

VETERINARY SCIENCES

Дослідження антимікробної дії розчину міді і цитрату срібла за ентеробактеріозів бджіл

Т. О. Романишина, А. Р. Лахман, О. Є. Галатюк

Житомирський національний агроекологічний університет, м. Житомир, Україна
Corresponding author. E-mail: tveterinar@gmail.com

Paper received 01.04.20; Accepted for publication 18.04.20.

<https://doi.org/10.31174/SEND-NT2020-233VIII28-17>

Анотація. В статті наведено дослідження антимікробної дії розчину міді і цитрату срібла до патогенних ентеробактерій видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes*, які, в даний час, зумовлюють ентеробактеріози в бджіл. Показано, що розчин міді і цитрату срібла проявляв низьку антимікробну дію на грамнегативні патогенні мікроорганізми видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes*. Перспективним є удосконалення складу дезінфектанту, з метою підвищення активності та синергізму між складовими для посилення бактерицидного впливу на патогенні ентеробактерії бджіл.

Ключові слова: дисбактеріози бджіл, профілактика, дезінфекція, *Klebsiella Pneumoniae*, *Enterobacter Aerogenes*, диско-дифузійний метод.

Вступ. Стан здоров'я сільськогосподарських тварин, птиці та бджіл в Україні впливає на рентабельність тваринницьких підприємств. В останній час відбувається радикальне обмеження антибактеріальних препаратів у тваринницьких господарствах. Дезінфікуючі засоби являються альтернативою антибактеріальним препаратам [6]. На сьогоднішній день профілактика недооцінена, хоча вона є ключем до ефективної діяльності господарств. Правильне використання універсальних дезінфікуючих препаратів є головною частиною програми захисту тварин та людей [5]. Ринок препаратів для боротьби з ентеробактеріозами бджіл дуже вузький. Тому оцінка ефективності впровадження в роботу будь-яких препаратів для профілактики та оздоровлення бджіл є важливою сходинкою в організації оздоровчих та профілактичних заходів [4].

Ефективність лікування бактеріальних інфекцій у тварин та птиці визначається раціональністю та обгрунтованістю застосування антибіотиків, тоді як у галузі бджільництва використання антибіотиків заборонено через перехід їх у мед. Тому пошук та визначення чутливості бактерій до дії пробіотичних препаратів та дезінфікуючих засобів має важливе значення [9, 14].

Короткий огляд публікацій по темі. Згідно останніх праць вітчизняних та іноземних авторів, бактеріальні хвороби бджіл набирають все більшого поширення на пасіках України, деяких країн Європи та Америки [3,10], що завдає бджільництву значних економічних збитків. Актуальним питанням є вивчення особливостей санації організму бджіл за інфекційних захворювань. Тому удосконалення методів виділення, ідентифікації та культивування збудників ентеробактеріозів медоносних бджіл є найбільш важливою темою для вирощування здорових та сильних бджолиних сімей.

Аналізуючи дослідження вітчизняних та зарубіжних авторів, відмічено, що в кишечнику бджоли містяться представники не менше 10 родів бактерій, що належать до родин *Enterobacteriaceae* *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Escherichia*, *Pantoea*, *Morganella*, *Serratia* [7]. Попу-

шення мікробного пейзажу кишечника бджіл призводить до захворювання [3]. Перспективним є пошук органічних дезінфектантів для застосування у галузі бджільництва, що дає змогу виробляти органічну продукцію не лише в межах України, а і світу цілому.

Сполуки деяких металів, зокрема карбоксилати срібла і міді, отримані українськими та закордонними вченими, є одними з перспективних активних фармацевтичних інгредієнтів для створення нового класу антибактеріальних засобів в різних лікарських формах [1, 15]. Однією з головних фармакологічних властивостей таких препаратів є антимікробна дія, тому їх використовують переважно як антисептики [8]. Саме тому актуальною проблемою є вивчення вітчизняних антимікробних препаратів з цитратами металів з метою їх застосування у бджільництві.

Ціллю нашої роботи було визначення активності експериментального дезінфектанту (розчину цитрату міді і цитрату срібла), щодо культур ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes in vitro*.

