

NEGATIVNI UČINKI SREBROVIH NANODELCEV NA KRANJSKO ČEBELO

GLAVAN, Gordana¹; DROBNE, Damjana¹; KOS Monika^{1,2}; Janko BOŽIČ¹; JEMEC KOKALJ, Anita¹

Izvleček

Nosema je eden izmed vzrokov za umiranje čebeljih družin. V zadnjem času je bila ugotovljena možnost zdravljenja nosema-vosti s koloidnim srebrom, ki vsebuje tudi srebrove nanodelce (Ag-ND). Po drugi strani pa raziskave kažejo na negativne učinke Ag-ND na organizme, učinki Ag-ND pa na čebele niso raziskani. V tej študiji smo raziskali vpliv kroničnega 9-dnevnega uživanja Ag-ND v 1,5 M saharozni raztopini na preživetje čebel in na njihovo prehranjevanje. Z akutnim 24-urnim testom izbire med saharozno raztopino in saharozno raztopino, ki je vsebovala različne koncentracije Ag-ND, pa smo ugotavljali ali čebele raje izbirajo ali zavračajo določene koncentracije Ag-ND. Čebele smo tekom poskusov hranili s saharozno raztopino, ki je vsebovala različne koncentracije Ag-ND (2, 10, 50, 250 in 500 mg L⁻¹). Ker disperzije Ag-ND poleg delcev vsebujejo tudi znatno količino srebrovih ionov, smo enake poskuse naredili tudi z različnimi koncentracijami raztopine srebrovega nitrata (AgNO₃). Ugotovili smo, da je uživanje saharoznih raztopin, ki so vsebovale Ag-ND (500 mg L⁻¹) ali AgNO₃ (250 mg L⁻¹), po 9 dneh povzročilo postopno umiranje čebel. Ugotovili smo tudi zmanjšano stopnjo prehranjevanja, ki je bila verjetno odraz negativnih učinkov Ag-ND in AgNO₃ na zdravje čebel. Učinki na umrljivost ter prehranjevanje so se pri tretiranju z AgNO₃ pokazali že pri nižjih koncentracijah v primerjavi z Ag-ND, zato je raztopina srebrove soli za čebele bolj strupena. Z izbirnimi testi smo pokazali, da čebele raje izbirajo saharozno raztopino v primerjavi z raztopino, ki je vsebovala Ag-ND ali AgNO₃, kar pomeni, da so čebele sposobne zaznavati spremenjene lastnosti saharozne raztopine, kaj dejansko zaznavajo pa je potrebno nadaljnje raziskati. Testirane koncentracije v tej študiji so bile višje, kot jih poročajo proizvajalci koloidnega srebra, ki je v prosti prodaji. Kljub temu je naša raziskava pokazala na možne negativne posledice pri uporabi koloidnega srebra pri morebitnem zdravljenju bolezni čebel. Komercialni pripravki s koloidnim srebrom, za katere so značilne pomanjkljive deklaracije, velikokrat vsebujejo pretežno srebrove ione. Ugotavljamo, da lahko nenamenska uporaba takšnih pripravkov, ki niso registrirani za zdravljenje čebel, potencialno ogroža čebele.

Ključne besede: koloidno srebro, srebrovi nanodelci, srebrov nitrat, kranjska čebela, smrtnost, prehranjevanje

NEGATIVE IMPACTS OF SILVER NANOPARTICLES ON CARNOLIAN HONEY BEE

Abstract

Nosema is one of the reasons for bee colony death. Recently, the possibility of treating nosemosis using colloidal silver was suggested, which contains silver nanoparticles (Ag-NPs). On the other hand, research shows the negative effects of Ag-NPs on organisms, but the effects of Ag-NPs on bees have not been elucidated. In this study we evaluated the effects of oral chronic 9-day administration of Ag-NPs in a sucrose solution on the survival and feeding of bees. We also performed an acute 24-hour test of the choice between sucrose solution and a sucrose solution containing various concentrations of Ag-NPs to determine whether the bees preferred or rejected certain concentrations of Ag-NPs. During the experiments the bees were fed with a sucrose solution containing various concentrations of Ag-NPs (2, 10, 50, 250, and 500 mg L⁻¹). In addition, it is known that the Ag-NPs dispersions may contain also a considerable amount of silver ions, therefore the same experiments were done with various concentrations of silver nitrate solution (AgNO₃). We found that the consequence of feeding with Ag-NPs (500 mg L⁻¹) or AgNO₃ (250 mg L⁻¹) solutions is gradual dying of bees. We also found a reduced level of feeding, which is probably

