

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

МЯГКА КАТЕРИНА СЕРГІЇВНА

УДК 35.072.6:638.16:577.18

**НАУКОВО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ
КОНТРОЛЮ БЕЗПЕЧНОСТІ ТА ЯКОСТІ МЕДУ НАТУРАЛЬНОГО
ЗА ЗАЛИШКОВОЮ КІЛЬКІСТЮ АНТИБІОТИКІВ**

16.00.09 «Ветеринарно-санітарна експертиза»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2020

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Роботу виконано в Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів

Науковий керівник доктор ветеринарних наук, професор
Ткачук Світлана Алімівна,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
професор кафедри ветеринарної гігієни
імені професора А. К. Скороходька

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор,
член-кореспондент НААН
Руденко Євген Володимирович,
Інститут тваринництва НААН,
директор

кандидат ветеринарних наук, доцент
Богатко Надія Михайлівна,
Білоцерківський національний
аграрний університет,
завідувач кафедри ветеринарно-санітарної
експертизи

Захист відбудеться «17» жовтня 2020 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.14 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «16» вересня 2020 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. В. Журенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Забезпечення безпечності та якості харчових продуктів – один із пріоритетних напрямів досягнення стратегічних цілей розвитку аграрного сектору економіки (Оверковська Т., 2018).

За даними FAO, Україна є одним зі світових лідерів виробництва меду на особу та обсягів його експорту, і з 2008 р. займає перше місце серед країн Європи, і третє після Китаю та Аргентини. Незважаючи на те, що в Україні близько 400 тис. осіб доглядають за майже чотирма мільйонами бджолиних сімей (Салеба Л. В., Кудельська А. В., 2017) і країна здатна вільно конкурувати на світовому ринку, постало питання щодо вирішення проблеми досягнення статусу надійної країни-експортера товарного меду, враховуючи вітчизняний потенціал щодо виробництва цього цінного продукту (Арнаута О. В., Томчук В. А., Бернатович О. В., 2013; Єфімова О. М., Касянчук В. В., 2013). Тому за умов забезпечення конкурентоспроможності на світовому ринку і споживання продуктів бджільництва всередині країни, гостро постає проблема забезпечення їх безпечності та якості відповідно до світових вимог (Пислар Г. В., 2012). Питання визначення вмісту антибіотиків у меді постало у зв'язку з тим, що в Європі мед вважається натуральним лікувальним засобом, а не продуктом щоденного вжитку, тому вимоги до якості такої продукції досить високі (Терещенко О. В., Бохан Ю. В., 2015).

Вимоги до безпечності та якості меду наведено у ряді чинних регламентів у країнах-членах СОТ та ЄС, зокрема у Регламентах Європейського Парламенту та Ради (ЄС) 178/2002, 852/2004, 853/2004; у стандарті Комісії з Кодексу Аліментаріус CODEX STAN 12-1981 та у Директивах Ради 2001/110/ЄС і 96/23/ЄС, а в Україні – ДСТУ 4497:2005.

Водночас в Україні залишається низка проблемних питань щодо контролю за безпечністю та якістю меду. Одним із них є те, що на більшості потужностей з виробництва продуктів бджільництва, зокрема у центрах з переробки меду, не запроваджено постійно діючі процедури, які базуються на принципах системи аналізу небезпечних факторів і контролю у критичних точках, що призводить до отримання меду, який не відповідає показникам безпечності та якості.

Окрім того, власники (фермери) бджолиних пасік не завжди зареєстровані у визначеному законодавством порядку, самостійно можуть придбати ветеринарні препарати (без рецептів) та не ведуть записи щодо лікування бджіл (із зазначенням дати застосування, назви препарату і періоду виведення тощо). До того ж деякі ветеринарні препарати не включені до щорічних Планів державного моніторингу через нестачу аналітичних методів дослідження, валідованих згідно з вимогами Рішення Комісії 2002/657/ЄС, недостатнього їх обсягу за деякими групами речовин, бюджетними обмеженнями, неналежною стратегією відбору зразків.

Основною перешкодою для збільшення експорту виробленого в Україні меду до країн ЄС є невідповідність показників безпеки вимогам країн-імпортерів. У меді, отриманому від українських виробників, найчастіше

визначають залишки хлорамфеніколу, нітрофуранів, нітромідазолу, сульфаніламідів, тетрациклінів та аміноглікозидів. Нині в Україні не зареєстровано жодного препарату для лікування бджіл, який містить вищезгадані діючі речовини, оскільки їхнє використання заборонене, як в бджільництві країн ЄС, так і в Україні. Тому виявлення залишків згаданих речовин у меді є важливим заходом для встановлення наслідків несанкціонованого застосування бджолярами контрабандних препаратів або медичних препаратів, доступних у роздрібних аптеках гуманної медицини (Янович Д. В., Мисько Г. Л., 2014).

Отже, удосконалення сучасних методів, зокрема методу імуноферментного аналізу (ELISA), щодо визначення залишкових кількостей антибіотиків, з подальшим внесенням встановленої межі їх залишкової кількості до Плану державного моніторингу є нині досить актуальним. Також необхідно надати пропозиції щодо внесення змін і доповнень до чинного ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови» щодо встановлення вимог до показників безпечності, зокрема стосовно антибіотиків відповідно до вимог ЄС.

Крім того, потребують надання науково-експериментального обґрунтування не вирішені наукові проблемні питання щодо якості меду залежно від ботанічного походження, вмісту залишкової кількості антибіотиків, умов і термінів його зберігання.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є складовою частиною науково-дослідних ініціативних тем: «Розробка, вивчення та порівняння різних методів і засобів ветеринарно-санітарної оцінки і контролю якості та безпеки продукції тваринного і рослинного походження та кормів» (номер державної реєстрації 0109U001082, 2009–2018 рр.); «Розробка нових та вдосконалення існуючих підходів, методів та засобів моніторингу та лабораторних досліджень (випробувань) показників безпечності та окремих показників якості об'єктів санітарних заходів, побічних продуктів тваринного походження, кормових добавок, преміксів, кормів, ґрунту і води» (номер державної реєстрації 0118U100597, 2019–2026 рр.) та «Науково-практичне обґрунтування критеріїв якості та безпечності харчових продуктів, отриманих за різними технологіями ведення тваринництва» (номер державної реєстрації 0115U003299, 2014–2019 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета – науково-експериментальне обґрунтування контролю безпечності та якості меду натурального за залишковою кількістю антибіотиків і удосконалення скринінг-методу імуноферментного аналізу, дослідження залишкових кількостей антибіотиків у меді з липи та визначення органолептичних і фізико-хімічних показників залежно від способів обробки антибіотиками бджолиних сімей, і термінів зберігання меду.

Відповідно до мети було поставлено завдання:

– проаналізувати результати дослідження залишкових кількостей антибіотиків у меді натуральному за період з 2012 до 2017 р. згідно з Планом державного моніторингу;

– проаналізувати поширення бактеріальних хвороб бджіл на території України з 2012 до 2017 р.;

– встановити придатність скринінг-методу імуноферментного аналізу для визначення залишкових кількостей нітрофурану (АОЗ), хлорамфеніколу, неоміцину та флорфеніколу у зразках меду натурального;

– удосконалити скринінг-метод імуноферментного аналізу, розробивши універсальний та швидкий спосіб виявлення залишкових кількостей флорфеніколу у меді;

– визначити фізико-хімічні показники меду з липи залежно від способів обробки бджолиних сімей нітрофураном (АОЗ), хлорамфеніколом, неоміцином і флорфеніколом та термінів зберігання;

– дослідити залишкові кількості нітрофурану (АОЗ), хлорамфеніколу, неоміцину та флорфеніколу у меді з липи залежно від способів обробки бджолиних сімей та термінів зберігання.

– розробити методичні рекомендації з кількісного визначення окремих антибіотиків у меді.

Об'єкт дослідження – безпечність та якість меду натурального за застосуванням антибіотиків.

Предмет дослідження – аналіз залишків антибіотиків у меді згідно з Планом державного моніторингу, аналіз поширення бактеріальних хвороб бджіл, оцінка придатності методу кількісного визначення нітрофурану (АОЗ), хлорамфеніколу, неоміцину та флорфеніколу, удосконалення скринінг-методу імуноферментного аналізу, органолептичні, фізико-хімічні показники, залишкові кількості антимікробних препаратів залежно від способів обробки бджолиних сімей та термінів зберігання меду з липи.

Методи дослідження: органолептичні (визначення кольору, запаху, смаку, консистенції), фізико-хімічні (визначення масової частки води, діастазного числа, вмісту гідроксиметилфурфуролу, масової частки відновлювальних сахарів, кислотності та масової частки сахарози), хіміко-аналітичні (імуноферментний аналіз, рідинна хроматографія для визначення залишкових кількостей антимікробних препаратів), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше за результатами власних досліджень зроблено науково-експериментальне обґрунтування контролю безпечності та якості меду натурального з використанням комплексного лабораторного дослідження та встановлено придатність скринінг-методу імуноферментного аналізу для визначення залишкових кількостей нітрофурану (АОЗ), хлорамфеніколу, неоміцину та флорфеніколу у зразках меду натурального. Встановлено зміни органолептичних і фізико-хімічних показників у меді з липи залежно від способів обробки бджолиних сімей розчинами антимікробних препаратів, термінів зберігання меду з липи, використовуючи хіміко-аналітичні, органолептичні, фізико-хімічні та статистичні методи.

Скринінг-метод імуноферментного аналізу оцінено за здатністю визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу (здатність виявлення – 0,05 мкг/кг, рівень відсічення тесту – 0,048 мкг/кг); нітрофурану (АОЗ)

(здатність виявлення – 0,4 мкг/кг, рівень відсічення тесту – 0,401 мкг/кг); неоміцину (здатність виявлення – 30,0 мкг/кг, рівень відсічення – 25,7 мкг/кг); флорфеніколу (здатність виявлення – 5,0 мкг/кг, рівень відсічення – 3,16 мкг/кг).

Удосконалено метод імуноферментного аналізу щодо визначення флорфеніколу у меді через зміну пробопідготовки та способу екстракції з високим відсотком повернення флорфеніколу у меді (96,5 %), що забезпечує ефективність досліджень (випробувань) та точність оцінки результатів.

