

NOWE PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA NANOSREBRA W ZWALCZANIU BAKTERII *PAENIBACILLUS LARVAE*

Marcin Raczyński¹, Małgorzata Błażejowska², Anna Gajda³, Grzegorz Woźniakowski⁴, Artur Arszułowicz⁵

¹ VET-ANIMAL sp. z o.o. w Starogardzie Gdańskim

² Zakład Higieny Weterynaryjnej w Katowicach

³ Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

⁴ Katedra Chorób Zakaźnych, Inwazyjnych i Administracji Weterynaryjnej Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

⁵ Centrum Zdrowia Pszczół w Łomży

Jednym z największych wyzwań, jakie stawiane są przed nami w zakresie ochrony zdrowia zwierząt oraz szeroko rozumianego zdrowia publicznego, jest zapewnienie skutecznego działania dotyczącego ograniczenia szerzenia się chorób zakaźnych oraz szybkiego zwalczania w przypadku ich pojawienia się w populacji zwierząt. Biorąc pod uwagę często mieszaną etiologię zakażeń, jak również dynamicznie narastającą oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz bezpośrednie związane z tym zjawiskiem znaczące ograniczenie skuteczności ich działania, zadanie to wydaje się stanowić poważne wyzwanie na najbliższe lata. Problem ten został dostrzeżony wiele lat wcześniej, czego skutkiem było opracowanie przez Parlament Europejski Rozporządzeń i Rezolucji, których celem jest ograniczenie zużycia środków przeciwdrobnoustrojowych w krajach UE (1, 2, 3, 4).

Parlament oraz Komisja Europejska przy współpracy z państwami UE podjęły walkę z narastającym kryzysem oporności na antybiotyki przyjmując zasadę

„Jedno zdrowie” (One Health). Zasada ta opiera się na zależności pomiędzy zdrowiem zwierząt, zdrowiem ludzi oraz stanem środowiska, w którym żyją. Jednak pomimo podjęcia wielu działań Raport Europejskiej Agencji Leków (dokument EMA/58183/2021) informuje, iż w 31 krajach Europy sprzedano w 2021 r. prawie 5220 ton przeciwbakteryjnych substancji czynnych. To w znaczący sposób przyczynia się do narastania wielolekooporności drobnoustrojów na stosowane chemioterapeutyki. Polska wciąż jeszcze należy do krajów o bardzo wysokim zużyciu antybiotyków. W 2020 roku sprzedano u nas 853,7 tony antybiotyków. Obecna sytuacja zmusza więc do szukania nowych alternatywnych rozwiązań, które mogą skutecznie zastąpić środki przeciwdrobnoustrojowe, nie wywołując przy tym narastającej oporności. W tym aspekcie obiecującym wydaje się być zastosowanie nanotechnologii. Pojęcie to odnosi się do materiałów, których wielkość zamyka się w przedziale 1 do 100 nm. Jeden nanometr równa się jednej miliardowej metra, co można porównać do dłu-

gości pięciu sąsiadujących ze sobą atomów w przeciętnym ciele stałym. Wiadomo już, że wraz z redukcją rozmiarów cząsteczek nanosrebra zwiększa się ich kompatybilność. Początki tej technologii, wbrew powszechnym opiniom, sięgają 1959 roku, kiedy to prof. Richard Feynman na Konferencji Amerykańskiego Towarzystwa Fizycznego wygłosił pierwszy wykład na ten temat. Podczas I wojny światowej związki srebra stosowane były w celu ograniczenia liczby zakażeń. Po pewnym czasie zaczęły być wypierane przez antybiotyki.