¹ Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenija

² Raziskovalna enota, Biotehniški center Naklo, Strahinj 99, 4202 Naklo

a reflection of the negative effects of Ag-NPs or AgNO₃ on bee's health. Effects on mortality and feeding have been shown in treatment with AgNO₃ at lower concentrations compared to Ag-NPs, which is why the solution of silver nitrate was more toxic for bees. We have also shown that bees preferred to choose a sucrose solution compared to a solution containing Ag-NPs or AgNO₃, which means that the bees were able to detect altered sucrose solution. Whether they indeed sensed silver, remains to be investigated in the future. Our test concentrations were higher as those reported in colloidal silver formulations available on the market. Nevertheless, our study has shown the possible negative consequences of using colloidal silver in the potential treatment of bee diseases. Commercial colloidal silver products, frequently equipped by inadequate declarations, often contain predominantly silver ions. We conclude that the unintentional use of such preparations that are not registered for the treatment of bees potentially threaten bees.

Key words: colloidal silver, silver nanoparticles, silver nitrate, Carniolan honey bee, mortality, feeding



UVOD

K umiranju družin medonosnih čebel prispeva veliko dejavnikov, raziskovalci najbolj izpostavljajo okužbe z različnimi virusi, nosemo (*Nosema apis*, *N. ceranae*), varjo (*Varroa destructor*), uporabo pesticidov, izgubo habitatov in upad genetske raznovrstnosti (Neumann in Carreck, 2010). Zdravljenje različnih bolezni čebel se je izkazalo za zahtevno in temelji predvsem na uporabi različnih sintetičnih snovi kot so npr. akaricidi, ki so lahko za čebele škodljivi, njihove ostanke pa lahko najdemo v medu, vosku in cvetnem prahu (Imdorf in sod., 1999). Zato v zadnjem času čebelarji iščejo alternativna sredstva, ki bi bila učinkovita, vendar za čebele neškodljiva.

Nekateri raziskovalci so predlagali, da je koloidno srebro ena izmed potencialnih snovi s protimikrobnimi lastnostmi za zdravljenje bolezni čebel (Khan in sod., 2018). Pripravki koloidnega srebra, ki so na voljo na trgu, načeloma predstavljajo vodno disperzijo srebrovih delcev različnih velikosti (mikro in nano) in srebrovih ionov (Silver Colloids, <http://www.silver-colloids.com/>). Velikokrat pa zaradi cenejše proizvodnje kot koloidno srebro prodajajo raztopine, ki vsebujejo visok odstotek (do 90 %) srebrovih ionov, manjši delež pa predstavljajo srebrovi delci. V raziskavah vpliva koloidnega srebra na organizme se zaradi lažje razlage rezultatov večinoma uporabljajo disperzije definiranih velikosti srebrovih delcev, ki so v glavnem manjši od 100 nm in jih zato imenujemo nanodelci (Ag-ND).

Avtorji Borsuk in sod. (2013) so pokazali, da je nosema-vost mogoče zdraviti z uporabo Ag-ND. Čebele so hranili s sladkorno raztopino, ki je vsebovala 25 mg L⁻¹ Ag-ND, zaradi česar se je v njihovih prebavilih močno zmanjšalo število spor noseme (*Nosema spp.*). Kljub temu avtorji iste raziskave svetujejo previdnost pri uporabi pripravkov z Ag-ND, saj so pokazali tudi krajše preživetje čebel ter kopičenje srebra v čebelah. V neki drugi raziskavi pa so pokazali, da je oralna izpostavitve čebel *Apis cerana* srebrovim ionom v panjih, ki so bile predhodno okužene z virusom KSBV (Korejski virus mešičkaste zalege), povečala njihovo preživetje (Ahn in sod., 2015). Biocidne lastnosti Ag-ND pa so bile pokazane tudi proti povzročiteljem hude gnilobe pri čebelah (*Paenibacillus larvae* in *Paenibacillus alvei*) (Culha in sod., 2017).