Отримано патент на корисну модель «Спосіб виявлення залишкових кількостей флорфеніколу у меді».

Вперше проведено дослідження та встановлено вплив способів обробки бджолиних сімей (згодовування у складі сиропу чи аерозольна обробка) 0,1 % розчином досліджуваних антибіотиків на фізико-хімічні показники меду з липи та у впродовж його зберігання. Встановлено, що більшість досліджуваних показників (кислотність, діастазне число, вміст гідроксиметил-фурфуролу, масова частка відновлювальних сахарів), відповідають вимогам ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови», окрім показників вмісту масової частки води та масової частки сахарози, за згодовування бджолам сиропу, які перевищували встановлені вимоги.

Встановлено залежність залишків антибіотиків в меді за різних способів обробки бджолосімей розчинами з антибіотиками та умов зберігання протягом 10 діб, 30 та 120 діб.

Визначено, що через чотири місяця зберігання такого меду з липи залишкові кількості антимікробних речовин не відповідають вимогам чинного Національного стандарту та європейського законодавства.

Практичне значення одержаних результатів. З метою удосконалення системи контролю залишкових кількостей антибіотиків у меді запропоновано скринінг-метод імуноферментного аналізу для кількісного визначення неоміцину та флорфеніколу, і додано їх до сфери акредитації Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи на відповідність ДСТУ ISO/IEC 17025:2005 і внесено до Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових продуктах тваринного походження.

Для практичного застосування розроблено Методичні рекомендації з кількісного визначення флорфеніколу та тіамфеніколу за допомогою тест-системи для імуноферментного аналізу Kwinbon Biotech Florfenicol and Thiamphenicol (Cat.No.: KA12901H); Методичні рекомендації з кількісного визначення неоміцину за допомогою тест-системи для імуноферментного аналізу EuroProxima Neomycin ELISA (Cat. No.: 5111NEO)».

Отримані результати досліджень впроваджено в діяльність Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок, Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природо-

користування України та в навчальний процес Подільського державного аграрно-технічного університету, Житомирського національного агроекологічного університету та Харківської державної зооветеринарної академії.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто сформульовано робочі гіпотези та наукову концепцію, яку покладено в основу дисертації, самостійно опрацьовано літературні джерела, опановано необхідні методики досліджень, виконано весь комплекс досліджень за розділами роботи та здійснено статистичну обробку отриманих результатів, підготовлено наукові статті. Дані, що належать до наукової новизни та практичного значення, отримано здобувачем особисто. У роботах, опублікованих у співавторстві, фактичний матеріал, основні положення та висновки належать здобувачу. Аналіз одержаних результатів дослідження і формулювання висновків проведено спільно з науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційного дослідження доповідалися та обговорювалися на: Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 20 річниці створення Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів «Біотехнологія та її роль в забезпеченні здоров'я людей та тварин» (м. Київ, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 120-річчю Національного університету біоресурсів і природокористування України «Контроль безпечності харчових продуктів Україна-ЄС: невирішені питання» в рамках реалізації проєкту за підтримки програми Жана Моне «Контроль безпечності харчових продуктів у ЄС» (м. Київ, 2018 р.); щорічній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 95-річчю з дня заснування Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» та 90-річчю з дня народження академіка Національної академії аграрних наук України Г. А. Краснікова «Проблеми біологічної безпеки та контролю транскордонних емерджентних інфекційних захворювань» (м. Харків, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 2018 р.); науково-практичному семінарі «Безпечність харчових продуктів: законодавство, контроль, стандарти» (м. Київ, 2019 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції, присвяченій 100-річчю факультету ветеринарної медицини «Сучасні тенденції ветеринарної освіти та науки» (м. Київ, 2019 р.).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 13 наукових праць, з яких 3 статті у наукових фахових виданнях України, 3 статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні, включеному до міжнародних наукометричних баз даних, патент на корисну модель, 2 методичні рекомендації та 3 тези наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів

експериментальних досліджень, аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків і пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Загальний обсяг дисертації становить 212 сторінок. Роботу ілюстровано 14 рисунками та 45 таблицями. Список використаних джерел налічує 209 найменувань.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вибір напрямів досліджень, матеріали і методи виконання роботи. Дисертацію виконано впродовж 2015–2020 рр. у Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи.

Експериментальні дослідження проведено в умовах пасіки Національного наукового центру «Інститут бджільництва імені П. І. Прокоповича» НААН.

Матеріалом для досліджень слугували зразки меду натурального для проведення випробувань за виконанням Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у живих тваринах і необроблених харчових продуктах тваринного походження протягом 6 років (2012–2017 рр.), а також меду липового з метою проведення експериментальних досліджень. Загалом для дослідження використано 1627 зразків меду для оцінки Планів державного моніторингу та 25 проб меду з липи.

Усі дослідження було розподілено на 5 етапів.

На *першому етапі* визначали наявність у меді натуральному залишкових кількостей антимікробних речовин за двома групами – А6 та В1, відповідно до виконання Плану державного моніторингу (за період від 2012 до 2019 рр.) з врахуванням вимог Директиви Ради ЄС від 29 квітня 1996 року № 96/23/ЄС, Рішення Комісії від 23 лютого 1997 року № 98/179/ЄС.

Під час виконання цього етапу дослідження використовували акредитовані та валідовані скринінгові методи: імуноферментний аналіз (ELISA) і високоефективна рідинна хроматографія (HPLC) та підтверджуючий РХ-МС/МС (LC-MS/MS).

Застосовувані кількісні методи високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) та підтверджуючий РХ-МС/МС (LC-MS/MS) відповідають тим самим вимогам до точності, динамічного діапазону, як і підтверджуючі тести. Отже, коли потрібна кількісна оцінка, ці методи були встановлені як підтверджуючі, що детально описано у Рішенні Комісії 2002/657/ЄС.

На *другому етапі* проводили аналіз річних звітів та нормативних документів щодо діагностики бактеріальних інфекцій бджіл в Україні за період 2013–2017 рр.

На *третьому етапі* дослідження проведено валідацію кількісного визначення хлорамфеніколу, нітрофурану (АОЗ), неоміцину та флорфеніколу у зразках меду натурального. Під час проведення валідаційних досліджень використовували тест-системи RIDASCREEN® Chloramphenicol (Art. No.:

R1505), Nitrofurantoin (AOZ) (Art. No.: R3798), EuroProxima Neomycin ELISA (Cat. No.: 5111NEO) (Нідерланди) та Kwinbon Biotech Florfenicol and Thiamphenicol (Cat. No.: KA12901H) (Китай) для методу імуноферментного аналізу та зразки меду натурального.

Збагачення зразків до рівня цільової концентрації скринінгу проводили розчином хлорамфеніколу з концентрацією 5 нг/мл R-biopharm Art. No.: R1599 і нітрофурану (AOZ) – 20 нг/мл R-biopharm Art. No.: R3798. Матеріалом для дослідження слугував розчин неоміцину з концентрацією 1000 нг/мл та флорфеніколу з концентрацією 1 мг/кг.

Стандартне відхилення і відносне стандартне відхилення визначали за допомогою пакету аналізу «Статистика» Microsoft Excel.

Завданням *четвертого етапу* було удосконалення універсального способу виявлення залишкових кількостей флорфеніколу у меді шляхом зміни процедурного підходу (пробопідготовки досліду) у методі імуноферментного аналізу (ELISA).

На *п'ятому етапі* дослідження визначали залишки хлорамфеніколу, нітрофурану (AOZ), неоміцину та флорфеніколу у меді з липи та визначали органолептичні та фізико-хімічні показники після застосування різних способів обробки бджолиних сімей 0,1 % розчином цих антибіотиків. Зразки меду з липи відбирали на 10 добу після закінчення експерименту та через 30 та 120 діб зберігання меду в скляній тарі у темному місці за температури не вище 25 °С.

Дослід з визначення залишкової кількості антибіотиків у меді з липи проведено за природних умов на пасіці лабораторії технологічних і спеціальних заходів профілактики хвороб бджіл Національного наукового центру «Інститут бджільництва імені П. І. Прокоповича» НААН. На пасіці нараховується 40 бджолиних сімей, у 27 із яких було проведено експериментальні дослідження. Бджолині сім'ї утримувалися у вуликах-лежаках і мали маток першого року використання.

Для цього досліду використовували сертифіковані субстанції хлорамфеніколу, нітрофурану (AOZ), неоміцину та флорфеніколу за умови одноразової обробки ними бджолиних сімей. Вибір 0,1 % концентрації антибіотиків обґрунтовували відповідно до даних наукової літератури, де наведено результати їх інгібуючого ефекту відносно збудників гнильцевих захворювань бджіл за лабораторних умов і з визначення протигнильцевого ефекту, за умови лікування бджолиних сімей, уражених європейським та американським гнильцями у природних умовах.

Для проведення експериментального дослідження було сформовано 9 груп бджолиних сімей – 1 контрольну та 8 дослідних, які було поділено за способами обробки: I група контрольна – обробка не проводилася; II група – аерозольна обробка, шляхом обприскування (0,1 % розчин антибіотиків) та III група – згодовування сиропу (0,1 г/0,1 л сиропу, що відповідає концентрації 0,1 % – 0,5 л антибіотиків на сім'ю).

Обробка бджолиних сімей проводилася 07.06.2018 р., відбір стільників з подальшим їх пресуванням – 17.06.2018 р.

Для згодовування сиропу з антимікробним препаратом 0,1 г його розчиняли в 10 мл кип'яченої, охолодженої до 25 °С води, ретельно змішували та доводили до 100 мл свіжовиготовленим цукровим сиропом і згодовували по 0,5 кг на кожну бджолину сім'ю. Згодовування цукровим сиропом проводилося індивідуально в кожну сім'ю за рахунок стільникової годівниці.

Для аерозольної обробки вуликів використовували робочі розчини антибіотиків відповідно до зазначеної концентрації та розприскували за допомогою дрібнодисперсного насосу-оприскувача «Росинка».

Лабораторні дослідження зразків меду, відібраних від оброблених бджолиних сімей, проводили на базі Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи за стандартними методами.