W czasie ostatnich kilkunastu lat nanomateriały zrewolucjonizowały medycynę, farmację, a nawet rolnictwo (np. jako składnik pestycydów). Tak szerokie zastosowanie możliwe jest dzięki wyjątkowym cechom nanocząsteczek, takim jak wysoki współczynnik powierzchni do objętości, właściwości chemiczne, optyczne i mechaniczne. Na szczególną uwagę zasługują tutaj nanocząsteczki metali, głównie srebra (AgNPs, ang. Ag nanoparticles). Zawierają one od 20 do 15 000 atomów srebra w cząsteczce. Do ich niewątpliwych

zalet należą: wysoka przewodność elektryczna i cieplna, stabilność chemiczna, nieliniowość optyczna, wysoki współczynnik powierzchni do objętości. Dzięki bardzo dobremu kontaktowi z mikroorganizmami oraz wykazanemu działaniu antybakteryjnemu nanocząsteczki srebra są z powodzeniem wykorzystywane w preparatach antyseptycznych wykazując właściwości biologiczne już w bardzo małych stężeniach. Ponadto wykazano również ich właściwości przeciwzapalne, przeciwwirusowe oraz przeciwgrzybicze. Mechanizm działania opiera się głównie na tworzeniu połączeń z grupami tiolowymi (-SH) białek mikroorganizmów. Takie połączenie powoduje ich dezaktywację. Obecnie jest to główny proces związany z inaktywacją protein. Inne mechanizmy działania to (5):

- niszczenie błony komórkowej bakterii,
- tworzenie reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), prowadzące do stresu oksydacyjnego,
- uszkodzanie DNA wskutek oddziaływań z resztami fosforanowymi w szkieletie fosfocukrowym,

– wpływ na procesy replikacji i transkrypcji, a w wyższych stężeniach degradacja DNA i RNA.

- upośledzenie funkcjonowania łańcucha oddechowego, podziałów komórkowych, systemów przekazywania sygnałów i funkcji licznych enzymów, zwłaszcza tych bogatych w aminokwasy zawierających siarkę,
- zaburzenie produkcji trifosforanu adenozynowego (ATP),
- zwiększenie podatność białek na denaturację,
- jony oddziałują z cytochromami, hamując transport elektronów oraz zaburzają funkcjonowanie łańcucha oddechowego,
- wiążąc się z kwasami nukleinowymi, skutecznie podnoszą efektywność działania obecnych na rynku chemioterapeutyków.

W licznych badaniach udowodniono, że nanocząsteczki srebra z powodzeniem niszczą drobnoustroje takie jak *Staphylococcus aureus*, *Chlamydia trachomatis*, *Providencia stuarti*, *Vibrio vulnificus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus paratyphi* (6).

New perspectives on the use of nanosilver in the control of *Paenibacillus larvae*

The aim of this text is to present the problem of increasing bacterial resistance to antibiotics, particularly in the context of animal and human health, and to propose nanotechnology, specifically silver nanoparticles, as an alternative solution. The authors describe the mechanisms of action of nanosilver against microorganisms, highlighting its antibacterial, antiviral, and antifungal properties. Particular attention is paid to the use of nanosilver in combating American foulbrood, a serious bee disease, emphasizing its effectiveness in eliminating *Paenibacillus larvae* and its spores, as confirmed by laboratory studies.

Keywords: antibiotic resistance, nanotechnology, silver nanoparticles, American foulbrood, *Paenibacillus larvae*.

Warstwa nanosrebra naniesiona na tworzywa sztuczne (np. rurki cewnikowe) dezaktywuje bakterie i działa odkażająco. Co istotne, efekt ten utrzymuje się do 72 godzin (7).

Zgnilec amerykański

Zgnilec amerykański (American foulbrood – AFB) stanowi niezwykle aktualny problem, który jest znany pszczelarzom od dziesiątków lat. Jest to bakteryjna, zakaźna oraz wysoce zjadliwa choroba stadium larwalnego gatunków z rodzaju *Apis* w tym również pszczoły miodnej *Apis mellifera*. Obecnie w Polsce, zgodnie z Ustawą z dnia 11 marca 2004 roku o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. z 2017 r. poz. 1855, z 2018 r. poz. 50,650) jest to jedyna choroba pszczół podlegająca obowiązkowi zwalczania.