Danes je na voljo veliko število raziskav, kjer so dokazali škodljive vplive Ag-ND na organizme (Ivask in sod., 2014). Hkrati pa obstaja več spletnih strani in spletnih forumov, kjer čebelarjem laično promovirajo uporabo koloidnega srebra za zdravljenje čebel. Zato je bil namen naše raziskave ugotoviti vpliv oralne kronične izpostavitve različnih koncentracij Ag-ND na kranjsko čebelo *Apis mellifera carnica*. V prvem delu raziskave smo ugotavljali preživetje in stopnjo prehranjevanja čebel. V drugem delu

raziskave pa nas je zanimalo, ali čebele zaznavajo srebro v saharozni disperziji Ag-ND, pri čemer smo naredili test izbire. Pri tem testu so imele čebele možnost izbire med saharozno raztopino ter saharozno raztopino, ki je vsebovala različne koncentracije Ag-ND. Ugotavljali smo ali čebele raje izbirajo ali zavračajo določene koncentracije Ag-ND. Ker disperzije Ag-ND vsebujejo poleg delcev tudi znatno količino srebrovih ionov (v našem primeru kar cca. 50%), smo naredili poskuse tudi z raztopinami srebrove soli brez dodanih Ag-ND, za kar smo uporabili različne koncentracije raztopine AgNO₃, da bi ugotovili prispevek srebrovih ionov k morebitnim opaženim učinkom na čebele.

MATERIAL IN METODE

Srebrovi nanodelci in AgNO₃

Poskuse smo izvedli s srebrovimi nanodelci (Ag-ND) (proizvajalec Colorobbia S.p.A., Italija). Koncentracija celokupnega Ag v disperziji Ag-ND je bila 41.14 g L⁻¹, delež Ag⁺ zvrsti pa 46-68 % (Jemec in sod., 2016). Nanodelci Ag-ND so bili stabilizirani s polimerom polivinilpirolidonom (PVP), kar omogoča njihovo večjo stabilnost v disperziji. Ločenih testov s stabilizatorjem PVP nismo naredili, saj sta bili vrsta in koncentracija PVP v disperziji Ag-ND zaupna podatka proizvajalca in ju nismo poznali (Jemec in sod., 2016). Velikost delcev pomerjenih v prahu je bila 21±8 nm (presevna elektronska mikroskopija), v saharozni raztopini pa v območju 332-994 nm (hidrodinamski radij je bil odvisen od testne koncentracije). Vzporredno smo proučevali tudi srebrovo sol (AgNO₃) (Sigma-Aldrich, Nemčija).

Disperzijo Ag-ND smo pred poskusom premešali s 5 min močnim stresanjem (pri 3000 rpm, IKA Vortex 4 basic, IKA, Nemčija) brez dodatnega soniciranja in jo pripravili v 1,5 M raztopini saharoze z najvišjo izpostavitveno koncentracijo 500 mg L⁻¹ (celokupna konc. Ag). To je bila izhodiščna raztopina za pripravo ostalih koncentracij: 2, 10, 50 in 250 mg Ag-ND L⁻¹. V primeru AgNO₃ so bile koncentracije Ag: 2, 10, 50, 250 in 500 mg Ag L⁻¹. Kontrolna skupina čebel je bila hranjena samo z raztopino saharoze.

Poskusi s čebelami

Delavke kranjske sivke *Apis mellifera carnica* (Pollman, 1879) smo nabrali v čebelnjaku Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani pozno pomladi (maj). Nabrali smo jih zjutraj na dan poskusa na zgornjih letvicah satov nakladnega panja z uporabo aspiratorja. Nabrane čebele smo naključno razporejali v pripravljene lesene kletke z jekleno mrežico na eni in premičnim

