс» — дезінфікуючий засіб, де основними активними компонентами є четвертинні амонієві сполуки (ЧАС) [16, 28]. ЧАС є поверхнево активними речовинами, що обумовлює їх комплексний вплив на клітинні структури патогенних мікроорганізмів, причому, як грам-позитивних, так і грам-негативних [28]. Основні складові вищевказаного засобу мають механізми дії активного впливу на мікробні органели, що призводить до деструкції та лізису останніх [9, 11]. Наприклад, алкілдиметилбензиламонію хлорид (АДБАХ) має здатність руйнувати клітинні мембрани мікроорганізмів шляхом взаємодії з фосфоліпідами та білками бішару, що призводить до порушення цілісності мембрани, витоку внутрішньоклітинних компонентів: іони, нуклеотиди, амінокислоти. У свою чергу дестабілізується функціонування основних органел, таких як рибосоми та нуклеоїд, це порушує синтез білків та ДНК і у подальшому сприяє загибелі мікроорганізму [16, 21]. Окрім того, порушення цілісності мембрани викликає зниження рівня АТФ у клітини бактерії, що зупиняє основні метаболічні процеси [25]. Дія іншої складової «Бровадез-плюс» — дидецилдиметиламонію хлориду (ДДАК) на досліджувані культури має схожий до описаного механізму вплив. ДДАК також впливає на фосфоліпідний бішар клітинної мембрани бактерій, але дія щодо грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів має відмінності [12, 15, 24]. Наприклад, ентеробактерії бджіл виду *Klebsiella pneumoniae* окрім клітинної стінки, мають додатковий шар у вигляді мембрани з глікополісахаридів та капсулу як ознаку вірулентності. Сама капсула складається з білків, ліпідів, полісахаридів та води, що надає бактерії слизуватий вигляд при культивуванні їх на середовищах спеціального призначення [4, 7]. Тому, для дії дидецилдиметиламонію хлориду на даний вид бактерії необхідна триваліша експозиція (бактерицидний ефект проявився на 5 добу експерименту), ніж, наприклад, для грампозитивних бактерій, що містяться у змішаній культурі бактерій. Так, ДДАК впливає на грамнегативні ентеробактерії пошарово, порушуючи їх структури [14, 20, 28]. Спочатку дидецилдиметиламонію хлорид порушує цілісність слизової капсули у *Klebsiella pneumoniae*, ліпідний шар зовнішньої мембрани, інактивує ферменти периплазматичного простору, руйнує пептидоглікан клітинної стінки, збільшує проникність фосфоліпідного бішару плазматичної мембрани (порушення енергетичного метаболізму) [7]. Проникаючи до цитоплазми бактерії порушує синтез білків та ДНК (вплив на рибосоми, нуклеоїд). Тому, АДБАХ та ДДАК ефективні щодо усіх досліджуваних культур бактерій, але дія (бактерицидна) на грамнегативні бактерії може бути повільнішою через додатковий бар'єр у вигляді зовнішньої мембрани [12, 22, 24].

Висновки. 1. Бактеріологічні дослідження впливу «Бровадез-плюс» у концентраціях 0,05 %; 0,1 %; 0,25 %; 0,5 %; 1 %; 1,5 % на патогени бджіл у лабораторних умовах (*in vitro*) демонструють бактериостатичний і бактерицидний ефекти, що обумовлено комплексним механізмом дії компонентів цього дезінфікуючого засобу.

2. Найбільш активний прояв бактериостатичної дії «Бровадез-плюс» зареєстрований у концентраціях 0,5 %–1,5 % щодо всіх досліджуваних тест-культур на першу добу досліджень.

3. Рівень бактериостатичного ефекту «Бровадез-плюс» має прямо пропорційну тенденцію до збільшення вже на 24-ту годину культивування для всіх досліджуваних тест-культур із зонами затримки росту від 9,8 ± 0,42 мм (*Klebsiella (Enterobacter) aerogenes*) до 20,8 ± 0,55 мм (*Klebsiella pneumoniae*) при застосуванні концентрацій 0,05 %–0,25 %.