Czynnikiem chorobotwórczym jest bakteria *Paenibacillus larvae*, Gram-dodatnia prosta lub lekko zakrzywiona laseczka o zaokrąglonych końcach. Obecnie znanych jest pięć jej genotypów (ERIC I – ERIC V). Każdy z tych genotypów jest chorobotwórczy i może powodować objawy zgnila amerykańskiego. Różnice w budowie genetycznej przekładają się na różnice dotyczące np. odmienności wyglądu kolonii bakteryjnych, właściwości biochemicznych czy wrażliwości na temperaturę. Cechy te służą mogą identyfikacji bakterii jedynie w warunkach laboratoryjnych do celów diagnostycznych oraz naukowych.

Szczególną cechą, która jest niezwykle istotna w epidemiologii zgnila amerykańskiego i która stanowi problem z jego zwalczaniem, jest zdolność bakterii do wytwarzania form przetrwalnikowych. Wytwarzane spory są niezwykle odporne, trudno je zniszczyć i wyeliminować. Pozostawione w środowisku nie tracą zakaźności nawet przez 10 lat, a niektóre doniesienia mówią, że nawet po 35 latach mogą spowodować zakażenie larw (8).

Spory są odporne na działanie bardzo wysokich oraz bardzo niskich temperatur, np. około 10 % spor przeżywa ponad 50-godzinne oddziaływanie temperatury 108°C. Aby inaktywować spory obecne w wosku pszczelim należy podgrzewać go do temperatury 130°C przez kilka godzin. Temperatura 121°C skuteczna jest dopiero po 20-30 minutach. Mrożenie (nawet do -196°C), gotowanie, promieniowanie UV, 0,5 % kwas siarkowy oraz dezynfekcja alkoholem nie niszczy spor (8).

Wytwarzane spory są przyczyną zakażeń czerwii pszczelego. Szczególnie wrażliwe na zakażenie są młode larwy do trzeciego dnia życia. Po tym czasie podatność na zakażenie spada wraz z upływem czasu. Larwy, które nie uległy zakażeniu do 52 godzin, stają się zupełnie odporne. Dorosłe owady nie są wrażliwe na zakażenie, jednak pracując przy usuwaniu z komórek zmarłego czerwii, stają się wektorem przenoszącym bakterie na zdrowe larwy oraz zapasy pokarmu.

Walka ze zgnilem amerykańskim, ze względu na jego specyficzny charakter, jest bardzo trudna. Obecnie, zgodnie z obowiązującym prawem (9) w przypadku, gdy w badaniu laboratoryjnym materiału innego niż zmieniony chorobowo czerw, potwierdzona zostaje obecność przetrwalników w pasiece, Powiatowy Lekarz Weterynarii (PLW) dokonuje przeglądu rodzin pszczelich. Jeśli nie stwierdza objawów choroby, jego zadanie ogranicza się do pouczenia pszczelarza, jakie ten musi podjąć działania, aby zminimalizować możliwość rozwoju choroby w pasiece.

W przypadku wystąpienia objawów choroby (podejrzenie) pobierany jest materiał do badań (próbka czerwii). Wynik dodatni takiego badania jest podstawą do dalszego postępowania. Wyznaczone zostaje ognisko choroby oraz obszar zapowietrzony o promieniu nie mniejszym niż 6 kilometrów. Następnie Powiatowy Lekarz Weterynarii może:

1. Nakazać spalenie chorego pnia.
2. Nakazać spalenie chorej rodziny oraz gniazda.

Ponadto w pasiece należy przeprowadzić oczyszczenie i odkażanie (10). Po upływie minimum sześciu tygodni PLW może nakazać ponowne badanie kliniczne i laboratoryjne rodzin pszczelich w obrębie ogniska choroby. Na podstawie wyników tych badań może uznać ognisko za wygasłe. W latach 2009-2013 w Zakładzie Chorób Pszczół PIWet-PIB realizowano badania monitoringowe, których celem było pozyskanie danych na temat sytuacji epizootycznej zgnila amerykańskiego w krajowych pasiekach, poprzez ocenę występowania i rozprzestrzenienia bakterii *P. larvae* w rodzinach pszczelich oraz określenie poziomu ich zakażenia, w oparciu o badanie próbek miodu pobieranych z rodzin. Badaniami objęto obszar całej Polski. Ogółem pobrano próbki z 4090 pasiek, w których stacjonowało 125.750 (sto dwadzieścia pięć tysięcy siedemset pięćdziesiąt) rodzin pszczelich. Udział pasiek, w których stwierdzono zakażone rodziny, był znacz-