steklom na drugi strani. V kletko sta bili vstavljeni dve brizgi, kjer smo čebelarom ponudili saharozno raztopino in deklorirano vodo. Med nabiranjem smo čebelarom v kletkah ponudili vodo in saharozo (1,5 M) *ad libitum*. Po nabiranju smo kletke s čebelarom za 2 h postavili v inkubator (34 °C, 60±5 % RH) in jim ponudili le deklorirano vodo. Izvedli smo dva tipa poskusov: (i) akutni 24 h poskus z izbiro hrane in (ii) kronični 9-dnevni prehranjevalni poskus. S 24-h akutnim prehranjevalnim testom z izbiro hrane smo preverili sposobnost zaznave, preference ali izogibanja testni kemikaliji v hrani. V ta namen smo uporabili polietilenske posodice (9 x 7 x 7 cm; d x š x v) s pokrovom. V testno posodo so bile vstavljene tri brizge, v katerih smo čebelarom ponudili deklorirano vodo in hrano *ad libitum*. Dno smo prekrili s celuloznim filtrirnim papirjem. Čebelarom smo sočasno ponudili hrano v dveh stranskih brizgah; v eni brizgi je bila raztopina saharoze (kontrolna hrana), v drugi brizgi pa raztopino 1,5 M saharoze z Ag-ND ali AgNO₃. Pripravili smo 6 testnih parov: "0-0", "0-2", "0-10", "0-50", "0-250" in "0-500" mg L⁻¹. Za vsak tretma smo pripravili tri testne posodice, v vsaki je bilo 10 čebel. Poskuse smo vzdrževali v inkubatorju pod enakimi pogoji kot kronične teste. Po 24 h smo testne posodice natančno pregledali, prešteli poginule čebele in določili količino pojedene hrane v vsaki brizgi.

Prehranjevalni kronični poskus smo naredili kot smo že poročali v Kos in sod. (2018). Za vsako koncentracijo (Ag-ND ali AgNO₃; 0, 2, 10, 50, 250 in 500 mg L⁻¹) testne raztopine smo pripravili kletko z 20-28 čebelarom. Vsakih 24 h smo hrano zamenjali in stekali pojedeno hrano. Dnevno smo opazovali preživetje čebel in odstranjevali mrtve čebele. Poskus je trajal 9 dni.

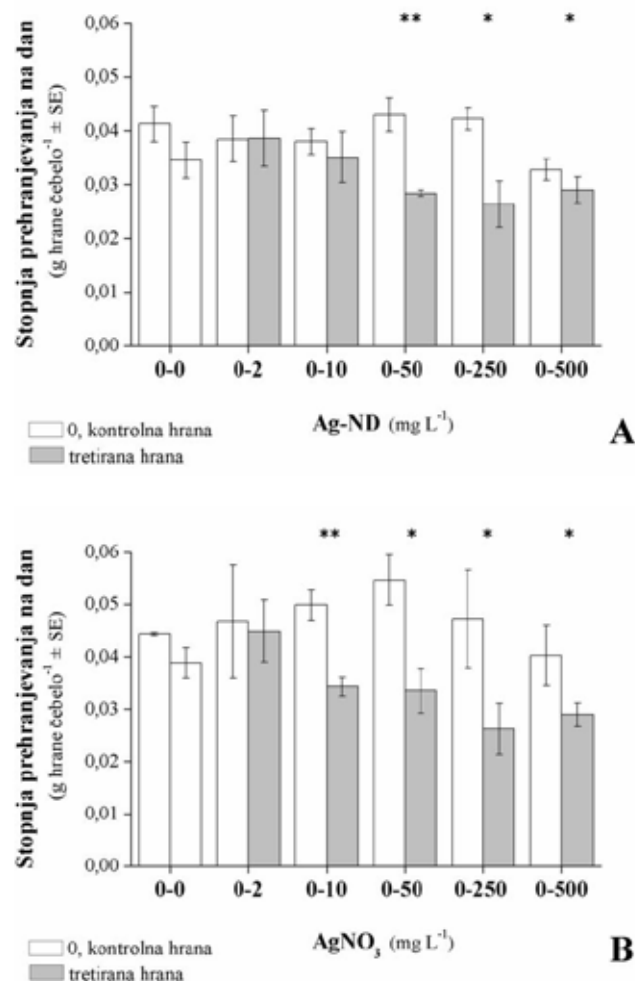
REZULTATI Z RAZPRAVO

Akutni 24 h poskus z izbiro hrane

Ugotovili smo, da čebele v obeh primerih, pri Ag-ND in AgNO₃, raje izbirajo saharozno raztopino v primerjavi z raztopino, ki vsebuje Ag-ND ali AgNO₃. V primeru Ag-ND smo očitno izbiro kontrolne hrane oziroma izogib disperziji Ag-ND v saharozni raztopini opazili v primeru 50, 250 in 500 mg L⁻¹; pri AgNO₃ pa že od koncentracije 10 mg L⁻¹ dalje (Slika 1). Med 24-urnim poskusom čebele niso umirale.