4. Встановлено бактериостатичний та бактерицидний ефекти, зумовлені комплексним механізмом дії «Бровадез-плюс» у концентраціях 0,5 %–1,5 % на збудники ентеробактеріозів бджіл в лабораторних умовах (*in vitro*), які свідчать про доцільність застосування даного препарату *in vitro* на пасіках України.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним напрямом є дослідження ефективності алкілдиметилбензиламонію хлориду та дидецилдиметиламонію хлориду в складі препарату «Бровадез-плюс» в умовах пасік для оцінки їхньої здатності перешкоджати поширенню інфекцій серед бджолиних колоній.

Конфлікт інтересів. Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

Подяка. Андрію Володимировичу Березовському та Сидельникову Андрію Олександровичу — керівникам ТОВ «БРОВАФАРМА» (м. Бровари, Україна) за представлення препарату «Бровадез-плюс».

Список літератури

1. Balázs V. L., Nagy-Radványi L., Filep R., Kerekes E., Kocsis B., Kocsis M., Farkas Á. In vitro antibacterial and antibiofilm activity of Hungarian honeys against respiratory tract bacteria. *Foods*. 2021. Vol. 10, No 7. P. 1632. URL: <https://doi.org/10.3390/foods10071632>.
2. Colla S. R., Otterstatter M. C., Gegeer R. J., & Thomson J. D. Plight of the bumble bee: pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological conservation*. 2006. Vol. 129, No 4. P. 461–467. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.11.013>
3. Cornman R. S., Tarpy D. R., Chen Y., Jeffreys L., Lopez D., Pettis J. S., Engelsdorp D., Evans J. D. Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7, No 8. e43562. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043562>
4. Devanga Ragupathi N. K., Muthuirulandi Sethuvel D. P., Triplicane Dwarakanathan H., Murugan D., Umashankar Y., Monk P. N., Karunakaran E., Veeraraghavan B. The influence of biofilms on carbapenem susceptibility and patient outcome in device-associated *K. pneumoniae* infections: insights into phenotype vs genome-wide analysis and correlation. *Frontiers in Microbiology*. 2020. Vol. 11. P. 591679. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.591679>.
5. Montagna M. T., Triggiano F., Barbuti G., Bartolomeo N., De Giglio O., Diella G., Lopuzzo M., Rutigliano S., Serio G., Caggiano G. Study on the In vitro Activity of Five Disinfectants Against Nosocomial Bacteria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019. Vol. 16(11). P. 1895. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph16111895>.
6. Ebrahimi M., Sadeghi A., Rahimi D., Purabdolah H., Shahryari S. Postbiotic and anti-aflatoxigenic capabilities of *Lactobacillus kunkeei* as the potential probiotic LAB isolated from the natural honey. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2023. Vol. 13. P. 343–355. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09697-w>
7. Evrard B., Balestrino D., Dosgilbert A., Bouya-Gachancard J. L., Charbonnel N., Forestier C., Tridon A. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 2010. Vol. 78(1). P. 210–219. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00864-09>.
8. Fuentes G., Iglesias A., Orallo D., Fangio F., Ramos F., Mitton G., Fuselli S., Matias M., Ramirez C. Antibacterial activity of cannabis (*Cannabis sativa* L.) female inflorescence and root extract against *Paenibacillus larvae*, causal agent of American foulbrood. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2023. Vol. 47. P. 102575. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102575>.
9. Guerin-Mechin L., Dubois-Brissonnet F., Heyd B., Leveau J. Y. Quaternary ammonium compound stresses induce specific variations in fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of food microbiology*. 2000. Vol. 55, No 1-3. P. 157–159. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00189-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00189-6)
10. Han A., Lee S. Y. An overview of various methods for in vitro biofilm formation: a review. *Food Sci Biotechnol*. 2023. Vol. 32. P. 1617–1629. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01425-8>.
11. Han Y., Zhou Z. C., Zhu L., Wei Y. Y., Feng W. Q., Xu L., Chen H. The impact and mechanism of quaternary ammonium compounds on the transmission of antibiotic resistance genes. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019. Vol. 26. P. 28352–28360. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05673-2>
12. Hegstad K., Langsrud S., Lunestad B. T., Schei A. A., Sunde, M., Yazdankhah S. P. Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? *Microbial drug resistance*. 2010. Vol. 16(2). P. 91–104. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0120>
13. Hrubec T. C., Seguin R. P., Xu L., Cortopassi G. A., Datta S., Hanlon, A. L., Lozano A. J., McDonald V. A., Healy C. A., Anderson T. C., Musse N. A., Williams, R. T. Altered toxicological endpoints in humans from common quaternary ammonium compound disinfectant exposure. *Toxicology reports*. 2021. Vol. 8. P. 646–656. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.03.006>
14. Jann J. Gascon S., Drevelle O., Fradette J., Auclair-Gilbert M., Soucy G., Fortier L.-C., Fauchoux N. Assessment of antibacterial properties and skin irritation potential of anodized aluminum impregnated with various quaternary ammonium. *Biomaterials Advances*. 2023. Vol. 150. P. 213433. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213433>.
15. Kwaśniewska D., Chen Y. L., & Wiczorek D. Biological activity of quaternary ammonium salts and their derivatives. *Pathogens*. 2020. Vol. 9, No 6. P. 459. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9060459>
16. Lakhman A., Galatiuk O., Romanishina T., Behas V., Zastulka O. Bees klebsiellosis: key aspects of pathogenesis. *Advances in Animal and Veterinary*. 2021. Vol. 9(8). P. 1190–1193. DOI: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.8.1190.1193>.
17. Luz A., DeLeo P., Pechacek N., Freemantle M. Human health hazard assessment of quaternary ammonium compounds: Didecyl dimethyl ammonium chloride and alkyl (C12–C16) dimethyl benzyl ammonium