Дослідження якості меду за органолептичними та фізико-хімічними показниками проводили відповідно до методик, зазначених у ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови». Досліджували такі показники: масову частку води, кислотність, діастазне число, вміст гідроксиметилфурфуролу, масову частку відновлювальних сахарів і масову частку сахарози.

Для підтвердження ботанічного походження меду проводили визначення видового складу пилоквих зерен за ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови».

Вірогідність результатів дослідження забезпечувалася проведенням їх у триразовій повторності. Усі отримані цифрові дані обробляли статистично з використанням комп'ютерного програмного пакету «Microsoft Excel» з обчисленням середньої арифметичної та її похибки ($M \pm m$), рівня вірогідності (P) за таблицею Стьюдента ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,0001$). Крім цього, проводили двофакторний дисперсійний аналіз отриманих результатів.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Аналіз вмісту залишкових кількостей ветеринарних препаратів і забруднювачів у меді згідно з виконанням Плану державного моніторингу у 2012–2017 рр. Фактична кількість досліджуваних зразків коливалася відповідно до розробленого національного Плану моніторингу. Позитивним (рівень межі детектування) у 2012 р. виявився один зразок меду за вмістом нітрофурану (AOZ), що становить 5 % від усіх досліджуваних зразків. Дослідження проводилися скринінговим методом (ELISA) ($cc\beta - 0,7$ мкг/кг) та підтверджуючим методом – LC-MS/MS ($cc\alpha - 1$ мкг/кг). З групи речовин В6 позитивними виявилися сім зразків меду за вмістом сульфаметазину, що становило 4,7 % від досліджуваних проб. Для дослідження застосовувався підтверджуючий метод – LC-MS/MS ($cc\alpha - 10$ мкг/кг).

У 2013 р. позитивний результат встановлено у двох зразках меду за вмістом хлорамфеніколу, що становило 5 % від усіх досліджуваних зразків. Дослідження проводили скринінговим методом ELISA ($cc\beta - 0,18$ мкг/кг) та підтверджуючим – LC-MS/MS ($cc\alpha - 0,29$ мкг/кг). Позитивний результат нітрофурану (SEM) було встановлено в одному зразку, що становить 5 %

від кількості досліджуваних зразків. Для дослідження використовували скринінговий метод ELISA (ссβ – 0,6 мкг/кг) і підтверджуючий LCMS/MS (ссα – 1 мкг/кг).

У 2016 р. встановлено позитивний результат в одному зразку меду за вмістом нітрофурану (АМОЗ) (6,7 %). Дослідження проводилися скринінговим методом ELISA (ссβ – 0,6 мкг/кг) і підтверджуючим LC-MS/MS (ссα – 0,5 мкг/кг).

Проведеними у 2017 р. дослідженнями відповідно до Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та забруднювачів у меді виявлено позитивний результат в одному зразку за вмістом хлорамфеніколу, що становило 5 % від усіх досліджуваних зразків. У 2018 р. позитивний результат встановлено в одному зразку меду за вмістом флорфеніколу, що становило 8,3 % від усіх досліджуваних зразків. Дослідження проводили скринінговим методом ELISA (ссβ – 0,05 мкг/кг) та підтверджуючим LC-MS/MS (ссα – 0,05 мкг/кг) щодо залишків ветеринарних препаратів.

Аналіз поширення бактеріальних захворювань бджіл на території України за 2013–2017 рр. Згідно з проведеним аналізом ветеринарної звітності та нормативними документами під час дослідження зразків живих бджіл та бджолиного розплоду (лялечок) протягом з 2013 до 2017 р. включно, найбільше позитивних результатів було одержано з виявлення збудників американського гнильцю, що склало 1,32 % від кількості досліджуваних зразків у 2013 р.

У наступні роки відбулося зниження кількості випадків виявлення американського гнильцю. Так, у 2013 р. було одержано 279 позитивних результатів щодо виявлення американського гнильцю, у 2014 р. – сім позитивних результатів у 2015 р. – чотири, у 2016 р. – три та у 2017 р. – сім позитивних результатів.

Аналіз звітної документації щодо наявності збудника європейського гнильцю на території України показав, що кількість позитивних зразків у 2013 р. становила два, у 2014 р. – чотири, у 2015 р. – три, у 2016 р. – чотири та у 2017 р. – три зразки від загальної кількості зразків, що досліджувалися.

Щодо виявлення мікроорганізмів парагнильцю було встановлено такі позитивні результати: у 2015 р. – два зразки, у 2016 р. – два зразки, у 2017 р. – один зразок.

У 2014 та 2017 рр. було виявлено по одному позитивному випадку колібактеріозу бджіл. Сальмонельоз бджіл виявлено у 2014 р. – один випадок, у 2017 р. – два позитивні випадки.

У 2015–2016 рр. збудника септицемії виявлено у двох та п'яти зразках відповідно.

Зробивши аналіз розповсюдження хвороб бджіл на території України бачимо, що вони реєструються в 11 регіонах.

Оцінка придатності скринінг-методу імуноферментного аналізу для кількісного визначення нітрофурану (АОЗ), хлорамфеніколу, неоміцину та флорфеніколу в зразках меду натурального. Оцінювання придатності – це підтвердження дослідженням та наданням об'єктивних доказів

того, що конкретні вимоги до специфічного цільового використання виконуються.

З метою отримання валідаційних даних щодо залишків нітрофурану (AOZ) у меді натуральному було досліджено 25 контрольних зразків меду натурального, що не містили цільового аналіту та 25 зразків, збагачених нітрофураном (AOZ) до рівня цільової концентрації – 0,4 мкг/кг.

Встановлено, що найбільше значення (найвища відповідь) для контрольних зразків становить 0,066 мкг/кг і найменше значення для збагачених зразків (найнижча відповідь) – 0,401 мкг/кг. За отриманими результатами, жодна з відповідей для збагачених зразків не збігається з діапазоном відповідей для контрольних зразків, тому можна стверджувати, що ССβ за скринінг-методом менша або дорівнює 0,4 мкг/кг.

Рівень відсічення цього тесту – 0,401 мкг/кг означає, що будь-який результат вищий за цей рівень можна вважати скринінг-позитивним, а отже, перевищує здатність виявлення (ССβ) (β -помилка <5 %).

Щодо валідаційних характеристик залишкових кількостей хлорамфеніколу у меді, було досліджено 21 контрольний зразок, що не містив цільового аналіту та 21 збагачений хлорамфеніколом до рівня цільової концентрації скринінгу – 0,05 мкг/кг.

За отриманими даними, найвища відповідь для контрольних зразків з хлорамфеніколом становить 0,021 мкг/кг, а найнижча для збагачених зразків – 0,048 мкг/кг. Жодна з відповідей для збагачених зразків не збігається з діапазоном відповідей контрольних зразків, тому можна зробити висновок, що ССβ цього скринінг-методу менша або дорівнює 0,05 мкг/кг (β -помилка <5 %) і рівень відсічення цього тесту – 0,048 мкг/кг.

Для оцінки придатності цієї скринінг-методики було досліджено 20 зразків матриці (контрольного чистого меду) та 20 збагачених зразків стандартним розчином неоміцину на рівні 30,0 мкг/кг. Підготовку зразків виконували за розробленими методичними рекомендаціями. Аналіз проводили у різні дні, з урахуванням можливих змін експлуатаційного режиму, що мають безпосередній вплив на виконання таких досліджень. Статистичну обробку результатів проводили програмним забезпеченням Excel.

Найвища відповідь, визначена для контрольних зразків, становить 11,3 мкг/кг, а найнижча, визначена для збагачених зразків, – 25,7 мкг/кг. Жодна з відповідей для збагачених зразків з неоміцином не збігається з діапазоном відповідей контрольних зразків, тому можна зробити висновок, що ССβ цього скринінг-методу менша або дорівнює 30,0 мкг/кг (β -помилка <5 %) і рівень відсічення цього тесту – 25,7 мкг/кг (рис. 1).

У подальшому встановлено, що найбільше значення для контрольних зразків з флорфеніколом становить 0,39 мкг/кг і найменше значення для збагачених зразків – 3,16 мкг/кг. За отриманими результатами, жодна з відповідей для збагачених зразків не збігається з діапазоном відповідей для контрольних зразків.

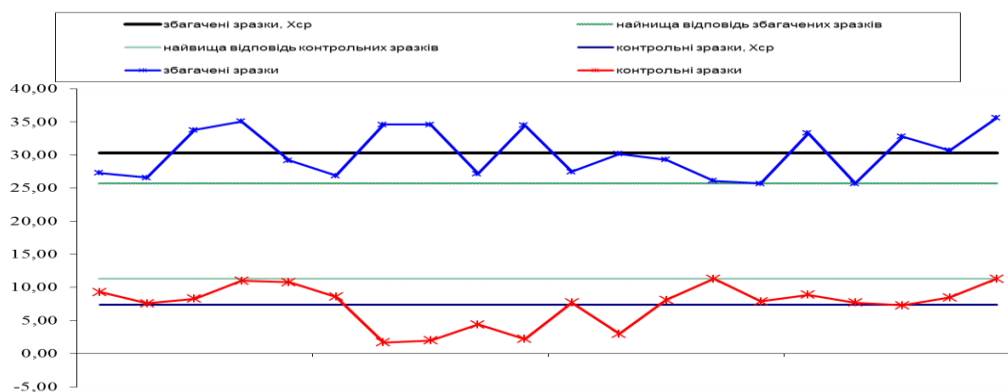


Рис. 1. Технічний поріг та межа відсікання за оцінки придатності методики кількісного визначення флорфеніколу в меді натуральному

З цього випливає, що рівень відсічення становить 3,16 мкг/кг і здатність виявлення (ССβ) за цим скринінг-методом менша або дорівнює 5,0 мкг/кг (рис. 2).