Večji izogib AgNO₃ v primerjavi z Ag-ND lahko pripišemo različnemu deležu Ag⁺-ionskih zvrsti v saharoznih raztopinah z AgNO₃. Namreč v primeru AgNO₃ pričakujemo, da se je v raztopini saharoze raztopila vsa sol in je zato vso srebro v ionski obliki. V primeru disperzij Ag-ND pa je delež Ag⁺-ionskih zvrsti 46-48 %. To pomeni, da je v tretmaju z isto koncentracijo Ag v primeru AgNO₃

koncentracija Ag⁺-ionskih zvrsti približno dvakrat večja kot v primeru Ag-ND (Preglednica 1).



Slika 1. Rezultati 24 h poskusa z izbiro hrane. Grafikona prikazujeta količino zaužite saharozne raztopine brez (beli stolpci, kontrolna hrana) ali z dodatkom Ag-ND (A) ali AgNO₃ (B) (sivi stolpci, tretirana hrana). Prikazani sta srednja vrednost in standardna napaka (3 vrednosti za vsak tretma). Zvezdice označujejo statistično razliko v primerjavi s kontrolo ($p < 0.05$).

Da se čebele lahko izogibajo hrani z Ag-ND ali AgNO₃, morajo imeti sposobnost zaznave srebra v raztopinah. Po vsej verjetnosti zaznavajo prisotnost srebrovih ionov, vendar tega s fiziološkimi študijami pri čebelarom še niso pokazali. V podobnem poskusu smo Glavan in sod. (2017) pokazali, da so imele čebele raje saharozno raztopino, ki je vsebovala ZnO-ND (in je vsebovala tudi cinkove ionske zvrsti) v primerjavi s čisto saharozno raztopino. Z dodatnimi poskusi smo ugotovili, da po vsej verjetnosti čebele zaznavajo cinkove ionske zvrsti v saharoznih raztopinah (neobjavljeni rezultati). Iwasaki in Sato (1984) ter Keast in sod. (2004) so ugotovili, da ioni nekaterih kovin, kot so cink, baker, kobalt in mangan, inhibirajo zaznavanje

sladkosti saharozne raztopine z moduliranjem delovanja gustatornih receptorjev za sladko. V primeru, da je učinek Ag^+ -ionskih zvrsti na zaznavanje sladkosti podobno inhibitoren, lahko tako razložimo, zakaj so čebele raje posegale po čisti saharozni raztopini, vendar bo to potrebno še eksperimentalno dokazati. Možno pa je tudi, da je izogib srebru posledica učinkov srebrovih ionov na druge fiziološke procese.

Smrtnost v kroničnem poskusu

Smrtnost čebel v kontrolni skupini je bila v obeh poskusih (Ag-ND in AgNO_3) ob koncu 9-dnevne izpostavitve nižja od 15 %, kar je skladno s priporočili v OECD (2016) glede veljavnosti testa. Smrtnost je bila v primeru obeh testnih kemikalij koncentracijsko odvisna, saj je naraščala z naraščajočo koncentracijo Ag-ND ali AgNO_3 v hrani. Smrtnost je bila višja v primeru AgNO_3 , saj so že pri koncentraciji 250 mg Ag L^{-1} poginile vse čebele in je bila tako smrtnost 100%. V tretmajih z Ag-ND pa smo najvišjo smrtnost čebel 34,78% zabeležili pri koncentraciji 500 mg Ag-ND L^{-1} (Preglednica 1).