Матеріали і методи. Для роботи були використані культури патогенних ентеробактерій бджіл видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes* отримані від хворих бджолиних сімей з пасік Північно-Західного регіону України. Виділення та ідентифікацію досліджуваних мікроорганізмів бджіл проводили на базі науково-дослідної лабораторії кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології факультету ветеринарної медицини Житомирського національного агро-екологічного університету (ЖНАЕУ) та Державної установи "Житомирський обласний лабораторний центр міністерства охорони здоров'я України" у 2018–2019 рр. Культури зберігаються у холодильнику за t 5–7 °C і пересівають методом штриха на скошений агар у пробірці з інтервалом в 30 діб на середовище МПА (м'ясо-пептонний агар).

Розчин цитрату міді і цитрату срібла був наданий нам ТОВ „СГП” МБС м. Києва. Дезінфектант застосовували в нативному стані і в таких концентраціях – 1:2, 1:5, 1:10, розведених на стерильному 0,9% NaCl. Дослідження проводилися диско-дифузійним методом.

Диски власноруч обробляли досліджуваним препаратом у вказаних концентраціях. Експозиція просочення дисків становила 20 хвилин. В чашку Петрі вносили по 1 мл бактеріального інокуляту та по 20 мл середовища АМХ (агар Мюллера-Хінтона), після чого круговими рухами розмішували вміст чашок до однорідності. На застигле середовище викладали диски, просочені дезінфектантом. Дослідження проводили на семи чашках Петрі для кожної культури, за якими спостерігали три доби.

Результати і обговорення. У профілактиці ентеробактеріозів бджіл важливе значення має попереднє визначення активності характеру дії нових препаратів *in vitro* перед апробацією на пасіках. При бактеріологічних дослідженнях активності зразка розчину цитрату міді і цитрату срібла на культури видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes* встановлена його бактеріостатична дія при нативному застосуванні, завдяки наявності генів, які кодують адгезини, і зумовлюють формування біоплівки на поверхні середовища [16]. Біоплівка меншої щільності у зонах пригнічення росту *Klebsiella Pneumoniae* діаметром $27,3 \pm 0,17$ мм (рис. 1а (в)). та *Enterobacter Aerogenes* – $19,6 \pm 0,13$ інтерпретує даний результат (рис. 1б (в)).

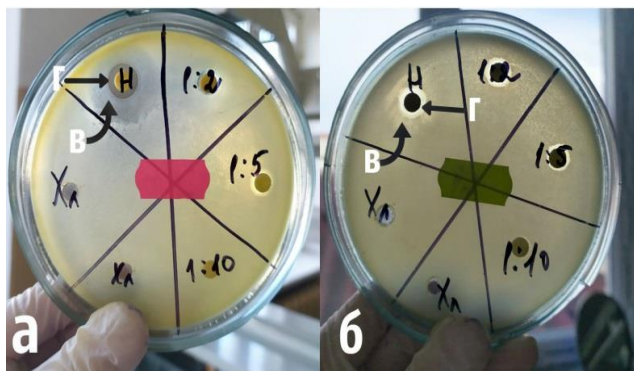


Рис. 1. Візуальні зміни на 1 добу при бактеріологічному дослідженні активності зразка розчину цитрату міді та цитрату срібла на культури *Klebsiella Pneumoniae* (а) та *Enterobacter Aerogenes* (б):
в – бактеріостатична дія, г – бактеріцидна дія

Найбільший діаметр зони просвітлення реєструється на біоплівці з культурами бактерій виду *Klebsiella Pneumoniae* при нативному застосуванні препарату ($14,14 \pm 0,35$ мм). При інших розведеннях дезінфектанту прояв бактеріцидної дії знаходився в межах від $9,85 \pm 0,45$ мм – при розведенні 1:5 до $11,14 \pm 0,45$ мм – при розведенні 1:2 (рис 1 (г)). Мікроорганізми виду *Enterobacter Aerogenes* були стійкішими до дезінфектанту при всіх застосованих розведеннях, що пояснюємо наявністю у них генів асоціації віруленгенами, генів мультирезистентності до лікарських засобів і ймовірно до дезінфектантів (гени лактамази) [12] та високими адаптаційними властивостями (табл. 1).