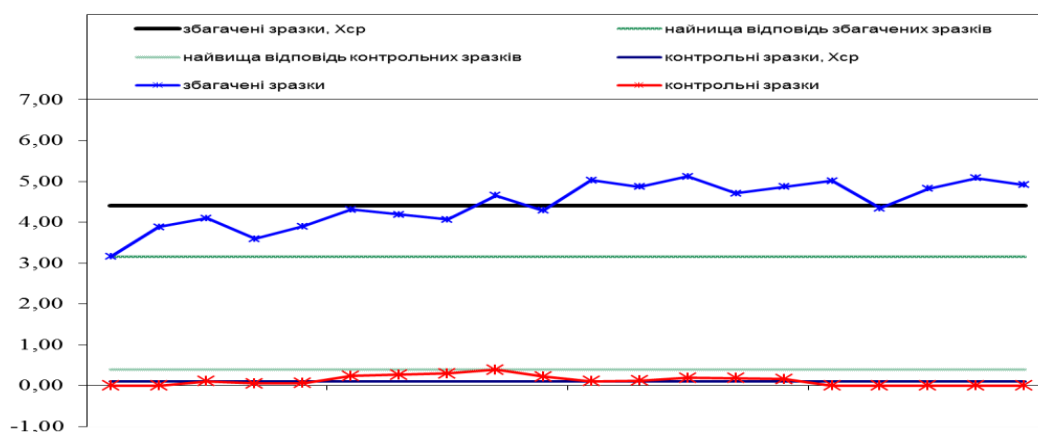


Рис. 2. Технічний поріг та межа відсікання за оцінки придатності методики кількісного визначення флорфеніколу в меді натуральному

Розроблення універсального та швидкого способу виявлення залишкової кількості флорфеніколу у меді. Метод імуноферментного аналізу (ELISA): «Кількісне визначення флорфеніколу та тямфеніколу за допомогою тест-системи для імуноферментного аналізу Kwinbon Biotechnology Florfenicol and Thiamphenicol (Cat. No.: KA12901H)» для виявлення залишкових кількостей флорфеніколу має ряд недоліків методики: під час екстракції меду ацетонітрилом зразок за взаємодії з розчинником осаджується, внаслідок чого площа екстракції зменшується, що суттєво впливає на відсоток повернення та не забезпечує високу ефективність випробувань.

Відповідно до розробленого методу було змінено процедурний підхід (пробопідготовка досліду): для аналізу брали 1,5 г підготовленого, гомогенізованого зразка в центрифужну пробірку об'ємом 30 мл, додавали 6 см³ дистильованої води та перемішували до розчинення, додавали до нього 6 см³ етилацетату та екстрагували 5 хв за 100 об./хв на роторному змішувачі, центрифугували 10 хв за 3000 g за кімнатної температури, перенесли 1 см³ екстракту етилацетату в чисту центрифужну пробірку та висушували екстракт

під потоком азоту за 50–60 °С до сухого залишку, сухий залишок розчиняли в 1 см³ н-гексану та струшували за допомогою вортексу 30 с, додавали 1 см³ розчину для екстрагування та перемішували з подальшим центрифугуванням 5 хв за 3000 g і кімнатній температурі, для аналізу використовували 50 мкл.

Отже, завдяки удосконаленню процесу екстракції отримали точність оцінки результатів високого відсотка (96,5 %) повернення флорфеніколу у меді, що забезпечує високу ефективність випробувань.

Фізико-хімічні показники меду з липи за різних способів обробки бджолосімей флорфеніколом, неоміцином, хлорамфеніколом та нітрофураном (АОЗ) на 10 добу. За результатами оцінки після обробки бджолосімей флорфеніколом збільшувалися, порівнюючи з контролем, фізико-хімічні показники меду з липи: масова частка води – на 4,9 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з флорфеніколом і на 0,04 % – за аерозольної обробки; діастазне число як за аерозольної обробки, так і за згодовування бджолам сиропу з флорфеніколом – відповідно на 39,2 ($p \leq 0,01$) та 20,8 % ($p \leq 0,001$); кислотності за аерозольної обробки вуликів флорфеніколом – на 26,5 % ($p \leq 0,001$); масова частка відновлюваних сахарів за згодовування бджолам сиропу з флорфеніколом та за аерозольної обробки ним бджолосімей – відповідно на 3,0 ($p \leq 0,05$) та 1,61 % ($p \leq 0,01$).

У процесі оброблення бджолосімей флорфеніколом, поряд зі збільшенням досліджуваних фізико-хімічних показників у меді липовому, прослідковували вірогідне зменшення таких показників: діастазне число – на 13,3 % ($p \leq 0,05$) за згодовування бджолам сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів; кислотність – на 26,7 % ($p \leq 0,001$) за згодовування бджолам сиропу з цим антибіотиком і контролем та на 42,1 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з антибіотиком, ніж за аерозольної обробки; масова частка сахарози – на 1,17 % ($p \leq 0,01$) за аерозольної обробки та на 0,94 % ($p \leq 0,01$) – за згодовування бджолам сиропу з антибіотиком.

Після оброблення бджолосімей неоміцином на 10 добу спостерігали збільшення масової частки води на 7,13 % ($p \leq 0,001$) за згодовування бджолам сиропу, порівнюючи з контролем, та на 7,63 % ($p \leq 0,001$) за згодовування бджолам сиропу з неоміцину, ніж за аерозольної обробки цим антибіотиком.

Водночас вірогідного зменшення зазнали такі фізико-хімічні показники: масова частка води на 0,5 % ($p \leq 0,01$) за аерозольної обробки бджолосімей неоміцином; діастазне число як за аерозольної обробки неоміцином, так і за згодовування сиропу з антибіотиком – відповідно на 15,9 ($p \leq 0,05$) та 38,6 % ($p \leq 0,01$), порівнюючи з контролем, та за згодовування сиропу з неоміцином – на 27 % ($p \leq 0,01$), ніж за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком; кислотність меду – відповідно на 37,4 ($p \leq 0,001$) та 29,8 % ($p \leq 0,001$) за згодовування бджолам сиропу і за аерозольної обробки антибіотиком, порівнюючи з контролем, та за згодовування сиропу з неоміцином – на 10,8 % ($p \leq 0,05$), ніж за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком; масова частка сахарози – відповідно на 10,2 ($p \leq 0,01$) та 12,7 % ($p \leq 0,01$) за згодовування бджолам сиропу з неоміцином та за аерозольної обробки, порівнюючи з контролем.

На 10 добу за застосування в обробці вуликів хлорамфеніколу отримали результати, за якими встановлено вірогідне збільшення: масової частки води – на 4,93 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з хлорамфеніколом, ніж у контролі, та на 5,10 % ($p \leq 0,001$), порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів цим антибіотиком; діастазного числа – на 28,4 % ($p \leq 0,01$) за згодовування сиропу з цим антибіотиком та на 54,2 % ($p \leq 0,001$) за аерозольної обробки вуликів, порівнюючи з контролем; вмісту гідроксиметилфурфуролу – на 105,5 ($p \leq 0,001$) та 387,7 % ($p \leq 0,001$) як за згодовування сиропу з хлорамфеніколом, так і за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком, порівнюючи з контролем; кислотності – на 15,1 % ($p \leq 0,001$) за згодовування бджолам сиропу з хлорамфеніколом, ніж за аерозольної обробки цим антибіотиком вуликів; масової частки відновлювальних сахарів – на 2,2 % ($p \leq 0,01$) за згодовування сиропу з хлорамфеніколом, порівнюючи з контролем, та на 2,6 % ($p \leq 0,001$), порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів цим антибіотиком; масової частки сахарози – на 1,23 % ($p \leq 0,05$) за згодовування антибіотику з сиропом, порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів.

Водночас спостерігається вірогідне зменшення: діастазного числа – на 16,7 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з хлорамфеніколом, порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів цим антибіотиком; вмісту гідроксиметилфурфуролу – на 57,9 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з хлорамфеніколом, ніж за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком; кислотності – на 24,9 ($p \leq 0,01$) та 34,8 % ($p \leq 0,001$) як за згодовування сиропу з хлорамфеніколом, так і за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком, порівнюючи з контрольною групою; масової частки сахарози – на 3,01 ($p \leq 0,01$) та 4,24 % ($p \leq 0,001$) як за згодовування сиропу з хлорамфеніколом, так і за аерозольної обробки досліджуваним антибіотиком вуликів, порівнюючи з контролем.

За обробки бджолосімей нітрофураном (АОЗ) отримали результати, за якими встановлено вірогідне збільшення, порівнюючи з контролем: показник масової частки води за згодовування сиропу – на 7,13 % ($p \leq 0,01$).

Спостерігається вірогідне зменшення показників, порівнюючи з контролем: за аерозольної обробки бджіл нітрофураном (АОЗ) – на 0,5 % ($p \leq 0,001$) масової частки води; діастазного числа за згодовування сиропу з нітрофураном (АОЗ) – на 38,6 % ($p \leq 0,01$), а за аерозольної обробки бджіл – на 16,0 % ($p \leq 0,001$); масової частки сахарози – на 3,34 % ($p \leq 0,001$).

Фізико-хімічні показники меду з липи після обробки бджолосімей досліджуваними антибіотиками на 30 добу. На 30 добу зберігання меду з липи після обробки бджолосімей флорфеніколом залишаються вірогідно вищими такі фізико-хімічні показники: масова частка води – відповідно на 5,14 ($p \leq 0,001$) та 5,10 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з флорфеніколом, порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів цим антибіотиком та контролем; діастазне число – відповідно на 38,14 ($p \leq 0,001$) та 33,7 % ($p \leq 0,001$), як за аерозольної обробки вуликів флорфеніколом, так і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем; вміст гідроксиметилфурфуролу – відповідно у 10,6 ($p \leq 0,001$) та 5,3 раза ($p \leq 0,001$) за згодовування бджолам сиропу з флорфеніколом, порівнюючи з контролем, і з аерозольною обробкою

вуликів цим антибіотиком; кислотність – на 30,0 % ($p \leq 0,01$) за згодовування сиропу з цим антибіотиком і аерозольним способом обробки вуликів; масова частка відновлювальних сахарів ($p \leq 0,05$) – на 2,84 % за аерозольної обробки вуликів флорфеніколом та на 2,16 % за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем; масова частка відновлювальних сахарів – на 2,50 % ($p \leq 0,05$) за аерозольної обробки вуликів флорфеніколом та на 1,90 % ($p \leq 0,05$) за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем; масова частка сахарози – відповідно на 1,37 ($p \leq 0,01$) та 2,60 % ($p \leq 0,001$) як за аерозольної обробки вуликів флорфеніколом, так і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем, та на 1,23 % ($p \leq 0,05$) за згодовування бджолам сиропу з флорфеніколом, ніж за аерозольної обробки його розчином вуликів.