ny – wyniósł aż 38 %. Wyniki pięcioletnich badań wykazały szerokie rozprzestrzenienie bakterii *P. larvae* w pasiekach na terenie wszystkich regionów objętych badaniami.

Materiały i metody

Produkt SILVECO+ Pszczoła® posiada skład (składniki o natychmiastowym, ale krótkim działaniu – nadtlenek oraz długotrwałym działaniu w kierunku bakterii dodatknych oraz prawdopodobnie sporobójczym działaniu, które według ogólnej wiedzy mogłyby się sprawdzić w eliminacji tego problemu. W celu oceny skuteczności preparatu zawierającego nanocząstki srebra przeprowadzono szereg badań, oceniając działanie preparatu SILVECO+ Pszczoła® na bakterie *Paenibacillus larvae* oraz ich przetrwalniki.

Przed wykonaniem doświadczenia przygotowano z preparatu macierzystego dwa stężenia: 5 % oraz 20 %. Używając obu rozcieńczeń niezależnie przeprowadzono równoległe badania.

Doświadczenie wstępne – weryfikacyjne w laboratorium higieny weterynaryjnej

Kolonie bakteryjne podzielono na dwie grupy. Grupę pierwszą stanowiła czysta hodowla bakterii *Paenibacillus larvae*, drobnoustroje te nie wykazywały tendencji do tworzenia przetrwalników. Drugą grupę stanowiła czysta hodowla bakterii *Paenibacillus larvae*, które podczas inkubacji przekształciły się w przetrwalniki. Procedura dotycząca hodowli na pożywkach (posiew kolonii, czas i temperatura inkubacji, użyte podłoża itd.) prowadzona była zgodnie z Instrukcją Głównego Lekarza Weterynarii nr GIWpr 02010-23/2016 z dnia 16 sierpnia 2016 roku (Obecność *Paenibacillus larvae* metoda hodowlana z potwierdzeniem biochemicznym i mikroskopowym).

Z każdej grupy pobrano po 5 jtk (jednostek tworzących kolonie), zawieszono w dwóch probówkach, z których każda zawierała 10 ml jałowego płynu fizjologicznego.

Jako kontroli użyto płytek z pożywką MYPGP. Na dwie płytki z tą pożywką posiano zawiesinę bakterii czą o objętości 10 mikrolitrów, analogicznie dokonano posiewu zawiesiny przetrwalników.

Płytki inkubowano zgodnie z Instrukcją Głównego Lekarza Weterynarii nr GIWpr 02010-23/2016 z dnia 16 sierpnia 2016 roku. Następnie na

4 płytki z podłożem MYPGP naniesiono po 1 mililitrze badanego preparatu 5 %. Analogicznie przygotowano 4 płytki z preparatem 20 %. Na tak przygotowane podłoże posiano zawiesinę bakterii o objętości 10 mikrolitrów, analogicznie dokonano posiewu zawiesiny przetrwalników. Płytki inkubowano zgodnie z Instrukcją Głównego Lekarza Weterynarii nr GIWpr 02010-23/2016 z dnia 16 sierpnia 2016 roku. Po inkubacji dokonano odczytów wszystkich płytek.