*Preglednica 1: Smrtnost (v %) čebel *Apis mellifera carnica* v 9-dnevem kroničnem prehranjevalnem testu s hrano, onesnaženo z nanodelci srebra (Ag-ND) ali srebrovo soljo (AgNO_3). Podane so nominalne koncentracije Ag-ND ali Ag iz AgNO_3 in izmerjene koncentracije Ag^+ -zvrsti v disperziji Ag-ND (mg L^{-1}).*

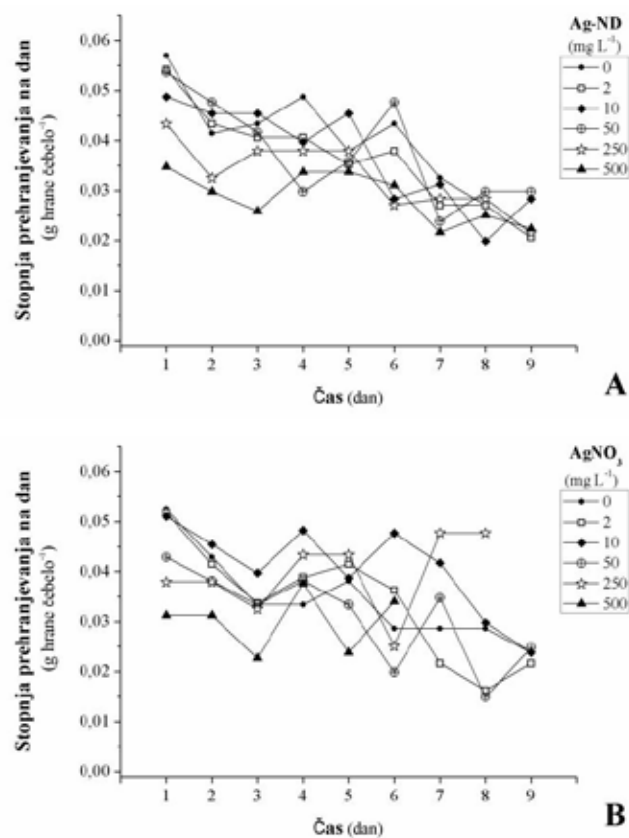
Poskusna snov (mg L^{-1})	Število čebel/skupino	Število mrtvih čebel/skupino	Smrtnost (%)
Ag-ND (konc. Ag^+ zvrsti)			
0	22	0	0,00
2 (0.95)	22	0	0,00
10 (5.16)	21	0	0,00
50 (27.57)	20	0	0,00
250 (108.47)	22	1	4,55
500 (192.67)	23	8	34,78
Ag iz AgNO_3			
0	25	0	0,00
2	23	2	8,70
10	21	1	4,76
50	25	1	4,00
250	22	22	100 (9. dan)
500	20	20	100 (6. dan)

Glede na podatke v literaturi je znano, da večinski delež vpliva Ag-ND na organizme lahko pripišemo delovanju Ag^+ , le majhen delež pa delovanju delcev samih (Jemec in sod., 2016). Zato podobno kot v primeru akutnega testa

lahko razliko v opaženem učinku med Ag-ND in AgNO_3 pripišemo deležu Ag^+ -zvrsti v posamezni testni snovi. Naši rezultati preživetja (100% preživetje do 50 mg/L) so primerljivi z raziskavo vpliva Ag-ND na čebele, kjer so ugotovili, da je bilo po 11 dneh tretiranja z 25 mg Ag-ND L^{-1} preživetje čebel 75 % (Borsuk in sod., 2013). Vendar pa so direktne primerjave med študijami z Ag-ND težke, saj avtorji ne podajajo podatka o koncentraciji prostih Ag^+ . Drugih podobnih raziskav v zvezi s preživetjem po tretiranju z Ag-ND ali AgNO_3 na čebelah po našem vedenju še ni bilo objavljenih.

Stopnja prehranjevanja v kroničnem poskusu

Rezultate prehranjevanja smo podali kot količino zaužite hrane na živo čebelo na dan (zaužite hrane/živo čebelo/dan), kar je najbolj točen način glede na sprotne umiranje čebel med poskusom. Opazili smo, da so čebele v obeh primerih; t.j. Ag-ND ali AgNO_3 , tekom poskusa postopoma zmanjševale količino zaužite hrane. Zmanjševanje stopnje prehranjevanja je bila v obeh primerih zelo podobna (Slika 2). V primeru Ag-ND smo izračunali tudi kumulativno količino hrane zaužite v 9 dneh podano na



Slika 2. Rezultati prehranjevanja v 9-dnevem kroničnem poskusu s čebelami *Apis mellifera carnica*. Prikazana je količina zaužite hrane/dan/živo čebelo v primeru Ag-ND (A) ali AgNO_3 (B). Prikazane so srednje vrednosti.