На відміну від мікроорганізмів виду *Enterobacter Aerogenes*, ентеробактерії виду *Klebsiella Pneumoniae*

містять специфічні детермінанти вірулентності – капсульні гени асоційовані з мукополісахаридами (HMV-гіпермуковіскозний фенотип), які здатні поглинати позитивно заряджені іони Ag^+ і Cu^+ . У даному випадку слизова капсула ентеробактерії виду *Klebsiella Pneumoniae* слугує не так захисною оболонкою, як одним із факторів «притягування» катіонів металів аніонними залишками сіалової кислоти. Проникаючи в клітину, зразок цитрату міді та срібла порушує структуру ДНК мікробної клітини [11], що зумовлює її лізис.

Табл. 1. Зони пригнічення росту культур видів *Klebsiella Pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes* зразка розчину цитрату міді та цитрату срібла на середовищі АМХ (n=7)

	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>				<i>Enterobacter Aerogenes</i>			
	Нативний	1:2	1:5	1:10	Нативний	1:2	1:5	1:10
Зона затримки росту, мм, M±m	14,14±0,35	11,14±0,45	9,85±0,45	-	11,14±0,35	10,14±0,45	9,29±0,24	-

Фармакологічні властивості препаратів срібла визначаються специфічною біологічною активністю іонів Ag^+ , які утворюються при дисоціації його з'єднань [13]. Мідь бере участь у перебігу багатьох важливих метаболічних процесів, а також надає значну бактеріостатичну і бактеріцидну дію завдяки пошкодженню плазматичних мембран, нуклеїнових кислот і деструкції сульфгідрильних груп білків [2]. Крім того, доцільно звернути увагу, що активність суміші сполук срібла і міді залежить від їх отримання, розміру часток і концентрації їх в розчині, також слід з'ясувати фактори, від яких залежить сила протимікробної дії даних сполук.

Висновки.

1. Досліджуваний розчин цитрату срібла і міді у ролі дезінфектанту в різних концентраціях виявляють низьку антимікробну дію на грамнегативні мікроорганізми видів *Klebsiella pneumoniae* та *Enterobacter Aerogenes*.

2. Перспективним є удосконалення складу дезінфектанту, а саме, активність та синергізм між складовими, що посилює бактеріцидний вплив на патогенні ентеробактерії бджіл.

3. Проблему профілактики та лікування ентеробактеріозів бджіл частково можливо вирішити завдяки застосуванню препаратів, до складу яких входять срібло та мідь, так як вони, на відміну від антибіотиків, не викликають селекцію резистентних штамів мікроорганізмів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Арсентьева И. П. Атгестация и применение наночастиц металлов в качестве биологически активных препаратов / Арсентьева И. П., Зотова Е. С., Фолманис Г. Э // Нанотехника.

Спец. выпуск «Нанотехнологии-медицине». – 2007. – № 2 (10). – С. 72–77.

2. Богословская О. А. Влияние наночастиц меди и железа на рост микробных клеток / Богословская О. А., Астротина А.

Б., Байтукалов Т. А. // Новая технологическая платформа биомедицинских исследований : мат. научно-практ. конф. – Ростов-на-Дону, 2006. – С. 72–73.

3. Галатюк О. Е. Епізоотологічний моніторинг заразних хвороб медоносних бджіл у північно-західному регіоні України / Галатюк О. Е., Тушак С. Ф. // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. – 2016. – С. 372-379.

4. Зинченко Е. В. Иммунобиотики в ветеринарной практике / Е. В. Зинченко, А. Н. Панин. – Пушино, 2000. – 161 с.

5. Ощепков, В. Г. Дезинфекционная активность новых препаратов / В. Г. Ощепков, В.Н. Аржаков // Ветеринария. – 2001. – № 4. – С. 44–45.

6. Розробка і контроль дезінфікуючого засобу : монографія / за ред. В.Л. Коваленка, Д.А. Засєкіна. – К. : Вид-во ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2013. – 240 с.

7. Чечёткина У. Е. Энтеробактерии в составе микрофлоры пищеварительной системы медоносных пчёл в различные сезоны года / Евтеева, Н. И., Речкин, А. И., & Радаев, А. А. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород. - 2011. – 2 – С. 2

8. Шульгина, Т. А. Изучение антибактериальной активности водных дисперсий наночастиц серебра и меди / Шульгина, Т. А., Норкин, И. А., Пучиньян, Д. М. // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – XIX (4). – С. 131–132.

9. Boothe, D. M. (2006). Principles of antimicrobial therapy. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 36(5), 1003-1047.