Водночас лише кислотність меду липового зменшується на 32,7 % ($p \leq 0,01$) за аерозольної обробки вуликів флорфеніколом відповідно до контролю.

На 30 добу зберігання у меді масова частка води за згодовування бджолам сиропу з хлорамфеніколом становила $22,13 \pm 0,14$ % – це єдиний показник, що не відповідав вимогам чинного стандарту (до 21 %).

Усі інші досліджувані фізико-хімічні показники відповідали вимогам чинного національного стандарту, водночас спостерігалася їх вірогідна динаміка протягом експерименту. Так, зменшувалися: показник діастазного числа ($p \leq 0,001$) – на 16,0 % після згодовування бджолам сиропу з хлорамфеніколом, ніж за аерозольної обробки бджолиних сімей; вміст гідроксиметилфурфуролу ($p \leq 0,001$) – на 57,8 % за згодовування сиропу, ніж за аерозольної обробки вуликів хлорамфеніколом; кислотність меду – відповідно на 35,3 ($p \leq 0,01$) та 23,6 % ($p \leq 0,01$), як за аерозольної обробки вуликів хлорамфеніколом, так і під час згодовування бджолам сиропу з цим антибіотиком; масова частка відновлюваних сахарів – на 1,8 % ($p \leq 0,05$) за аерозольної обробки вуликів розчином хлорамфеніколу, порівнюючи з контролем.

Залишалися вірогідно вищими у меді липовому: масова частка води – на 5,17 % ($p \leq 0,001$) за згодовування бджолам сиропу з хлорамфеніколом, ніж за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком і на 5,03 % ($p \leq 0,01$), порівнюючи з контролем; діастазне число в меді за згодовування бджолам сиропу з хлорамфеніколом – на 37,9 % ($p \leq 0,001$), ніж у контролі, та збільшення на 64,2 % ($p \leq 0,001$) за цим показником, під час аерозольної обробки вуликів хлорамфеніколом і контролем; вміст гідроксиметилфурфуролу – у 7,2 ($p \leq 0,001$) та 3,1 рази ($p \leq 0,01$) відповідно за аерозольної обробки вуликів хлорамфеніколом і згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем; кислотність – на 18,0 % ($p \leq 0,05$) за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів хлорамфеніколом; масова частка відновлюваних сахарів – на 2,67 % ($p \leq 0,01$) за згодовування сиропу з хлорамфеніколом, ніж за аерозольної обробки ним вуликів; масова частка сахарози – відповідно на 1,27 ($p \leq 0,05$) та 2,50 % ($p \leq 0,001$), як за аерозольної обробки вуликів розчином хлорамфеніколу, так і за згодовування

сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем, та на 1,23 % ($p \leq 0,05$) за згодовування сиропу з хлорамфеніколом порівняно з аерозольною обробкою вуликів розчином цього антибіотику.

На 30 добу зберігання меду липового за експериментальної обробки бджолосімей нітрофураном (AOZ) залишалися вищими такі показники: масова частка води – на 7,16 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем, та на 7,66 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з нітрофураном (AOZ), ніж за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком; вміст гідроксиметилфурфуролу – у 257 рази ($p \leq 0,001$) за аерозольної обробки вуликів нітрофураном (AOZ), ніж у контролі; масова частка сахарози – на 1,93 та 4,93 % ($p \leq 0,001$) за аерозольної обробки вуликів нітрофураном (AOZ) та за згодовування сиропу з цим антибіотиком, відповідно до контролю, та на 3,0 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з нітрофураном (AOZ), ніж за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком.

Фізико-хімічні показники меду з липи після обробки бджолосімей досліджуваними антибіотиками на 120 добу зберігання меду. За органолептичними дослідженнями на 120 добу зберігання меду з липи встановили, що колір його був світло-бурштиновий, мед мав добре виражений аромат, солодкий смак, відчувається терпкість. За консистенцією мед щільний.

На 120 добу зберігання меду липового після обробки бджолосімей флорфеніколом залишалися вірогідно вищими: масова частка води – на 5,10 % ($p \leq 0,001$) як за згодовування сиропу з флорфеніколом і контролем, так і за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком; діастазне число – відповідно на 33,0 ($p \leq 0,01$) та 28,7 % ($p \leq 0,001$), як за аерозольної обробки вуликів флорфеніколом, так і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем; вміст гідроксиметилфурфуролу – відповідно у 2,4 ($p \leq 0,05$) та 10,2 рази ($p \leq 0,001$), як за аерозольної обробки вуликів флорфеніколом, так і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, та у 4,3 рази ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів; кислотність – на 30,0 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу з флорфеніколом, порівнюючи за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком; масова частка відновлювальних сахарів – на 4,80 % ($p \leq 0,01$) за аерозольної обробки вуликів флорфеніколом, порівнюючи з контролем; масова частка сахарози – відповідно на 1,17 та 2,37 % ($p \leq 0,001$), як за аерозольної обробки вуликів флорфеніколом, так і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем, та на 1,20 % ($p \leq 0,01$) за згодовування сиропу з флорфеніколом, порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів.

Разом з тим, вірогідно зменшувалися: кислотність – на 7,18 % ($p \leq 0,05$) за згодовування сиропу з флорфеніколом і на 28,6 % ($p \leq 0,001$) за аерозольної обробки вуликів цим антибіотиком, порівнюючи з контролем; масова частка відновлювальних сахарів – на 2,40 % ($p \leq 0,05$) за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів.

Водночас вірогідно зменшувалися: діастазне число – на 18,0 % ($p \leq 0,05$) за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів хлорамфеніколом; вміст гідроксиметилфурфуролу – на

55,7 % ($p \leq 0,01$) за згодовування бджолам сиропу з хлорамфеніколом, порівнюючи з аерозольною обробкою вуликів цим антибіотиком; кислотність – відповідно на 34,0 ($p \leq 0,001$) та 25,7 % ($p \leq 0,001$), як за аерозольної обробки вуликів хлорамфеніколом, так і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем.

Залишалися вірогідно вищими: масова частка води – відповідно на 5,13 ($p \leq 0,001$) та 5,16 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу бджолам порівняно, як з контролем, так і за аерозольної обробки вуликів розчином хлорамфеніколу; діастазне число – відповідно на 62,2 ($p \leq 0,01$) та 33,0 % ($p \leq 0,001$), як за аерозольної обробки вуликів, так і за згодовування сиропу з хлорамфеніколом, порівнюючи з контролем; вміст гідроксиметилфурфуролу – відповідно у 7,8 ($p \leq 0,001$) та 3,4 рази ($p \leq 0,01$), як за аерозольної обробки вуликів хлорамфеніколом, так і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем; кислотність – на 12,5 % ($p \leq 0,05$) за згодовування бджолам сиропу з хлорамфеніколом порівняно з аерозольною обробкою вуликів цим антибіотиком; масова частка відновлювальних сахарів – на 2,40 % ($p \leq 0,01$) за згодовування бджолам сиропу з хлорамфеніколом порівняно з аерозольною обробкою вуликів розчином цього антибіотику; масова частка сахарози – відповідно на 1,33 ($p \leq 0,05$) та 2,37 % ($p \leq 0,001$), як за аерозольної обробки вуликів розчином хлорамфеніколу, так і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем, та на 1,04 % ($p \leq 0,05$) за згодовування сиропу з хлорамфеніколом порівняно з аерозольною обробкою вуликів розчином цього антибіотику.

На 120 добу зберігання меду липового після обробки бджолиних сімей неоміцином залишилися вірогідно вищими такі фізико-хімічні показники: масова частка води – на 6,87 ($p \leq 0,001$) та 7,54 % ($p \leq 0,001$), відповідно за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем, і з аерозольною обробкою вуликів; кислотність – на 16,5 % ($p \leq 0,05$) за згодовування сиропу, ніж за аерозольної обробки вуликів; масова частка сахарози – відповідно на 2,20 та 1,88 % ($p \leq 0,001$) за згодовування сиропу бджолам з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем та аерозольною обробкою.

Водночас вірогідно зменшилися на 120 добу зберігання меду липового такі показники: масова частка води – на 0,67 % ($p \leq 0,01$) за аерозольної обробки вуликів неоміцином, порівнюючи з контролем; діастазне число – на 36,4 ($p \leq 0,01$) та 30,4 % ($p \leq 0,01$), відповідно за згодовування сиропу з неоміцином, порівнюючи з контролем, і з аерозольною обробкою вуликів цим антибіотиком; кислотність – відповідно на 25,0 ($p \leq 0,01$) та 12,5 % ($p \leq 0,01$) за аерозольної обробки вуликів неоміцином і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем.

На 120 добу зберігання меду липового та після обробки у експерименті розчинами нітрофурану (АОЗ) бджолосімей залишилися вірогідно вищими наступні показники: масова частка води – відповідно на 7,2 ($p \leq 0,001$) та 7,77 % ($p \leq 0,001$), за згодовування сиропу з цим антибіотиком порівняно, як з контролем, так і з аерозольною обробкою вуликів; вміст гідроксиметил-

фурфуролу – у 3,07 та 2,8 рази ($p \leq 0,01$), як за аерозольної обробки вуликів нітрофураном (АОЗ), так і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівняно з контролем; масова частка сахарози – на 2,20 ($p \leq 0,01$) та 4,73 % ($p \leq 0,001$), відповідно за аерозольної обробки вуликів нітрофураном (АОЗ) і за згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем, а також на 2,53 % ($p \leq 0,01$) за згодовування сиропу з нітрофураном (АОЗ) порівняно з аерозольною обробкою вуликів.