žive čebele. Ugotovili smo, da je prehranjevanje po 9 dneh statistično značilno manjše (t-test, $p < 0,05$) od kontrole pri najvišjih dveh tretmajih, t.j. za 16% in 27% pri 250 in 500 mg L⁻¹, v istem vrstnem redu. V primeru AgNO₃ pa je bil izračun kumulativno zaužite hrane nerealen zaradi večjega sprotnega umiranja čebel, zato ga tu ne podajamo. Zmanjšana stopnja prehranjevanja je lahko odraz negativnih učinkov Ag-ND in AgNO₃ na zdravje čebel.

Primerjava naših rezultatov s koncentracijami srebra v okolju ter v pripravkih koloidnega srebra na tržišču

Trenutno pričakovane okoljske koncentracije Ag-ND, ocenjene na podlagi trenutnih trendov proizvodnje in uporabe, so zelo nizke (Gottschalk in sod., 2015). Ocenjuje se namreč, da je koncentracija Ag-ND v izpuhkih iz čistilnih naprav v območju med 0,01 in 60 ng L⁻¹, največja pa v aktivnem blatu, in sicer 4-250 µg kg⁻¹. V primeru čebelje paše ne pričakujemo tako visokih koncentracij Ag-ND kot smo jih uporabili v tej študiji. V tej študiji smo izbrali zelo visoke koncentracije, saj smo želeli ugotoviti, pri katerih tretmajih opazimo kvarne učinke, poleg tega nas je

zanimala primerjava s koloidnim srebrom, ki je v prosti prodaji.

Na tržišču je trenutno zelo veliko različnih proizvodov, ki vsebujejo koloidno srebro in se oglašujejo za vsestransko uporabo. Koncentracija koloidnega srebra, ki jih navajajo proizvajalci, se gibljejo v območju 10-40 mg L⁻¹ (vir www.amazon.com; proizvajalci Kolloidaes Silber Argentum200; Silver 25, VivoITA; Healthyody inc.; Kaiame Naturals Colloidal Silver; Organa; NutriNoche). Vendar pa iz deklaracij ni jasno, ali gre za koncentracije Ag delcev ali Ag⁺ ionov. Tudi velikost delcev ter stabilizatorji navadno niso podani, tako ni jasno ali gre za nanodelce ali njihove precej večje agregate. Poleg tega nismo uspeli pridobiti podatkov o tem, če in katere koloidne pripravke pri nas uporabljajo čebelarji. Če upoštevamo koncentracije srebra v koloidnem srebrom, ki je v prosti prodaji, lahko glede na naše rezultate zaključimo, da se negativni učinki na čebele pokažejo pri 10x višjih koncentracijah. Poudariti je potrebno, da to velja za 9-dnevno tretiranje čebel, podaljševanje izpostavitve pa zelo verjetno še poveča smrtnost pri čebelah.

ZAKLJUČEK

V raziskavi smo ugotovili, da je 9-dnevno kronično hranjenje čebel s saharozno raztopino, ki vsebuje Ag-ND, škodljivo za čebele pri koncentraciji 500 mg Ag-ND L⁻¹, pri AgNO₃ pa v primeru 250 mg Ag L⁻¹. Pri tem smo ugotovili tudi zmanjšano stopnjo prehranjevanja, ki je verjetno odraz negativnih učinkov Ag-ND ali AgNO₃ na zdravje čebel. Pokazali smo tudi, da čebele raje izbirajo saharozno raztopino v primerjavi s saharozno raztopino, ki vsebuje Ag-ND ali AgNO₃, za AgNO₃ je bilo tako vedenje opaženo že pri nižjih koncentracijah. To pomeni, da so čebele sposobne zaznavati srebro, verjetno srebrove ione, v raztopini saharoze. V preliminarinih poskusih smo ugotovili tudi vplive Ag-ND na aktivnost encima, ki je vpleten v delovanje živčevja (acetilholinesteraze; AChE) in na aktivnost encima za razstrupljanje glutathion S-transferaze (GST) (neobjavljeni rezultati). Aktivnost encima GST, ki

je pokazatelj zastrupitve, je bila povišana že pri najnižji koncentraciji Ag-ND. Aktivnost encima AChE v glavah čebel je bila povišana pri vseh izpostavitvenih koncentracijah Ag-ND, ki smo jih uporabili v raziskavi, kar kaže na učinke na živčni sistem.