10. Glenn, W., Cavigli, I., Daughenbaugh, K. F., Radford, R., Kegley, S. E., & Flenniken, M. L. (2017). Honey bee (*Apis*

mellifera) colony health and pathogen composition in migratory beekeeping operations involved in California almond pollination. *PLoS one*, 12(8). doi.org/10.1371/journal.pone.0182814

11. Luna, V. A., Hall, T. J., King, D. S., & Cannons, A. C. (2010). Susceptibility of 169 USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates to two copper-based biocides, CuAL42 and CuWB50. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(5), 939-941.

12. Santo Pereira, R., Dias, V. C., Ferreira-Machado, A. B., Resende, J. A., Bastos, A. N., Bastos, L. Q., & Diniz, C. G. (2016). Physiological and molecular characteristics of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(06): 592-599. doi:10.3855/jidc.6821

13. Sibbald, R. G., Browne, A. C., Coutts, P., & Queen, D. (2001). Screening evaluation of an ionized nanocrystalline silver dressing in chronic wound care. *Ostomy/wound management*, 47(10), 38-43.

14. The pathogenic bee enterobacteria resistance to the experimental iodine-containing disinfectant «Jodis Des No 2» / O. Galatyuk, T. Romanyshyna, A. Lakhman, O. Lysenko, V. Shimanska // *Scientific Horizons*. – 2020. – № 1(86). – С. 71–78. doi: 10.33249/2663-2144-2020-86-1-71-78

15. Thomas, S., & McCubbin, P. (2003). A comparison of the antimicrobial effects of four silver-containing dressings on three organisms. *Journal of wound care*, 12(3), 101-107.

16. Traynor, K. S., Rennich, K., Forsgren, E., Rose, R., Pettis, J., Kunkel, G., Madella, S., Evans, J., Lopez, D. & Engelsdorp, D. (2016). Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees.

REFERENCES

1. Arsenteva, I. P., Zotova, E. S., Folmanis, G. E. (2007) Attestation and application of metal nanoparticles as biologically active preparations. *Nanotechnology. Special issue of "Nanotechnology Medical"*, 2 (10), 72-77.

2. Bogoslovskaya, O. A., Astrotina, A. B., Baytukalov, T. A. (2006) Influence of copper and iron nanoparticles on microbial cell growth. *New Technological Platform for Biomedical Research : mat of Science Conf. : Rostov-na-Donu*, 72-73.

3. Galatiuk, O. E. & Tushak, S. F. (2016). Epizootological monitoring of infectious diseases of honey bees in the north-western region of Ukraine. *Scientific Bulletin of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine*, (237), 372-379.

4. Zinchenko, E. V., Panin, A. N. (2000) Immunobiotics in veterinary practice : Puschino, 161.

5. Oschepkov, V. G., Arzhakov, V. N. (2001) Disinfection activity of new drugs. *Veterinariya* : 4, 44-45.

6. Design and control of disinfectant: monograph / ed. Kovalenka, V. L., Zasiakina, D. A. (2013) K. : «Interservis», 240.

7. Chechotkina, U. E., Evteeva, N. I., Rechkin, A. I. & Radaev, A. A. (2011) Enterobacterium as part of the microflora of the digestive system of honey bees in different seasons. *N.I. Lobachevsky Bulletin of Nizhny Novgorod University: (2-2)*, 149-153.

8. Shulgina, T. A., Norkin, I. A., Puchinyan, D. M. (2012). Study of antibacterial activity of aqueous dispersions of silver and copper nanoparticles. *A bulletin of new medical technology: XIX (4)*. 131-132.

Investigation of antimicrobial action of copper citrate and silver citrate solution at enterobacteriosis in bees

T. O. Romanishina, A. R. Lakhman, O. Ye. Galatyuk

Abstract. The article presents a study of antimicrobial action of copper citrate and silver citrate solution on pathogenic enterobacteria of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* species, which currently cause enterobacteriosis in bees. The solution of copper citrate and silver citrate has been shown to have a low antimicrobial effect on Gram-negative pathogens of the species *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. It is promising to improve the disinfectant composition in order to increase activity and synergy between the components to enhance the bactericidal effect on pathogenic enterobacteria of bees.

Keywords: bee dysbacterioses, prevention, disinfection, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, disco-diffusion method.