Водночас вірогідно зменшилися такі показники: масова частка води – на 0,5 % ($p \leq 0,01$) за аерозольної обробки вуликів нітрофураном (АОЗ), ніж у контролі; діастазне число – відповідно на 16,3 % ($p \leq 0,05$), 13,0 ($p \leq 0,01$) та 38,4 % ($p \leq 0,05$), за аерозольної обробки вуликів нітрофураном (АОЗ), згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем, і аерозольною обробкою вуликів; кислотність – на 24,9 і 25,7 % ($p \leq 0,01$) відповідно за аерозольної обробки вуликів нітрофураном (АОЗ) і згодовування сиропу з цим антибіотиком, порівнюючи з контролем.

Із усіх досліджуваних показників не відповідали вимогам чинного національного стандарту масова частка води та масова частка сахарози за згодовування сиропу з кожним з цих антибіотиків, порівнюючи із контрольними зразками меду (рис. 3, 4).

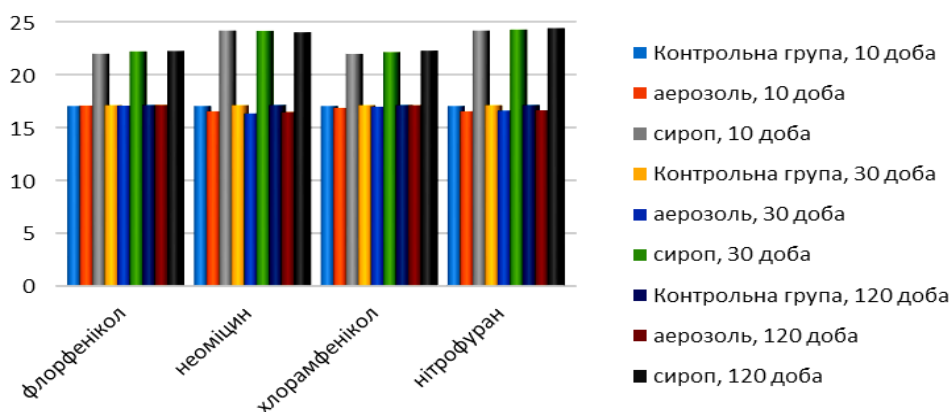


Рис. 3. Динаміка масової частки води (%) у меді з липи від 10 до 120 доби

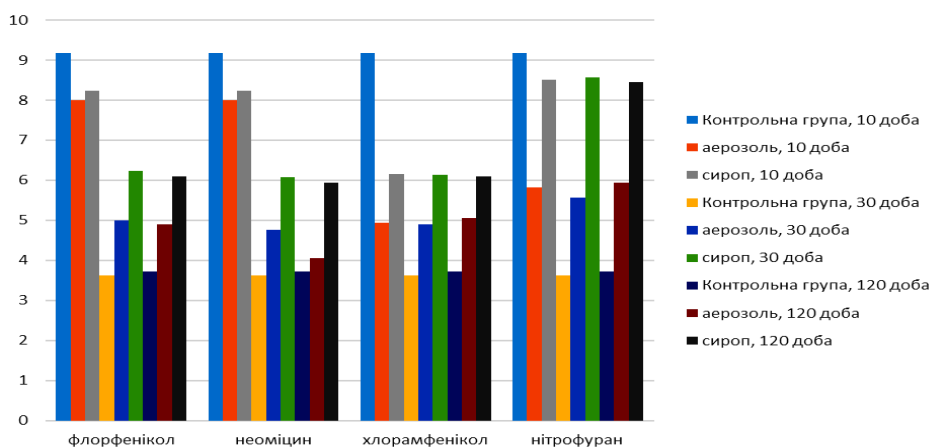


Рис. 4. Динаміка масової частки сахарози (%) в меді з липи від 10 до 120 доби

Залишкові кількості досліджуваних антибіотиків у меді з липи на 10 добу після обробки бджолиних сімей та залежно від термінів зберігання. З табл. 1 бачимо, що на 120 добу зберігання меду, порівнюючи з 10 добою, вірогідно ($p \leq 0,05$) зменшився на 15,4 % вміст хлорамфеніколу за аерозольної обробки.

Таблиця 1

**Динаміка залишків антибіотиків у меді з липи
залежно від термінів зберігання ($M \pm m$, $n=3$; мкг/кг)**

Назва антибіотику	Доба		
	10	30	120
Аерозольна обробка			
Хлорамфенікол	2,53±0,08	2,78±0,10	2,14±0,05*
Флорфенікол	127,05±4,32	129,58±3,78	124,56±5,01
Неоміцин	124,88±1,90	123,29±4,01	130,34±3,40
Нітрофуран (АОЗ)	1,57±0,06	1,52±0,02	1,60±0,10
Згодовування сиропу			
Хлорамфенікол	5,67±0,11	5,27±0,10	5,66±0,16
Флорфенікол	189,96±4,06	190,08±3,24	164,04±5,25*
Неоміцин	196,72±6,45	201,02±1,69	198,44±4,39
Нітрофуран (АОЗ)	2,79±0,04	2,53±0,12	2,87±0,15

Примітка. * $p \leq 0,05$, порівнюючи з 10 добою в межах кожної обробки

Водночас за залишковими кількостями флорфеніколу під час згодовування бджолам сиропу спостерігали вірогідне ($p \leq 0,05$) зменшення на 13,6 % на 120 добу, порівнюючи з 10 добою.

За залишковими кількостями інших досліджуваних антибіотиків у меді з липи впродовж термінів зберігання статистично значимої різниці не спостерігали. Отже, зберігання меду з липи впродовж 4 місяців не впливає на наявність у ньому залишкових кількостей антибіотиків.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено вирішення наукового завдання щодо науково-експериментального обґрунтування контролю безпечності та якості меду натурального за вмістом залишків хлорамфеніколу, нітрофурану (АОЗ), флорфеніколу та неоміцину, виходячи з результатів комплексного експериментального дослідження, яке полягає в аналізі результатів досліджень (випробувань) даних Планів державного моніторингу залишкових кількостей у меді речовин груп А6 і В1 та валідації їх кількісного визначення; аналізі поширення бактеріальних захворювань бджіл на території України; валідації методу кількісного визначення нітрофурану (АОЗ), хлорамфеніколу, флорфеніколу та неоміцину у зразках меду натурального; розробленні універсального та швидкого способу виявлення залишкових кількостей флорфеніколу у меді; визначенні фізико-хімічних показників меду з липи

за різних способів обробки бджолосімей антимікробними речовинами та визначення їх залишків залежно від термінів зберігання меду.

1. За результатами досліджень (випробувань) залишкових кількостей речовин груп А6 і В1 у зразках меду, відповідно до Плану державного моніторингу за період з 2012 до 2017 р., встановлено наявність позитивних результатів за вмістом хлорамфеніколу – 10 %, нітрофурану (АОЗ) – 5 %, нітрофурану (АМОЗ) – 6,7 %, нітрофурану (SEM) – 5 % та сульфаметазину – 4,7 %.

2. На території України у період з 2013 до 2017 р. виявлено збудників бактеріальних захворювань бджіл та розплоду, з яких найбільше позитивних результатів було отримано щодо американського гнильцю (*Paenibacillus Larvae*) – у 300 зразках, європейського гнильцю (*Melissococcus plutonius*) – у 16 зразках, парагнильцю (*Bacillus Paraalvei*) – у 5 зразках, колібактеріозу – у 2 зразках, сальмонельозу – у 3 зразках та збудника септицемії – у 7 зразках.

3. Доведено придатність скринінг-методу імуноферментного аналізу для визначення залишкових кількостей хлорамфеніколу, нітрофурану (АОЗ), неоміцину та флорфеніколу у зразках меду натурального із визначенням валідаційних характеристик для хлорамфеніколу: здатність виявлення – 0,05 мкг/кг та рівень відсічення – 0,048 мкг/кг; нітрофурану (АОЗ): здатність виявлення – 0,4 мкг/кг та рівень відсічення – 0,401 мкг/кг; неоміцину: здатність виявлення – 30,0 мкг/кг, рівень відсічення – 25,7 мкг/кг.

4. Удосконаленим методом імуноферментного аналізу щодо визначення флорфеніколу у меді завдяки зміні пробопідготовки та способу екстракції з високим відсотком повернення флорфеніколу у меді (96,5 %) вдалося забезпечити високу ефективність досліджень (випробувань) та точність оцінки результатів.

5. Динаміка фізико-хімічних показників у меді з липи на 10 добу експерименту та після 30 і 120 доби зберігання залежала як від способу обробки бджолиних сімей, так і від антибіотика, що застосовувався. Водночас більшість фізико-хімічних показників відповідали вимогам ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови», окрім масової частки води та масової частки сахарози за згодовування сиропу з 0,1 % розчином хлорамфеніколу, нітрофурану (АОЗ), неоміцину та флорфеніколу.

6. За результатами двофакторного дисперсійного аналізу встановлено, що на 10 добу та впродовж термінів зберігання меду з липи (на 30 та 120 добу) показники масової частки води, діастазного числа, вмісту гідроксиметил-фурфуролу та масової частки відновлювальних сахарів залежать від способів обробки бджіл розчинами антибіотиків, а впродовж термінів зберігання – від наявності залишкових кількостей антибіотиків.

7. Показники кислотності та масової частки сахарози у меді з липи залежать від терміну його зберігання (на 30 та 120 добу) лише за аерозольної обробки бджіл розчинами антибіотиків.

8. Експериментально показано, що залишкові кількості антибіотиків у меді з липи через 10 діб, а також після зберігання його впродовж (30 та 120 діб)

за температури не вище 25 °С у темному місці вірогідно вищі за згодовування сиропу, ніж за аерозольної обробки бджолиних сімей.

9. Доведено, що через 120 діб зберігання меду з липи (за аерозольної обробки бджіл) вміст хлорамфеніколу був на 15,4 % ($p \leq 0,05$) меншим, порівнюючи з показником на 10 добу, а флорфеніколу – на 13,6 % ($p \leq 0,05$) за згодовування бджолам сиропу. Зберігання меду з липи впродовж 120 діб не впливає на наявність у ньому залишкових кількостей антибіотиків.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Матеріали дисертації пропонується використовувати у процесі розроблення Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та інших забруднювачів у меді.