- chloride. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2020. Vol. 116. P. 104717. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104717>.
18. McMenamin A. J., Flenniken M. L. Recently identified bee viruses and their impact on bee populations. *Current Opinion in Insect Science*. 2021. Vol. 44. P. 8–14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.009>.
 19. Prodělalová J., Malenovská H., Moutelíková R., Titěra D. Virucides in apiculture: persistence of surrogate enterovirus under simulated field conditions. *Pest Management Science*. 2017. Vol. 73 (12). P. 2544–2549. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4653>.
 20. Pedreira T. Vázquez J. A., García M. R. Kinetics of Bacterial Adaptation, Growth, and Death at Didecyl dimethylammonium Chloride sub-MIC Concentrations. *Frontiers in Microbiology*. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.758237>.
 21. Percival S. L., Finnegan S., Donelli G., Vuotto C., Rimmer S., & Lipsky B. A. Antiseptics for treating infected wounds: efficacy on biofilms and effect of pH. *Critical reviews in microbiology*. 2016. Vol. 42, No 2. P 293–309. DOI: <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.940495>
 22. Romanishina T. A., Lakhman A. R., Galatiuk O. Y., Behas V. L., Zastulka M. V. Study of disinfectant activity against bee pathogenic enterobacteria in vitro. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*. 2024. Vol. 7, No 1. P. 41–45. DOI: <https://doi.org/10.32718/ujvas7-1.07>.
 23. Steinhauer N., Kulhanek K., Antúnez K., Human H., Chantawannakul P., Chauzat M.-P., vanEngelsdorp D. Drivers of colony losses. *Current Opinion in Insect Science*. 2021. Vol. 46. P. 106–114. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.004>.
 24. Tezel U., Pavlostathis S. G. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current opinion in biotechnology*. 2015. Vol. 33. P. 296–304. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.018>.
 25. Wang S., Qiu B., Shi J., Wang M. Quaternary ammonium antimicrobial agents and their application in antifouling coatings: a review. *Journal of Coatings Technology and Research*. 2024. Vol. 21, No 1. P. 87–103. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11998-023-00825-z>
 26. Yang W., Cai C., Wang R., & Dai X. Insights into the impact of quaternary ammonium disinfectant on sewage sludge anaerobic digestion: Dose-response, performance variation, and potential mechanisms. *Journal of Hazardous Materials*. 2023. P. 444, 130341. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130341>
 27. Zhou Z., Zhou S., Zhang X., Zeng S., Xu Y., Nie W., Chen. P. Quaternary ammonium salts: insights into synthesis and new directions in antibacterial applications. *Bioconjugate Chemistry*. 2023. Vol. 34, No 2. P. 302-325. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00598>
 28. Бровафарма. Бровадез-плюс. Режим доступу: https://brovapharma.ua/brovadez-plyus_50-ml.