Badanie skuteczności preparatu z cząstkami nanosrebra wobec przetrwalników *Paenibacillus larvae*

Do przeprowadzenia doświadczenia numer 2 użyto gotowych zawiesin bakterii w 10 ml płynu fizjologicznego. Jedną próbkę zawierała zawiesinę bakterii *Paenibacillus larvae*, druga zawiesinę ich przetrwalników. Następnie w dwóch jałowych próbkach umieszczono przygotowany materiał. W jednej próbce 4 ml zawiesiny bakterii w drugiej 4 ml zawiesiny przetrwalników. Do każdej próbki dodano po 0,5 ml preparatu SILVECO+ Pszczoła®. Do jednej próbki dodano preparat w stężeniu 5 %, do drugiej w stężeniu 20 %. Tak przygotowane zawiesiny posiano na płytki o objętości 10 mikrolitrów.

Przygotowano również dwie płytki kontrolne z posianymi bakteriami *Paenibacillus larvae*. W każdym przypadku użyto płytek z pożywką MYPGP.

Wyniki badań

Preparat w stężeniu 5 %:

- preparat dodany na powierzchnię podłoża hodowanego w ilości 1 ml powoduje całkowite zahamowanie wzrostu żywych bakterii *Paenibacillus larvae*,
- preparat dodany na powierzchnię podłoża hodowanego w ilości 1 ml powoduje częściowe zahamowanie kiełkowania przetrwalników *Paenibacillus larvae*,
- preparat dodany w ilości 0,5 ml do 4 ml zawiesiny żywych bakterii *Paenibacillus larvae* powoduje całkowite zahamowanie ich wzrostu,
- preparat dodany w ilości 0,5 ml do 4 ml zawiesiny przetrwalników *Paenibacillus larvae* nie hamuje ich kiełkowania.

Preparat w stężeniu 20 %:

- preparat dodany na powierzchnię podłoża hodowanego w ilości 1 ml powoduje całkowite zahamowanie wzrostu żywych bakterii *Paenibacillus larvae*,

- preparat dodany na powierzchnię podłoża hodowanego w ilości 1 ml powoduje całkowite zahamowanie kiełkowania przetrwalników *Paenibacillus larvae*,
- preparat dodany w ilości 0,5 ml do 4 ml zawiesiny żywych bakterii *Paenibacillus larvae* powoduje całkowite zahamowanie ich wzrostu,
- preparat dodany w ilości 0,5 ml do 4 ml zawiesiny przetrwalników *Paenibacillus larvae* nie hamuje ich kiełkowania.

Wnioski z doświadczenia

Badany produkt SILVECO+ Pszczoła® w stężeniu 5 % w warunkach *in vitro* dodany do podłoża w określonej ilości 1 ml powoduje zahamowanie wzrostu żywych bakterii, a częściowo hamuje kiełkowanie przetrwalników. Ten sam preparat dodany w ilości 0,5 ml do 4 ml zawiesiny drobnoustrojów i posiany powoduje zahamowanie wzrostu żywych bakterii, natomiast nie hamuje w ogóle kiełkowania przetrwalników. Stężenie 20 % preparatu w warunkach *in vitro* jest bardziej skuteczne, ponieważ dodany do podłoża w objętości 1 ml powoduje zahamowanie wzrostu zarówno żywych bakterii, jak i całkowicie hamuje kiełkowanie przetrwalników. Ten sam preparat dodany w ilości 0,5 ml do 4 ml zawiesiny drobnoustrojów i posiany powoduje zahamowanie wzrostu żywych bakterii, natomiast nie hamuje w ogóle kiełkowania przetrwalników.

To proste doświadczenie pokazuje, że istnieją realne alternatywy dla stosowanych antybiotyków. Jest to jednak dopiero początek drogi, ponieważ na pewno potrzebne są dalsze badania, zarówno w kwestii optymalizacji stężeń i ilości preparatu oddziałującego na formy przetrwalnikowe *Paenibacillus larvae* w warunkach *in vitro*, jak i zastanowienia się, jak wyniki uzyskane w laboratorium przenieść na żywy organizm, jakim niewątpliwie jest rodzina pszczela.