2. Одержані результати пропонуємо використовувати в навчальному процесі та науковій роботі закладів вищої освіти III–IV рівнів акредитації, слухачам післядипломного навчання та науковцям, а також спеціалістам державних лабораторій Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, які беруть участь у виконанні Плану державного моніторингу залишків ветеринарних препаратів та інших забруднювачів у меді.

3. Рекомендовано переглянути вимоги ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови» щодо розширення переліку показників безпечності, зокрема антибіотиків, із встановлення максимально допустимих рівнів визначення флорфеніколу – 5,0 мкг/кг та неоміцину – 30,0 мкг/кг.

4. Рекомендувати внести зміни до ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови» щодо встановлення допустимого рівня визначення антибіотиків у меді для хлорамфеніколу – 0,05 мкг/кг та нітрофурану (АОЗ) – 0,4 мкг/кг згідно з отриманими валідаційними даними.

5. Рекомендувати державним та виробничим лабораторіям використовувати методи відповідно до Методичних рекомендацій з кількісного визначення флорфеніколу та тіамфеніколу за допомогою тест-системи для імуноферментного аналізу Kwinbon Biotech Florfenicol and Thiamphenicol та Методичних рекомендації з кількісного визначення неоміцину за допомогою тест-системи для імуноферментного аналізу EuroProxima Neomycin ELISA, затверджених Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, протокол № 3 від 20 грудня 2018 року.

6. Рекомендувати внести зміни до Інструкції щодо попередження та ліквідації хвороб і отруєнь бджіл, затвердженої наказом Головного державного інспектора ветеринарної медицини України від 30 січня 2001 року № 9, зареєстрованої в Міністерстві юстиції України 12 лютого 2001 року за № 131/5322 щодо заборони використання антимікробних ветеринарних препаратів у бджільництві.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. **Мягка К. С.**, Ткачук С. А. Валідація методу кількісного визначення флорфеніколу у зразках меду методом імуноферментного аналізу. Ветеринарна медицина. 2018. Вип. 104. С. 267–270. *(Здобувачем проведено дослідження з отримання валідаційних даних, здійснено їх аналіз та підготовлено матеріали до друку).*

2. **Мягка К. С.**, Гаркавенко Т. О., Ткачук С. А. Аналіз поширення бактеріальних захворювань бджіл на території України за 2013–2017 рр. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок та Інституту біології тварин. 2018. Вип. 19 (2). С. 139–145. *(Здобувачем здійснено аналіз досліджень, проведених державними лабораторіями ветеринарної медицини України та підготовлено матеріали до друку).*

3. **Мягка К. С.**, Ткачук С. А. Фізико-хімічні показники меду залежно від термінів зберігання після обробки бджолосімей хлорамфеніколом. Наукові горизонти. 2019. № 6. С. 21–28. *(Здобувачем проведено фізико-хімічні дослідження меду, здійснено їх аналіз, підготовлено матеріали до друку).*

Статті у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних

4. **Мягка К. С.**, Ткачук С. А. Валідація методу кількісного визначення неоміцину у зразках меду методом імуноферментного аналізу. Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування. 2018. Вип. 2. С. 97–101. *(Здобувачем проведено дослідження з отримання валідаційних даних, здійснено їх аналіз та підготовлено матеріали до друку).*

5. **Myagka K. S.**, Tkachuk S. A., Akateva I. S. Analysis of veterinary residues and contaminants in honey. Біоресурси і природокористування. 2018. Т. 10. Вип. 5–6. С. 198–205. *(Здобувачем проведено аналіз державного моніторингу та підготовлено матеріали до друку).*

6. **Мягка К. С.**, Ткачук С. А. Фізико-хімічні показники липового меду за різних способів обробки бджолосімей флорфеніколом. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2018. Вип. 5 (75). URL: <http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi/article/view/11745> *(Здобувачем проведено фізико-хімічні дослідження меду, здійснено їх аналіз, підготовлено матеріали до друку).*

Стаття у науковому виданні, включеному до міжнародних наукометричних баз даних

7. **Мягка К. С.**, Ткачук С. А., Меженська Н. А. Валідація методу кількісного визначення нітрофурану (АОЗ) і хлорамфеніколу у зразках меду натурального за допомогою тест-системи Ridascreen®. Ukrainian Journal of Ecology. 2018. Вип. 8 (1). С. 892–897. *(Здобувачем проведено дослідження з отримання валідаційних даних, здійснено їх аналіз та підготовлено матеріали до друку).*

Патенти України на корисну модель

8. **Мягка К. С.,** Кочетова Г. С., Костюк М. В., Ткачук С. А., Коваленко В. Л. Патент України на корисну модель 132773. МПК 61К 39/12 (2006.01). МПК 61К 33/20 (2006.01). Спосіб виявлення залишкових кількостей флорфеніколу у меді: заявник і патентовласник Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. № u 2018 09753; заявлено 01.10.2018; опубліковано 11.03.2019. Бюл. № 5. *(Здобувач взяла участь у розробленні принципу корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*

Методичні рекомендації:

9. **Мягка К. С.,** Костюк М. В., Ткачук С. А. Методичні рекомендації з кількісного визначення флорфеніколу та тіамфеніколу за допомогою тест-системи для імуноферментного аналізу Kwinbon Biotech Florfenicol and Thiamphenicol (Cat.No.: KA12901H). К., 2018. 23 с. *(Розглянуто та затверджено Науково-методичною радою Держспродспожив-служби, протокол № 3 від 20 грудня 2018 р. Здобувачем проведено аналіз літературних даних, здійснено статистичну обробку цифрових показників отриманих в дослідіах результатів та підготовлено матеріал до друку).*

10. **Мягка К. С.,** Костюк М. В., Ткачук С. А. Методичні рекомендації з кількісного визначення неоміцину за допомогою тест-системи для імуноферментного аналізу EuroProxima Neomycin ELISA (Cat. No.: 5111NEO). К., 2018. 22 с. *(Розглянуто та затверджено Науково-методичною радою Держспродспоживслужби, протокол № 3 від 20 грудня 2018 р. Здобувачем проведено аналіз літературних даних, здійснено статистичну обробку цифрових показників отриманих в дослідіах результатів та підготовлено матеріал до друку).*

Тези наукових доповідей:

11. Ткачук С. А., **Мягка К. С.** Вимоги європейського законодавства до контролю за безпечністю та якістю меду, їх імплементація. Контроль безпечності харчових продуктів. Україна-ЄС: невирішені питання» в рамках реалізації проекту за підтримки програми Жана Моне «Контроль безпечності харчових продуктів у ЄС»: Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 120-річчю Національного університету біоресурсів і природо-користування України, м. Київ, 19–20 квітня 2018 року: тези доповіді. К., 2018. С. 65–66. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел та підготовлено матеріали до друку).*

12. **Мягка К. С.,** Ткачук С. А. Аналіз вмісту залишків хлорамфеніколу та нітрофуранів у меді згідно виконання плану державного моніторингу за 2012–2017 рр. Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин: щорічна науково-практична конференція молодих вчених, м. Київ, 19 липня 2018 року: тези доповіді. К., 2018. С. 70–71. *(Здобувачем проведено аналіз державного моніторингу та підготовлено матеріали до друку).*

13. Ткачук С. А., Мягка К. С. Фізико-хімічні показники меду липового за різних способів обробки бджолиних сімей хлорамфеніколом. Сучасні тенденції ветеринарної освіти та науки: Всеукраїнська науково-практична конференція, присвячена 100-річчю факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ, 09 жовтня 2019 року: тези доповіді. К., 2019. С. 192–193. *(Здобувачем проведено фізико-хімічні дослідження меду, здійснено їх аналіз, підготовлено матеріали до друку).*

АНОТАЦІЯ

Мягка К. С. Науково-експериментальне обґрунтування контролю безпечності та якості меду натурального за залишковою кількістю антибіотиків. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.09 «Ветеринарно-санітарна експертиза». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2020.

У дисертації представлено науково-експериментальне обґрунтування контролю за вмістом залишків антибіотиків хлорамфеніколу, флорфеніколу, неоміцину та нітрофурану (АОЗ) у меді натуральному.

Вперше визначено та надано аналіз з 2012 до 2017 р. вмісту в меді натуральному двох груп речовин – А6 та В1 (антимікробні речовини) – і валідовано межі їх виявлення.

За аналізом розповсюдження бактеріальних хвороб бджіл встановлено, що вони реєструються в 11 регіонах України.

Встановлено придатність скринінг-методу імуноферментного аналізу для визначення залишкових кількостей нітрофурану (АОЗ), хлорамфеніколу, неоміцину та флорфеніколу у зразках меду натурального із наданням валідаційних характеристик.

Удосконалено метод імуноферментного аналізу щодо ідентифікації флорфеніколу в меді шляхом використання води дистильованої та за екстракції етилацетату отримано точність оцінки результатів високого відсотка повернення (96,5 %) флорфеніколу у меді, що забезпечило високу ефективність випробувань.

Динаміка фізико-хімічних показників меду з липи залежить від способу обробки бджолиних сімей антибіотиками, що підтверджується наявністю статистично значимої різниці між отриманими показниками на 10 добу та впродовж зберігання через 30 та 120 діб. Водночас зразки меду, що досліджувалися за органолептичними та фізико-хімічними показниками, відповідали вимогам ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральний. Технічні умови», окрім масової частки води та масової частки сахарози за згодовування сиропу, порівнюючи як із аерозольною обробкою бджолосімей, так і з контрольною групою.

Вміст залишкової кількості антибіотиків у меді з липи через 10 діб і після зберігання (30 та 120 діб) за температури 25 °С у темному місці вірогідно

вищий під час згодовування сиропу, ніж за аерозольної обробки бджолиних сімей.

Через 120 діб зберігання меду з липи вірогідно зменшився на 15,4 % ($p \leq 0,05$) вміст хлорамфеніколу за аерозольної обробки та флорфеніколу – на 13,6 % ($p \leq 0,05$) за згодовування сиропу. Зберігання меду з липи впродовж 4 місяців не впливає на наявність у ньому залишкових кількостей антибіотиків.