Če upoštevamo koncentracije srebra v koloidnem srebrom, ki je v prosti prodaji, lahko glede na naše rezultate zaključimo, da se negativni učinki na čebele pokažejo pri 10x višjih koncentracijah. Vendar je potrebno poudariti, da se Ag ioni v čebelah lahko tudi kopičijo, kar lahko dolgoročno vpliva na njihovo preživetje. Glede na naše rezultate in zapisano razpravo je raba Ag-ND v prehrani čebel potencialno nevarna, seveda pa tudi nelegalna, saj ni nobenega registriranega veterinarskega pripravka na osnovi Ag-ND za namen zdravljenja katerekoli bolezni čebel.

ZAHVALA

Raziskava je bila financirana s strani Agencije za raziskovalno dejavnost RS (raziskovalni program: P1-0184).

Zahvaljujemo se doc.dr. Primožu Zidarju za pomoč pri zasnovi poskusa.



LITERATURA

- Ahn AJ, Ahn KS, Suh GH, Noh JH, Kim YH, Yoo MS, Kang SW, Shin SS, 2015. Efficacy of silver ions against Sacbrood virus infection in the Eastern honey bee *Apis cerana*. J Vet Sci., 16(3): 289-295.
- Borsuk G, Paleolog J, Olszewski K, Strachecka A, 2013. Laboratory assessment of the effect of nanosilver on longevity, sugar syrup ingestion, and infection of honeybees with *Nosema* spp.. Med. Weter., 69: 730-732.
- Culha M, Kalay S, Sevim E, Pinarbas M, Bas Y, Akpınar R, Karaoglu SA, 2017. Biocidal properties of maltose reduced silver nanoparticles against American foulbrood diseases pathogens. Biometals, 30: 893-902.
- Glavan G, Milivojević T, Božić J, Sepčić K, Drobne D, 2017. Feeding preference and sub-chronic effects of ZnO nanomaterials in honey bees (*Apis mellifera carnica*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 72(3): 471-480.
- Gottschalk F, Lassen C, Kjoelholt J, Christensen F, Nowack B, 2015. Modeling flows and concentrations of nine engineered nanomaterials in the Danish environment. International Journal of Environmental Research and Public Health, 12(5): 5581-5602.
- Imdorf A, Bogdanov S, Ibáñez Ochoa R, Calderone NW, 1999. Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. Apidologie, 30: 209-228.
- Ivask A, Juganson K, Bondarenko O, Mortimer M, Aruoja V, Kasemets K, Blinova I, Heinlaan M, Slaveykova V, Kahru A, 2014. Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: a comparative review. Nanotoxicology, Suppl 1:57-71.
- Iwasaki K, Sato M, 1984. Inhibitory effects of some heavy metal ions on taste nerve responses in mice. Jpn J Physiol., 34(5): 907-918.
- Jemec A, Kahru A, Potthoff A, Drobne D, Heinlaan M, Böhme S, Geppert M, Novak S, Schirmer K, Rekulapally R, Singh S, Aruoja V, Sihtmae M, Juganson K, Kakinien A, Singh S, 2016. An interlaboratory comparison of nanosilver characterisation and hazard identification: harmonising techniques for high quality data. Environment International, 87: 20-32.
- Keast RS, Canty TM, Breslin PA, 2004. Oral zinc sulfate solutions inhibit sweet taste perception. Chem Senses., 29(6): 513-521.
- Khan SU, Anjum SI, Ansari MJ, Khan MHU, Kamal S, Rahman K, Shoaib M, Manh S, Khan AJ, Khan SU, Khan D, 2018. Antimicrobial potentials of medicinal plant's extract and their derived silver nanoparticles: A focus on honey bee pathogen. Saudi Journal of Biological Sciences (In press). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.02.010>
- Kos M, Jemec Kokalj A, Glavan G, Zidar P, Marolt G, Novak S, Božić J, Drobne D, 2017. Biochemical and behavioural responses of the honeybees *Apis mellifera carnica* to cerium (IV) oxide nanoparticles via dietary exposure. Environmental Science: Nano, 4: 2297-2310.
- Neumann P, Carreck C, 2010. Honey bee colony losses: a global perspective J. Apic. Res., 49: 1-6.