Doświadczenia zmierzające w kierunku biobójczości wobec innych czynników zakaźnych

W dalszych badaniach uzupełniających zgodnych z normą PN-EN 16437 +A1:2020-03 wykazano skuteczność preparatu SILVECO+ Pszczoła® w stężeniu 20 % i czasie kontaktu 30 min. wobec *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterococcus hirae*. Badania według normy PN-EN 13704:2018-09 pt. „Chemiczne środki dezynfekcyjne – Ilościowa

zawiesinowa metoda określania działania sporobójczego chemicznych środków dezynfekcyjnych stosowanych w sektorze żywnościowym, warunkach przemysłowych i domowych oraz zakładach użyteczności publicznej – Metoda badania i wymagania (faza 2, etap 1)” wykazały skuteczność preparatu SILVECO+ Pszczoła® w stężeniu 25 % wobec *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* oraz *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae* w czasie kontaktu 60 minut i przy temperaturze 10°C. Reasumując przeprowadzone badania należy podkreślić wysoką skuteczność biobójczą preparatu SILVECO+ Pszczoła® wobec drobnoustrojów stanowiących najczęstsze problemy w apikulturze. Zwalczanie AFB jest procedurą niezwykle żmudną i kłopotliwą, wobec czego wprowadzenie nowych środków dezynfekcyjnych w dużym stopniu ułatwiłoby dotychczasowe procedury. ●

Piśmiennictwo

1. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie weterynaryjnych produktów leczniczych i uchylające dyrektywę 2001/82/WE (Tekst mający znaczenie dla EOG) (Dz. U. UE. L 4 z 7.1.2019, s. 43).
2. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1831/2003 z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
3. Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego (Dz. U. L 139 z 30.4.2004, s. 19).
4. Rozporządzenie (WE) nr 726/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 31 marca 2004 r. ustanawiające wspólnotowe procedury wydawania pozwoleń dla produktów leczniczych stosowanych u ludzi i do celów weterynaryjnych i nadzoru nad nimi oraz ustanawiające Europejską Agencję Leków (Dz. U. UE. L 136 z 30.4.2004, str. 1), Rezolucja Parlamentu Europejskiego z dnia 13 września 2018 r. w sprawie europejskiego planu działania „Jedno zdrowie” na rzecz zwalczania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (2017/2254 (INI)) (2019/C 433/21).
5. Bielański A. Podstawy chemii nieorganicznej, Warszawa 1987.
6. ChoK., ParkJ., Osaka T., Park S., The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient, Electrochimica Acta, 2005, 51, 956–960, Zgłoszenie patentowe nr U. S. 6379712 B1, USA.
7. Zgłoszenie patentowe nr U. S. 2005/0287112 A1, USA.
8. „Wszystko o zgnilcu amerykańskim” lek. wet. Marta Skubida.
9. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 11 lipca 2016 r. w sprawie zwalczania zgnilca amerykańskiego pszczoł Dz. U. poz. 113).
10. Załącznik nr 1 do Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 11 lipca 2016 r. w sprawie zwalczania zgnilca amerykańskiego pszczoł Dz. U. poz. 113).

Marcin Raczyński,
e-mail: m.raczyński@vet-animal.pl

Artykuł zawiera treści promocyjne



ŻYCIE WETERYNARYJNE

CZASOPISMO SPOŁECZNO-ZAWODOWE I NAUKOWE KRAJOWEJ IZBY LEKARSKO-WETERYNARYJNEJ

100 LAT

Naczyniakomięsak u kotów

przegląd najnowszych
doniesień i opis
przypadku guza
prawego przedsionka

**Międzybłoniak
złośliwy worka
osierdziowego
w obrazie USG**

**ŻUBRY –
ochrona zdrowia
i zarządzanie
populacją**

Rozmowa

z dr. hab. n. wet. Michałem
Konradem Krzysiakiem

temat numeru

**APLIKACJE INTERNETOWE
W ASPEKcie WYKONYWANIA
ZAWODU LEKARZA WETERYNARII,
JAKO ZAWODU ZAUFANIA PUBLICZNEGO**

Razem
możemy
więcej.
Oddaj swój
głos!