Ключові слова: мед натуральний, нітрофуран (АОЗ), хлорамфенікол, неоміцин, флорфенікол, удосконалений спосіб, залишкові кількості антибіотиків, фізико-хімічні показники, способи обробки.

АННОТАЦІЯ

Мягкая Е. С. Научно-экспериментальное обоснование контроля безопасности и качества меда натурального за остаточным количеством антибиотиков. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.09 «Ветеринарно-санитарная экспертиза». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2020.

В диссертации представлено научно-экспериментальное обоснование контроля за содержанием остатков антибиотиков хлорамфеникола, флорфеникола, неомицина и нитрофурана (АОЗ) в меде натуральном.

Впервые подан анализ с 2012 по 2017 г. содержания в меде натуральном двух групп веществ – А6 и В1 (антимикробные вещества) и валидированы пределы их обнаружения.

В 2012 г. в одном образце обнаружены остатки нитрофурана (АОЗ), что составляет 5 % от общего количества образцов, которые были исследованы, а также в семи образцах обнаружены остатки сульфаметазин, что составляет 4,7 %. В 2013 г. выявлены два образца с содержанием хлорамфеникола и один образец с содержанием нитрофурана (SEM), что составляет по 5 % от всех исследуемых образцов. В 2016 г. установлен положительный результат в одном образце меда (выявлены нитрофураны (АМОЗ), что составляет 6,7 % от всех исследуемых образцов. В 2017 г. выявлен один положительный результат с содержанием хлорамфеникола, что составляет 5 % от всех образцов, которые исследовались. В 2018 г. положительный результат установлен в одном образце меда по содержанию флорфеникола, что составляло 8,3 % от всех исследуемых образцов.

За проведенным анализом распространения бактериальных болезней пчел, установлено, что они регистрируются в 11 регионах Украины. Впервые, по результатам ветеринарной отчетности по исследованию пчелиного расплода (куколок), установлено, что больше всего положительных результатов получено при выявлении возбудителя американского гнильца (*Paenibacillus Larvae*) в 2013 г., – 279 положительных результатов, в 2014 г. – 7, в 2015 г. – 4, в 2016 г. – 3 и в 2017 г. – 7 положительных результатов.

Анализ отчетной документации о наличии возбудителя европейского гнильца (*Melissococcus plutonius*) на территории Украины показал, что в 2013 г. количество положительных образцов составляло 2, в 2014 г. – 4, в 2015 г. – 3, в 2016 г. – 4 и в 2017 г. – 3 образца от общего количества образцов, которые исследовались.

По выявлению микроорганизмов парагнильца (*Bacillus Paraalvei*) положительные результаты были установлены в 2015 г. – 2 образца, в 2016 г. – 2, в 2017 г. – один образец. В 2014 и 2017 гг. был обнаружен один положительный образец с колибактериозом пчел. Сальмонеллез пчел был обнаружен в 2014 г. в одном образце, в 2017 году – в 2 образцах. В 2015–2016 гг. возбудителя септицемии обнаружено в 2 и 5 образцах соответственно.

Установлена пригодность скрининг-метода иммуноферментного анализа для определения остаточных количеств нитрофурана (АОЗ), хлорамфеникола, неомицина и флорфеникола в образцах меда натурального с предоставлением валидационных характеристик для хлорамфеникола, таких как: способность обнаружения составляет – 0,05 мкг/кг и уровень отсекаемого этого теста – 0,048 мкг/кг; нитрофурана (АОЗ): способность обнаружения – 0,4 мкг/кг и уровень отсекаемого этого теста – 0,401 мкг/кг; неомицина: способность обнаружения (по данному скрининг-методу составляет 30,0 мкг/кг), уровень отсекаемого – 25,7 мкг/кг. Наименьшее содержание неомицина составляет 15,63 мкг/кг; флорфеникола: способность обнаружения – 5,0 мкг/кг, уровень отсекаемого – 3,16 мкг/кг. Наименьший уровень определения содержания флорфеникола составляет 0,2 мкг/кг.

Усовершенствован метод иммуноферментного анализа по идентификации флорфеникола в меде за счет использования воды дистиллированной и экстракции этилацетатом, что позволило получить высокий процент (96,5 %) возврата флорфеникола в меде и обеспечило высокую эффективность испытаний.

Динамика физико-химических показателей липового меда зависит от способа обработки пчелиных семей антибиотиками, что подтверждается наличием статистически значимой разницы между полученными показателями на 10 сутки и в течение хранения через 30 и 120 суток. В то же время, образцы меда, которые исследовались, по органолептическим и физико-химическим показателям отвечали требованиям ДСТУ 4497:2005 «Мед натуральный. Технические условия», кроме массовой доли воды и массовой доли сахарозы при скормливании пчелам сиропа, в сравнении как с аэрозольной обработкой пчелиных семей, так и контрольной группой.

Так, показатели массовой доли воды при скормливании сиропа с 0,1 % раствором флорфеникола, неомицина, хлорамфеникола и нитрофурана (АОЗ) не соответствовали требованиям действующего национального стандарта и составили: 21,97±0,03 %, 24,16±0,08, 21,96±0,26, 24,16±0,08 % соответственно; на 30 сутки: 22,20±0,11 %, 24,13±0,06, 22,13±0,14, 24,26±0,06 % соответственно; на 120 сутки: 22,23±0,08 %, 24,00±0,11, 22,26±0,06, 24,40±0,05 % соответственно.

Установлено, что показатели массовой доли сахарозы при скармливании сиропа с исследуемыми антибиотиками не соответствовали действующему национальному стандарту. Так, на 10 сутки после скармливания сиропа с 0,1 % раствором флорфеникола, неомицина, хлорамфеникола и нитрофурана (АОЗ) массовая доля сахарозы в липовом меде уменьшалась по сравнению с контрольной группой ($9,17 \pm 0,13$ %) и составила: $8,23 \pm 0,09$ %, $8,23 \pm 0,09$, $6,16 \pm 0,08$, $8,50 \pm 0,25$ % соответственно; на 30 сутки – была выше по сравнению с контрольной группой ($3,63 \pm 0,12$ %) и составила: $6,23 \pm 0,17$ %, $6,08 \pm 0,11$, $6,13 \pm 0,14$, $8,56 \pm 0,08$ % соответственно; на 120 сутки хранения липового меда – была выше по сравнению с контрольной группой ($3,73 \pm 0,09$ %) и составила: $6,10 \pm 0,17$ %, $5,93 \pm 0,07$, $6,10 \pm 0,15$, $8,46 \pm 0,20$ % соответственно.

Вместе с тем, только на 10 сутки после аэрозольной обработки пчел 0,1 % раствором флорфеникола и неомицина показатели массовой доли сахарозы в меде из липы не соответствовали требованиям действующего национального стандарта и составили $8,00 \pm 0,15$ и $8,00 \pm 0,15$ % соответственно, хотя и уменьшались по сравнению с показателем в контрольной группе ($9,17 \pm 0,13$ %).

Содержание остаточного количества антибиотиков в липовом меде через 10 суток и после хранения (30 и 120 суток) при температуре 25 °С в темном месте достоверно выше при скармливании сиропа, чем при аэрозольной обработке пчелиных семей.

Через 120 суток хранения липового меда достоверно уменьшилось на 15,4 % ($p \leq 0,05$) содержание хлорамфеникола после аэрозольной обработки и флорфеникола на 13,6 % ($p \leq 0,05$) при скармливании сиропа. Хранение липового меда в течении 4 месяцев не влияет на наличие в нем остаточных количеств антибиотиков.

Ключевые слова: мед натуральный, нитрофуран (АОЗ), хлорамфеникол, неомицин, флорфеникол, усовершенствованный способ, остаточные количества антибиотиков, физико-химические показатели, способы обработки.

ANNOTATION

Myagka K. S. Scientific and Experimental Justification for Control the Safety and Quality of Natural Honey for the Residual Amount of Antibiotics – The Manuscript.

Dissertation for Candidate of Veterinary Science Degree in Specialty 16.00.09 «Veterinary and Sanitary Expertise». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kiev, 2020.

The dissertation presents the scientific and experimental substantiation of the control over the content of antibiotic residues chloramphenicol, florfenicol, neomycin and nitrofurantoin (AOZ) in natural honey.

Analysis for the first time from 2012 to 2018 of the content of natural honey in two groups of substances – A6 and B1 (antimicrobial substances) and validated the limits of their detection.

According to an analysis of the spread of bacterial diseases of bees, it is established that they are registered in 11 regions of Ukraine.

The suitability of the enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of residues of nitrofurantoin (AOZ), chloramphenicol, neomycin and florfenicol in natural honey samples with validation characteristics has been established.

Enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of florfenicol in honey was improved by using distilled water and ethyl acetate extraction to obtain accurate estimates of the high percent return (96.5 %) of florfenicol in honey, which provided high test efficiency.

The dynamics of physico-chemical indicators of linden honey depend on the method of treatment of bee families with antibiotics, which is confirmed by the presence of statistically significant difference between the obtained values for 10 days and during storage after 30 and 120 days. At the same time, honey samples tested for organoleptic and physico-chemical parameters met the requirements of DSTU 4497:2005 «Natural honey. Specifications», except for the mass fraction of water and the mass fraction of sucrose for feeding the syrup compared to the aerosol treatment of bee families and the control group.

The residual antibiotic content of linden honey after 10 days, and after storage (30 and 120 days) at 25 °C in a dark place, is probably higher for syrup feeding than for aerosol treatment of bee families.

After 120 days, the storage of linden honey significantly ($p \leq 0.05$) decreased by 15.4 % the content of chloramphenicol for aerosol treatment and florfenicol – ($p \leq 0.05$) by 13.6 % for the syrup feeding. Storage of linden honey for 4 months does not affect the presence of antibiotic residues in it.

Key words: natural honey, nitrofurantoin (AOZ), chloramphenicol, neomycin, florfenicol, advanced method, antibiotic residues, physico-chemical parameters, processing methods.

Підписано до друку 15.09.2020 р. Формат 60x84\16
Ум. друк. арк. 0,9. Обл.-вид.арк. 0,9
Наклад 100 прим. Зам. № 200480

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, тел.: 527-81-55
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4097 від 17.06.2011