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ALKYL DIMETHYLBENZYLAMMONIUM CHLORIDE AND DIDECYL DIMETHYLAMMONIUM CHLORIDE IN DISINFECTANT COMPOSITION AGAINST BEE PATHOGENS *IN VITRO*

Galatiuk O. Ye., Romanishina T. O., Lakhman A. R., Behas V. L., Zastulka M. V.
Polissia National University, Zhytomyr, Ukraine

The rise in the prevalence of infectious diseases among honey bees has prompted practitioners, scientists, and veterinarians to seek out novel, efficacious products to prevent and treat contagious bee diseases. *In vitro* testing of disinfectants enables the determination of the viability of continued use of the products in beekeeping. The objective of this study was to investigate the antimicrobial activity of alkyl dimethylbenzylammonium chloride and didecyl dimethylammonium chloride, constituents of the disinfectant Brovadez-plus, against pathogenic bee bacteria *in vitro*. Isolated cultures of bee bacteria, which produce dyspeptic diseases in bees, served as research materials. To determine the antimicrobial activity of «Brovadez-plus» the disco diffusion method was applied. The bactericidal effect of «Brovadez-plus» was registered at the action of 1 % and 1.5% solution of disinfectant against bacteria of *Klebsiella pneumoniae* species on the 1st day of research at the zone level of growth inhibition 8.2 ± 0.42 mm and 9.4 ± 0.27 mm, respectively. The largest diameter of bacteriostatic effect was registered on the first and third days of the experiment at the concentration of «Brovadez-plus» 1.5 % (24.2 ± 0.22 mm). Under the action of this product against bacteria of *Klebsiella (Enterobacter) aerogenes* species was registered bacteriostatic effect after 24 hours at all tested concentrations at the zone level of growth inhibition of 9.8 ± 0.42 mm (0,05 %) — 22.2 ± 0.42 mm (1.5%). After 120 hours a gradual bactericidal effect of «Brovadez-plus» in contact with these investigated pathogenic enterobacteriaceae was registered. The bacteriostatic activity of «Brovadez-plus» on a mixed culture of microorganisms at 24 hours of the experiment at concentrations of 0.5% (18.2 ± 0.42); 1 % (19.2 ± 0.42 mm) and 1.5% (21.6 ± 0.45 mm) was registered. The inhibition of microbial growth in this culture increased with time when cultured in the thermostat at 37.4 °C. The bacteriostatic and bactericidal effects resulting from the complex mechanism of action of «Brovadez-plus» at concentrations of 0.05 %, 0.1 %, 0.25 %, 0.5 %, 1 %, 1.5 % on bee enterobacteriosis in the laboratory (*in vitro*) were investigated

Keywords: disinfection, disinfectant, alkyl dimethylbenzylammonium chloride, didecyl dimethylammonium chloride, *in vitro*, enterobacteriosis of bees